



# Rôle des voies Wnt dans la régulation des gènes de la myéline et le cytosquelette des cellules de Schwann

Martin Belle

► **To cite this version:**

Martin Belle. Rôle des voies Wnt dans la régulation des gènes de la myéline et le cytosquelette des cellules de Schwann. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2011. Français. <NNT : 2011PA11T115>. <tel-00714665>

**HAL Id: tel-00714665**

**<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00714665>**

Submitted on 5 Jul 2012

**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.

**Université Paris XI – Faculté de Médecine Paris Sud**

N°:

## **Thèse**

Pour obtenir le grade de docteur de l'Université Paris XI

**Ecole Doctorale BIOSigNE**

“Signalisation et Réseaux Intégratifs en Biologie”

Présentée et soutenue publiquement le 14 décembre 2011 par

**Martin BELLE**

**Rôle des voies Wnt dans la régulation des gènes de la myéline et le cytosquelette des cellules de Schwann**

### **Jury**

Président : Dr. Michael SCHUMACHER  
Rapporteur : Pr. Michel RAYMONDJEAN  
Rapporteur : Dr. Claude FOREST  
Examineur :  
Codirectrice de thèse: Dr. Sophie BERNARD  
Directeur de thèse : Pr. Charbel MASSAAD



# TABLE DES MATIERES

AVANT-PROPOS.....	11
INTRODUCTION.....	14
I. Le système nerveux .....	16
1. Les neurones.....	16
2. Les cellules gliales .....	18
2.1. Les cellules gliales du SNC.....	19
2.2. Les cellules gliales du SNP.....	23
3. La myélinisation.....	26
3.1. Développement et différenciation des cellules de Schwann.....	26
3.2. Les marqueurs exprimés au cours de chaque stade du développement glial .....	28
3-2-1 De la crête neurale aux CS embryonnaires .....	28
3-2-2 Des CS embryonnaires aux CS matures .....	30
3.3. Les facteurs contrôlant le développement de la lignée schwannienne.	31
3.3.1. Le contrôle du développement de la glie à partir de la crête neurale. .....	31
3.3.2. Le contrôle de la survie des CS embryonnaires .....	34
3.3.3. La régulation de la myélinisation .....	35
4. Elaboration de la gaine de myéline par les cellules de Schwann.....	37
5. Démyélinisation à la suite d'une lésion nerveuse.....	38
6. Les pathologies du système nerveux périphérique.....	41
6.1. La maladie de Charcot-Marie-Tooth.....	41
6.1.1 Classification .....	41
6.1.2 La maladie de Charcot-Marie-Tooth de type 1.....	44
6.1.3 Symptômes .....	45
6.1.4 Evolution de la maladie .....	46
6.1.5 Pistes thérapeutiques.....	47
6-2 Fragilité héréditaire des nerfs périphériques à la pression .....	48
II. Le cytosquelette .....	50
1. L'actine .....	51
2. Les microtubules.....	52

2.1. Le centrosome, un centre organisateur du réseau de microtubules.....	55
2.2. Les protéines associées aux microtubules (MAPs) .....	55
2.2.1 Les MAPs structurales.....	56
2.2.2 Les MAPs motrices .....	56
2.3. Interactions actine-microtubules.....	57
2.4. Rôles des microtubules après une lésion dans le système nerveux central et périphérique .....	59
III. Les voies de signalisation Wnt .....	60
I. Les voies Wnt canoniques .....	61
2. Les voies Wnt non canoniques.....	62
3. Dialogues entre les différentes signalisations Wnt.....	64
4. Rôle de la voie Wnt sur le cytosquelette.....	65
5. Rôles de Wnt dans le développement du système nerveux.....	69
6. Implications de la voie Wnt dans les maladies neurodégénératives .....	71
6.1. Maladie d'Alzheimer .....	71
6.2. Wnt et neuroprotection.....	71
6.3. Wnt et pathologies génétiques.....	72
MATERIEL ET METHODES.....	74
RESULTATS .....	84
I. Régulation des gènes de la myéline par les différentes voies Wnt .....	86
1. La voie Wnt/ $\beta$ -caténine régule l'expression des gènes de la myéline dans le système nerveux central et dans le système nerveux périphérique (article 1) .....	86
2. Résultats supplémentaires de l'article 1 .....	104
II. Régulation du cytosquelette des cellules de Schwann par les différentes voies Wnt .....	106
1. Rôles des facteurs Wnts sur le cytosquelette des cellules de Schwann.....	106
2. Implication de Dishevelled dans les effets des ligands Wnts sur le cytosquelette des CS.....	108
3. Rôle de la GSK3 $\beta$ sur le cytosquelette des cellules de Schwann .....	111
III. Apports de la microspectrométrie infrarouge sur la caractérisation des CS..	117
IV. Etudes dans un contexte lésionnel .....	124
1. Etude de la régulation de l'expression des gènes de la myéline dans un contexte lésionnel .....	124

2. Effets d'une lésion mécanique sur la voie Wnt.....	125
3. Effets du Chlorure de lithium sur remyélinisation après lésion in vivo (article 2) .....	129
DISCUSSION ET PERSPECTIVES .....	156
BIBLIOGRAPHIE .....	170

# TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Structure d'un neurone [4].	17
Figure 2 : Partenaires gliaux du SNC [5].	19
Figure 3 : Structure de la gaine de myéline synthétisée par les oligodendrocytes [7].	20
Figure 4 : Cellule de Schwann formant une gaine de myéline [5].	23
Figure 5 : Schéma de migration des cellules de la crête neurale [37].	27
Figure 6 : Schéma du processus de maturation des cellules de Schwann [37].	28
Figure 7 : Les marqueurs moléculaires exprimés au cours du développement de la lignée schwannienne jusqu'au stade CS embryonnaires [37].	29
Figure 8 : Les marqueurs moléculaires exprimés au cours du passage des CS embryonnaires en CS matures [40].	30
Figure 9 : Effets synergiques de NFATc4 et Sox10 sur l'expression de Krox 20 et P0 [49].	33
Figure 10 : Les facteurs contrôlant le développement des CS myélinisantes [37].	36
Figure 11 : Formation de la gaine de myéline [38].	37
Figure 12 : La dégénérescence Wallérienne et la repousse axonale [85].	39
Figure 13 : Etiologie des différentes formes de la maladie de Charcot-Marie-Tooth	42
Figure 14 : Coupes semi-fines de nerf sciatique coloré au bleu de toluidine [100].	44
Figure 15 : Atrophies musculaires fibulaires et déformations des pieds chez des patients atteints de CMT1A [101].	46
Figure 16 : Coupe d'une biopsie nerveuse d'un patient atteint de HNPP [110].	49
Figure 17 : Organisation du cytosquelette d'actine et de tubuline dans une cellule en cours de protusion [114].	50
Figure 18 : Structure et dynamique des filaments d'actine [117].	51
Figure 19 : Structure des microtubules et instabilité dynamique [122].	53
Figure 20 : Modèle d'implication d'APC dans le cytosquelette [145].	58
Figure 21 : Rôles des microtubules après lésion dans le SNC et le SNP [155].	59
Figure 22: Désignation des protéines Wnts et Fz chez quatre espèces différentes [156].	60
Figure 23: Les différentes voies de signalisation Wnt, 1ère partie [157].	62
Figure 24: Les différentes voies de signalisation Wnt, 2nd partie [157].	63

Figure 25: Régulation des substrats de la GSK3 $\beta$ au cours de la croissance axonale [168]. .....	66
Figure 26: Régulation de la stabilité des microtubules au cours de la pousse axonale [170]. .....	67
Figure 27: Effets possibles de la signalisation Wnt sur le cytosquelette par l'intermédiaire de la protéine APC [145].....	67
Figure 28: Schéma de principe de l'AFM et du dispositif utilisé. ....	76
Figure 29: Images de hauteur et de déflexion de cellules de Schwann (MSC80) dans leur milieu de culture (100 $\mu$ m x 100 $\mu$ m). ....	77
Figure 30: Schéma de principe du fonctionnement du synchrotron SOLEIL .....	79
Figure 31: Montage utilisé sur la ligne de lumière SMIS du synchrotron SOLEIL.....	80
Figure 32: Effets de différents ligands Wnt sur l'expression de P0 dans les cellules de Schwann.....	104
Figure 33: Effets de différents ligands Wnt sur l'expression de PMP22 et connexine 43 dans les cellules de Schwann. ....	105
Figure 34: Mesure des prolongements des cellules de Schwann sous l'effet de différents Wnts.....	107
Figure 35: Mesure des prolongements des cellules de Schwann sous l'effet de différents Wnts et d'un dominant négatif de Dvl.....	110
Figure 36: Effets du LiCl sur la morphologie des cellules de Schwann. ....	112
Figure 37 : Images de déflexion de MSC80 cultivées dans leur milieu de culture pendant 48h sur une matrice de collagène de type I.....	113
Figure 38: Images prises au microscope à force atomique de déflexion de MSC80 cultivées dans leur milieu de culture pendant 48h sur une matrice de collagène de type I.....	114
Figure 39: Images de déflexion de MSC80 cultivées dans leur milieu de culture pendant 48h sur une matrice de collagène I. ....	115
Figure 40: Mesure des prolongements des cellules de Schwann sous l'effet d'un dominant négatif de Dvl et du LiCl. ....	117
Figure 41: Spectre IR enregistré au niveau du noyau d'une cellule de Schwann isolée.	122
Figure 42: Résultats de l'analyse en composantes principales des spectres enregistrés au niveau du cytoplasme des extensions de 40 cellules .....	123
Figure 43: Effets d'une lésion mécanique sur la régulation des gènes de la myéline. ....	124



Figure 44: Régulation de l'expression des gènes de la myéline et de la voie Wnt 8h et 24h après une expérience de strie.....	126
Figure 45: Variation de la quantité de protéine P-GSK3 $\beta$ 24h après une strie.....	127
Figure 46: Recouvrement d'une strie de cellules MSC80 en fonction du temps et de l'induction au LiCl. ....	128
Figure 47 : Rôle de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine et des glucocorticoïdes dans la réparation des maladies démyélinisantes. ....	166

# ABBREVIATIONS

AA: Acides Aminés  
AD: Alzheimer Disease  
ADP: Adenosine DiPhosphate  
AMPc: Adénosine MonoPhosphate cyclique  
AP2 $\alpha$ : Activating enhancer-binding Protein 2 alpha  
APC: Adenomatosis Polyposis Coli  
APP: Amyloid Precursor Protein  
ARNm: Acide RiboNucléique messenger  
ATP: Adenosine TriPhosphate  
BDNF: Brain-Derived Neurotrophic Factor  
BFABP: Brain Fatty Acid Binding Protein  
BMP2/4: Bone Morphogenetic Protein2/4  
BRN2: Brain-2  
CaMKII: calcium/calmodulin-dependent proteine kinase II  
Cdc42: cell division cycle 42  
CHO: Chinese Hamster Ovary  
CMT: Charcot-Marie-Tooth disease  
CREB: cAMP Response Element-Binding  
CRMP: Collapse Response Mediator Protein  
CS: Cellules de Schwann  
DHH: Desert Hedgehog  
DVL: Dishevelled  
E: Embryonnaire  
EB1: End Binding protein 1  
ErbB ou EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor  
FGF: Fibroblast Growth Factor  
Fz: Frizzled  
Galc: Galactocerebroside  
GDNF: Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor  
GFAP: Glial Fibrillary Acidic Protein

GTP: Guanosine TriPhosphate  
GSK $\beta$ : Glycogen Synthase Kinase beta  
HAT: Histone AcetylTransferase  
HDAC: Histone DéAcétylase  
HNPP: Hereditary Neuropathy with liability to Pressure Palsies  
HSMN: Hereditary Sensory and Motor Neuropathy  
IGF: Insulin like Growth Factor  
IR: Infrarouge  
JNK: c-Jun N-terminal Kinase  
Kb: kilo-base  
kDa: kilo-Dalton  
KO: Knock-Out (invalidation génique)  
Krox20: Krüppel homeo box 20  
L1: L1 cell adhesion molecule  
LCR: Liquide-Céphalo-Rachidien  
LDL: Low Density Lipoprotein  
LEF: Lymphoid Enhancer Factor  
LiCl: Lithium Chloride  
LRP: LDL Receptor-related Protein  
Luc: Luciférase  
m/sec: mètre/seconde  
MAG: Myelin-Associated Glycoprotein  
MAP: Microtubule Associated Protein  
MBP: Myelin Basic Protein  
MOG: Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein  
MPZ: Myelin Protein Zero  
MSC80: Mouse Schwann Cell 80  
MTOC: MicroTubule Organization Center  
NCAM: Neural Cell Adhesion Molecule  
NFAT: Nuclear Factor of Activated T-cells  
NF $\kappa$ B: Nuclear Factor-kappa B  
NGF: Nerve Growth Factor  
NRG: Neuregulin

NT3: Neurotrophin-3  
OCT6: Octamer binding protein 6  
P0: Myelin Protein Zero  
p75<sup>NTR</sup>: p75 Neurotrophine Receptor  
PAX: Paired Box  
PCP: Planar Cell Polarity  
PI3K: PhosphoInositide 3-Kinase  
PKC: Protein Kinase C  
PLC: PhosphoLipase C  
PLP: ProteoLipid Protein  
PMD: Pelizaeus-Merzbacher Desease  
PMP22: Peripheral Myelin Protein 22 kDa  
PS1: presenilin 1  
RACK: Receptor for Activated C-Kinase  
RhoA: Ras homolog gene familly member A  
SEP: Sclérose en Plaque  
siRNA: small interfering RiboNucleic Acid  
SNC: Système Nerveux Central  
SNP: Système Nerveux Périphérique  
SOX10: SRY (Sex determining Region Y)-box 10  
sPLA2: Phospholipase A2 sécrétée  
TACE: Tumor necrosis factor- $\alpha$ -converting enzyme  
TAU: Tubule Associated Unit  
TCF: T-Cell Factor  
TGF $\beta$ : Transforming Growth Factor beta  
WNT: Wingless Integration

# AVANT-PROPOS

Le travail de thèse exposé dans ce manuscrit a pour objectif d'étudier la régulation des gènes de la myéline et les modifications du cytosquelette des cellules de Schwann (CS) par la voie Wnt à la fois dans un contexte physiologique et dans un contexte lésionnel.

Les cellules de Schwann font partie du système nerveux périphérique (SNP) et ont pour fonction la myélinisation des axones. La gaine de myéline contribue à isoler électriquement l'axone sous-jacent permettant ainsi une conduction rapide et saltatoire de l'influx nerveux. La formation de la gaine de myéline est un processus très complexe et finement régulé. Il démarre par une prolifération de cellules progénitrices, puis une différenciation en cellules myélinisantes. Les membranes plasmiques de ces cellules s'enroulent autour des axones des neurones et expriment les gènes de la myéline. Ces derniers sont eux aussi étroitement régulés et la moindre surexpression ou sous-expression entraîne des pathologies neurologiques invalidantes. En effet, dans le SNP, une altération dans les gènes codants pour des protéines de contact cellulaire (PMP22 et MPZ, les deux gènes majeurs de la myéline du SNP) entraîne des neuropathies sensitivomotrices comme les maladies de Charcot-Marie-Tooth (CMT). La forme CMT1A, la plus fréquente, est due à une surexpression de la PMP22. La gaine de myéline est affectée, provoquant un ralentissement de la conduction nerveuse. Le dysfonctionnement du nerf périphérique entraîne un déficit sensitif et moteur des muscles des extrémités des membres, ce qui occasionne la plupart du temps une perte de fonction et un handicap d'aggravation progressive.

Les lésions de la myéline peuvent aussi être provoquées par des traumatismes physiques (pincement ou lésion du nerf) ou inflammatoires. Ils déclencheront une activation du système immunitaire qui peut complètement dégrader la myéline et induire des lésions axonales irréversibles.

Les relations étroites qui unissent l'axone à la cellule de Schwann sont établies au cours du développement, perdurent jusqu'à l'âge adulte et sont renforcées en cas de pathologies. Les dialogues entre ces deux partenaires ainsi qu'avec leur environnement

passent par de très nombreuses voies de signalisation. L'une d'elle est étudiée depuis longtemps au sein du laboratoire, la voie Wnt. Cette famille de glycoprotéines morphogènes est fondamentale au cours du développement puisqu'elle participe à l'établissement des axes de l'organisme. Elle intervient également au cours des phénomènes de prolifération, migration, polarisation, division et apoptose. Au sein du système nerveux, la voie Wnt participe au développement axonal et dendritique, au devenir des progéniteurs neuronaux, à la synaptogénèse [1], au bon fonctionnement et à la viabilité des neurones [2]. Récemment, des expériences de surexpression de l'effecteur final de la voie Wnt, la  $\beta$ -caténine, ont montré son implication au cours du développement des cellules myélinisantes du système nerveux central, les oligodendrocytes [3].

Au regard de l'importance de cette voie de signalisation au sein du système nerveux et du fait de l'étroite relation entre la cellule nerveuse et la cellule de Schwann, nous nous sommes posé plusieurs questions :

- Quels rôles jouent les voies Wnt au cours de la myélinisation du système nerveux périphérique ?
- Quelle est l'implication de la voie Wnt canonique lors d'un phénomène traumatique *in vitro* et *in vivo* ?
- Quels sont les effets des partenaires de la voie de signalisation sur le cytosquelette de la cellule de Schwann ?



# INTRODUCTION





# I. Le système nerveux

Le système nerveux est composé de deux parties :

- le système nerveux central (SNC) qui comprend le cerveau, le tronc cérébral, le cervelet et la moelle épinière ;
- le système nerveux périphérique (SNP) qui comprend les nerfs et ganglions périphériques ;

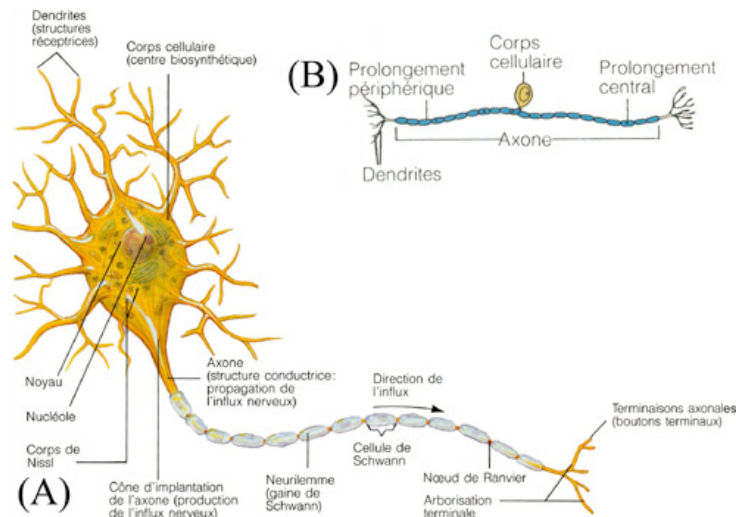
Le système nerveux est constitué de deux types cellulaires : les neurones et les cellules gliales.

## 1. Les neurones

Les neurones (cellules nerveuses) sont spécialisés dans la création et la propagation du potentiel d'action, impulsion électrique qui résulte de l'ouverture et de la fermeture de certains canaux ioniques voltages dépendants. Ces cellules peuvent synthétiser des neurotransmetteurs et des hormones.

Ils sont constitués de quatre régions ayant des rôles bien spécifiques (Figure 1) :

- un corps cellulaire ou péricaryon qui contient le noyau et est le site préférentiel de synthèse des protéines et des membranes neuronales ;
- les dendrites qui sont les prolongements convertissant les signaux chimiques provenant de terminaisons axonales d'autres neurones en impulsions électriques ;
- une longue extension cytoplasmique, l'axone, qui est le prolongement efférent spécialisé dans la conduction des potentiels d'action ;
- la terminaison axonale qui est une petite ramification de l'axone formant une synapse avec d'autres cellules.



**Figure 1 : Structure d'un neurone [4].** En (A) est représenté un neurone multipolaire, en (B), un neurone bipolaire.

Cette structure générale peut présenter des variations d'un neurone à l'autre. On distingue ainsi d'importantes variabilités de formes (étoilée, fusiforme, conique, polyédrique, sphérique, pyramidale) et de tailles (petit, moyen, grand ou géant) du corps cellulaire. Les prolongements sont de nombres et de tailles variables. Ainsi, les neurones du système nerveux central ont des dendrites extrêmement longues avec des ramifications complexes pour leur permettre de former des synapses avec un grand nombre d'autres neurones et d'en recevoir les signaux. Certains axones peuvent, par exemple, faire leurs synapses directement sur le corps cellulaire ou même sur l'axone d'un autre neurone.

Le dialogue entre les neurones se fait par l'intermédiaire de messagers chimiques appelés neurotransmetteurs. Ils sont sécrétés par l'extrémité axonale (axone présynaptique) dans la fente synaptique et interagissent avec leurs récepteurs spécifiques, situés sur la membrane postsynaptique. La fixation du neurotransmetteur sur son récepteur induit une dépolarisation de la membrane du neurone postsynaptique qui va s'étendre le long de la dendrite vers le péricaryon puis de ce dernier vers l'axone et induire au niveau d'une autre synapse la sécrétion de neurotransmetteurs. En fonction de la nature du neurotransmetteur (excitateur ou inhibiteur), la dépolarisation membranaire sera excitatrice ou inhibitrice.

On distingue différents types de neurones selon que l'on choisisse le critère fonctionnel ou morphologique.

D'un point de vue fonctionnel :

- les neurones sensoriels reçoivent les messages des récepteurs sensoriels et les transmettent au système nerveux central ;
- les neurones moteurs conduisent la commande motrice du cortex à la moelle épinière ou de la moelle aux muscles ;
- des interneurones connectent entre eux différents neurones à l'intérieur du cerveau.

Selon le critère morphologique, basé sur le nombre de prolongements qui partent du corps cellulaire, on distingue :

- les neurones pseudo-unipolaires qui ont un court prolongement qui se subdivise rapidement en deux, l'un faisant office de dendrite, l'autre d'axone ;
- les neurones multipolaires qui ont de courtes dendrites émanant du corps cellulaire et un long axone ;
- les neurones bipolaires qui ont deux prolongements principaux de longueur similaire.

## **2. Les cellules gliales**

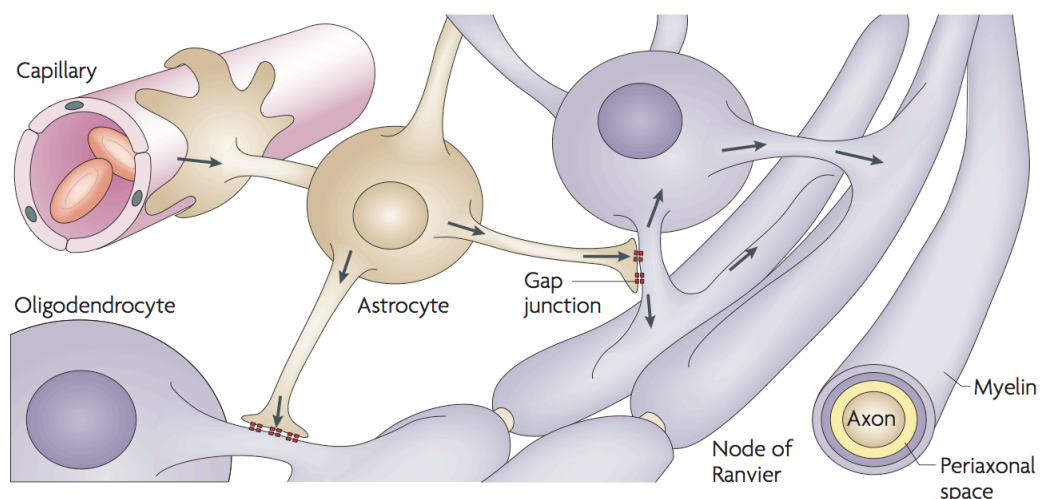
Les cellules gliales sont bien plus que des cellules de soutien, rôle qui leur a longtemps été dévolu. Ainsi, elles participent au développement du système nerveux et contribuent au fonctionnement physiologique du système nerveux. Elles communiquent entre elles et avec les cellules nerveuses par l'intermédiaire de médiateurs chimiques. Ces derniers se fixent aux nombreux récepteurs présents à la surface et le signal est transduit par l'intermédiaire des canaux ioniques voltages dépendants. Les cellules gliales sont très fortement majoritaires au sein du système nerveux (90%) et peuvent être classées en deux sous-parties : la microglie et la macroglie. Les cellules microgliales sont spécifiques du SNC, elles représentent 5 à 25% des cellules du cerveau. Elles participent à la défense immunitaire du cerveau en éliminant par phagocytose les débris cellulaires, en permettant la présentation de l'antigène et la sécrétion de différents facteurs trophiques ou toxiques comme les cytokines, les facteurs de croissance ou les radicaux libres. Leur rôle va bien au-delà de celui de sentinelles immunitaires du

système nerveux central, elles participent à la neuroprotection et influencent la régénération et la neurogénèse. Les cellules macrogliales, quant à elles, sont présentes à la fois dans le SNC (astrocytes, oligodendrocytes et épendymocytes) et le SNP (cellules de Schwann et cellules satellites).

## 2.1. Les cellules gliales du SNC

- les **épendymocytes** forment un pseudo-épithélium simple délimitant les différentes cavités du système nerveux central. Ces cellules sont aussi responsables de la synthèse et de la circulation du liquide céphalo-rachidien (LCR).
- les **astrocytes** sont de loin les cellules les plus nombreuses. De forme étoilée, ils assurent un support mécanique et trophique aux neurones. Ils jouent un rôle nourricier, assurent l'homéostasie du milieu extracellulaire, contrôlent le pH et la concentration en neurotransmetteurs.

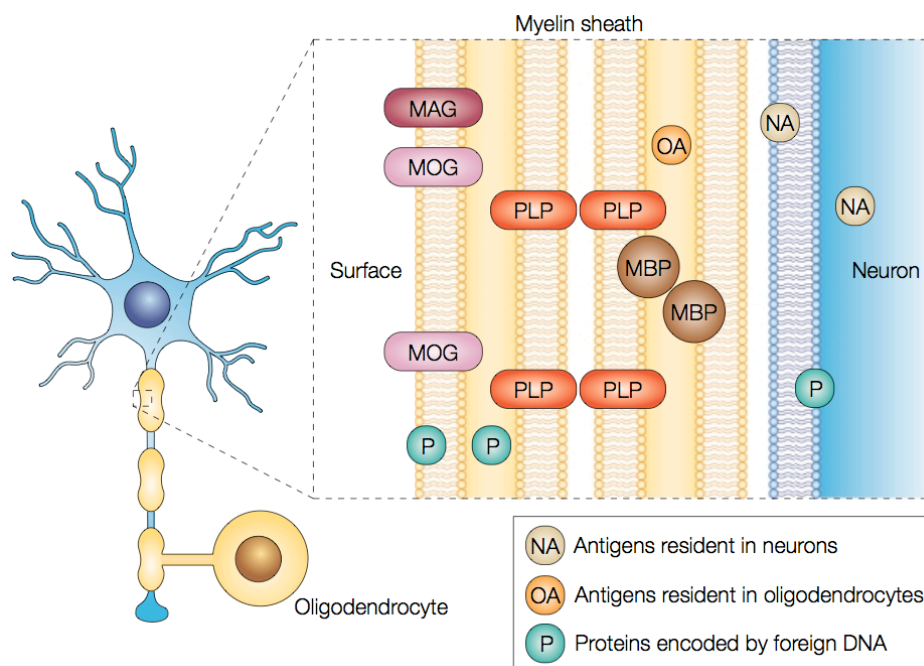
On distingue les astrocytes de type I en contact avec les capillaires sanguins et les astrocytes de type II qui sont étroitement associés aux synapses empêchant ainsi toute fuite de neurotransmetteur. Par ailleurs, ils participent à l'élimination de déchets de toutes sortes en les reversant dans les capillaires sanguins.



**Figure 2 : Partenaires gliaux du SNC [5].** Les oligodendrocytes myélinisent les axones. Ils sont en contact étroit avec les astrocytes par l'intermédiaire de jonctions gap. Ces derniers établissent le contact avec la barrière hémato-encéphalique.

- les **oligodendrocytes** synthétisent la gaine de myéline entourant les axones de nombreux neurones. La gaine de myéline est formée par l'enroulement en spirale des extensions plasmatiques des cellules gliales autour d'un axone, suivi de l'extrusion du cytoplasme et de la compaction des différentes couches membranaires. Cette structure permet une isolation électrique autour des axones et optimise la vitesse de conduction de l'influx nerveux, grâce à la conduction saltatoire d'un nœud de Ranvier à l'autre.

La gaine de myéline est riche en lipides, particulièrement en glycosphingolipides et en cholestérol. Ce dernier est essentiel au bon fonctionnement physiologique puisque les souris dont les oligodendrocytes ne synthétisent pas de cholestérol présentent un retard de myélinisation qui peut être en partie compensé par un apport de cholestérol exogène [6]. Les différentes protéines de la myéline qui existent présentent des localisations et des proportions différentes dans le SNC et le SNP.



**Figure 3 : Structure de la gaine de myéline synthétisée par les oligodendrocytes [7].** Les protéines PLP et MBP sont fondamentales pour le maintien de l'architecture et de la compaction de la gaine de myéline du SNC.

Dans le SNC, les protéines de la myéline spécifiquement synthétisées par les oligodendrocytes sont la Myelin Proteolipid Protein (PLP/DM-20) ainsi que la

Myelin Basic Protein (MBP) qui constituent à elles seules 80% des protéines totales (Figure 3). Dans des proportions nettement moins abondantes, on retrouve la Myelin-Associated Glycoprotein (MAG), la Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein (MOG) ou encore 2':3'-Cyclic Nucleotide 3'-Phosphodiesterase (CNP). Leurs localisations sub-cellulaire montrent des répartitions très spécifiques.

La **PLP** représente près de la moitié des protéines de la myéline du SNC. L'épissage alternatif est responsable de deux formes de la protéine. La plus longue, PLP, est exprimée majoritairement dans le SNC. La plus courte, DM-20, est tronquée d'une boucle de 35 acides aminés normalement exposée à la face cytoplasmique et indispensable aux bonnes compaction et stabilité de l'architecture multilamellaire. DM-20 semble être la forme ancestrale de la PLP et l'apparition de cette boucle de 35 acides aminés pourrait dater de 300 millions d'années et être apparue chez les amphibiens [8]. Elle est aussi exprimée dans les tubes séminifères, les cellules myocardiques, le thymus et la rate. Ces deux isoformes ne semblent pas être interchangeable car l'inactivation par transgénèse de l'isoforme spécifique de PLP chez la souris n'est pas entièrement compensée [9].

Le gène codant ces protéines est localisé sur le chromosome X en position Xq22 chez l'Homme et dans la zone H2C chez la souris. Il mesure 45 kb et est composé de 7 exons. La PLP est une protéine hautement conservée chez les mammifères (pas plus d'un ou deux résidus différents entre les espèces). Ainsi, les formes humaines et murines présentent une homologie de séquence de 100%. La protéine PLP est formée de 4 hélices  $\alpha$  hydrophobes formant des domaines transmembranaires, de 2 domaines extracellulaires et de 3 domaines cytoplasmiques (comprenant les extrémités NH<sub>2</sub> et COOH). De plus, elle possède des modifications covalentes puisque 6 acides gras (seulement 4 pour DM-20) lui sont ajoutés sur des résidus de cystéine par un mécanisme autocatalytique post-transcriptionnel [10].

Différentes fonctions ont été proposées pour PLP-DM20 telles qu'un canal ionique pour les petites molécules [11] ou encore un précurseur de « secreted mitogen » [12]. L'inactivation de la PLP chez la souris par Knock-Out (KO) ou

ARN anti-sens démontre la formation d'une myéline compacte par les oligodendrocytes. Cependant, l'ultrastructure de la myéline montre une « condensation des lignes intrapériodiques » corrélée avec une réduction de sa stabilité [13]. Ainsi, la PLP et sa boucle cytoplasmique de 35 acides aminés permet de stabiliser les jonctions membranaires après compaction de la myéline [14]. Enfin, la découverte que PLP mais pas DM-20 pouvait interagir avec l' $\alpha_v$ -intégrine suggère un rôle de cette protéine comme médiateur de signaux intracellulaires importants pour le développement oligodendroglial [15].

Des mutations dans le gène PLP provoquent chez l'Homme la maladie de Pelizaeus-Merzbacher (PMD), une pathologie du système nerveux central qui affecte la coordination, les fonctions motrices et cognitives. La PMD fait partie d'un groupe de maladies génétiques qui affectent la myéline, appelées les leucodystrophies. La cause la plus courante de la maladie PMD est la surexpression de la PLP par duplication du gène. Mais elle peut aussi être due à une perte totale de l'expression de la PLP (délétion entière du gène ou mutation non sens au début de la séquence codante) ou encore à des mutations ponctuelles [16].

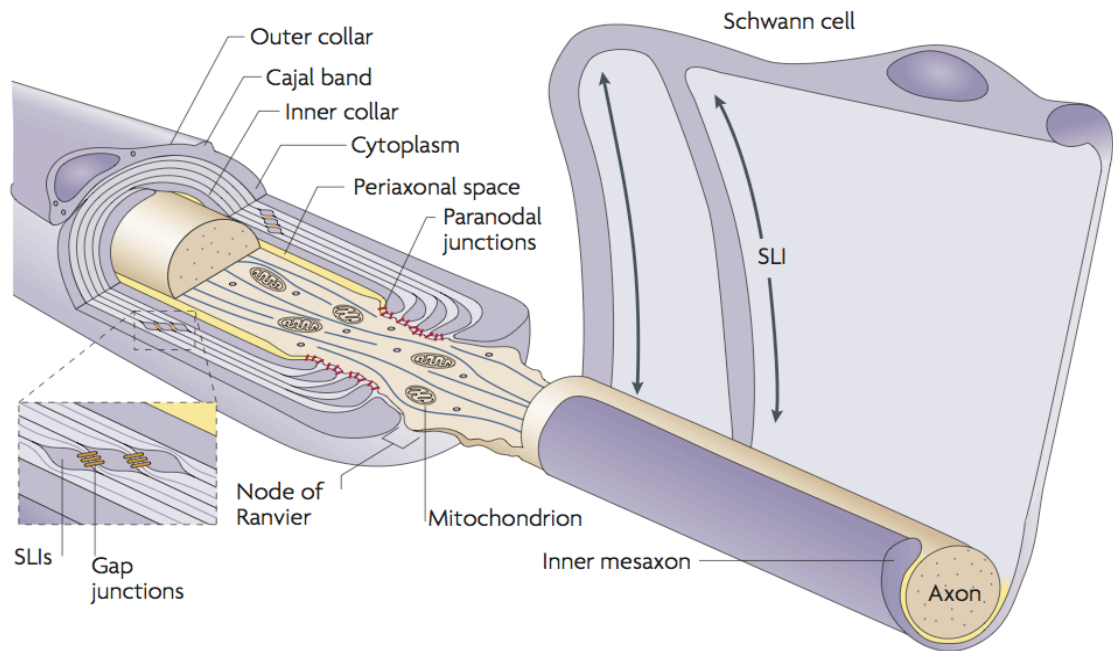
La **MBP** représente 30% des protéines de la myéline du SNC. Les deux isoformes majeures de la MBP chez l'Homme font respectivement 18,5 et 17,2 kDa contre 18,5 et 14 kDa chez la souris, constituant 95% des MBPs. Le gène codant les protéines MBP est localisé en 18q22 et mesure 45 kb dans l'espèce humaine. Celui de la souris ne présente que peu de différences, puisqu'il est localisé sur le chromosome 18 et mesure 32 kb chez la souris. Les isoformes de MBP proviennent d'un épissage alternatif du gène de la MBP qui contient 7 exons. Chez la souris, il existe au moins 7 transcrits et d'autres variants d'épissage sont aussi exprimés pendant l'embryogenèse. Elle est la seule protéine fondamentale à la structuration de l'architecture de la myéline du SNC. Le modèle de souris Shiverer qui présente une délétion naturelle d'une grande part du gène codant pour la protéine MBP, ne possède pratiquement pas de myéline compacte dans le SNC [17]. Le rat " Long Evans shaker ", portant une mutation de MBP entraînant une transcription aberrante, ne possède pas non plus de myéline compacte dans le SNC [18]. La protéine MBP est aussi exprimée dans de faibles proportions dans



le SNP. Toutefois, elle n'est pas nécessaire à la constitution de la gaine de myéline du fait de l'action des autres protéines de la myéline périphérique telles que Myelin Protein Zero (MPZ ou P0) et Peripheral Myelin Protein 22 kD (PMP22) [19].

## 2.2. Les cellules gliales du SNP

- Les cellules satellites ont une fonction analogue aux astrocytes. Elles entourent les neurones sensoriels et autonomes. Ces cellules assurent la fonction de "charpente" et également de nutrition des neurones.
- Les CS sont les cellules myélinisantes. A la différence des oligodendrocytes du système nerveux central qui myélinisent plusieurs axones, une cellule de Schwann ne synthétise qu'une gaine par axone (Figure 4).



**Figure 4 : Cellule de Schwann formant une gaine de myéline [5].** La myéline compacte (en violet clair) sert d'isolant tandis que la partie non compacte (violet foncé) est en continuité avec le cytoplasme de la cellule gliale permettant d'amener les nutriments au plus près du périaxone (jaune). Les incisures de Schmidt-Lanterman (SLI) sont liées par des jonction gap quand elles sont superposées.

Les CS entretiennent des relations étroites avec les neurones en participant à leur développement, leur fonctionnement et leur régénéscence. Les CS établissent un

dialogue avec les neurones en développement par l'intermédiaire de facteurs neurotrophiques et en constituant un support, une matrice extracellulaire.

A la manière des oligodendrocytes du SNC, les CS synthétisent la gaine de myéline indispensable à la conduction saltatoire et rapide de l'influx nerveux.

Enfin, les CS favorisent la repousse axonale à la suite d'une lésion. Après s'être différenciées, elles peuvent se multiplier et créer un environnement favorable et adapté à la repousse puis à la remyélinisation.

La myéline du SNP comme celle du SNC possède certaines protéines spécifiques telles la myelin protein zero (P0 ou MPZ) et la peripheral myelin protein 22 (PMP22).

La **P0** ou **MPZ** représente 50% des protéines de la myéline périphérique. Le gène codant pour P0 est localisé sur le chromosome 1 en position 1q22-q23 chez l'Homme. Il comporte 6 exons répartis sur 7kb. Son expression est spécifique des cellules de Schwann matures. Sa séquence présente 95% d'homologie entre l'homme et le rat [20]. Ce gène code pour une protéine de 219 Acides Aminés (AA), qui possède un domaine extracellulaire, un domaine transmembranaire unique et un domaine cytoplasmique [21]. Elle fait partie d'une large famille de protéines d'adhésion ayant des domaines immunoglobulines (Ig)-like [22]. De très nombreuses expériences ont montré l'implication de la protéine P0 dans le maintien de l'architecture, l'adhérence et la compaction de la gaine de myéline. Les recombinaisons homologues effectuées chez la souris en vue d'inactiver le gène P0 provoquent l'hypomyélinisation des axones et d'importants troubles de la coordination motrice [23]. Des études sur les cellules CHO (Chinese Hamster Ovary) ont montré que P0 peut agir comme une molécule d'adhésion homophile par l'intermédiaire de son domaine extracellulaire [24], comme les autres membres de la superfamille des immunoglobulines. Le domaine intracellulaire participe aussi à l'adhésion avec le domaine extracellulaire comme en attestent des expériences *in vitro* de mutations dans ce domaine bloquant l'adhésion homotypique [25] et provoquant certaines formes particulièrement sévères de maladies démyélinisantes [26]. De plus, la co-expression de la forme sauvage de P0 et de la forme tronquée du domaine intracellulaire entraîne *in vitro* une perte de l'adhésion, probablement à cause de l'effet dominant négatif de la protéine tronquée [27]. La délétion d'une séquence de 14 AA dans ce domaine abolit aussi l'adhésion *in vitro*. De plus, des mutations ponctuelles de cette séquence altèrent un motif de substrat pour PKC $\alpha$ . PKC $\alpha$  et le

récepteur de la kinase C activée (RACK1) sont co-immunoprécipités dans les cellules exprimant P0 sauvage mais pas dans celles où P0 est mutée dans cette séquence de 14 AA. L'ensemble de ces résultats suggère que la phosphorylation par PKC est importante pour la régulation de l'adhésion de P0. Un patient atteint de Charcot-Marie-Tooth (CMT) avec une mutation dans la P0 au niveau du domaine cible à la phosphorylation par la PKC a été identifié, ce qui laisse penser que la rupture de l'adhésion peut être associée avec la démyélinisation [28]. Enfin le domaine cytoplasmique de P0 joue aussi un rôle important dans la compaction du cytoplasme des cellules de Schwann et dans la formation de la ligne dense principale de la myéline du SNP. Ceci grâce à une interaction entre P0 et la MBP car les souris invalidées pour la P0 et la MBP ne possèdent plus cette ligne dense [29] alors que les cellules de Schwann des souris invalidées pour la P0 uniquement peuvent former la ligne dense [23]. Le rôle joué par P0 sur la compaction de la myéline via son domaine cytoplasmique est encore inconnu. Cependant une hypothèse serait que les résidus basiques de ce domaine interagissent avec les phospholipides adjacents [30, 31].

La **PMP22** représente environ 5% des protéines de la myéline périphérique. C'est une petite glycoprotéine hydrophobe qui est principalement exprimée dans les cellules de Schwann comme composant de la myéline du SNP. De nombreux travaux de génétique moléculaire ont révélé que les mutations, délétions et duplications touchant la PMP22 sont responsables de la forme la plus courante de la maladie démyélinisante de Charcot-Marie-Tooth, la CMT1A [32] mais aussi d'autres neuropathies héréditaires telles que le syndrome Dejerine-Sottas et HNPP (Hereditary Neuropathy with liability to Pressure Palsies). Chez l'Homme, le gène est localisé sur le chromosome 17, le bras court en position 22 et code pour une protéine de 160 acides aminés et de 18kDa composée de 4 domaines transmembranaires et 2 domaines extracellulaires. L'ARNm de PMP22 est majoritairement exprimé dans le SNP, au niveau des nerfs sciatiques, mais également, dans de faibles proportions, dans le SNC. Les séquences humaines et murines présentent 86% d'homologie. Parmi celles-ci, on retrouve une séquence de N-glycosylation ainsi que la partie membranaire.

A la suite d'une lésion nerveuse, l'expression de PMP22 décroît très rapidement dans la partie distale et est fortement induite lors de la régénération. La fonction de la protéine est assez mal connue. Plusieurs études ont suggéré un rôle de PMP22 dans le contrôle de

la prolifération et de l'apoptose des cellules de Schwann [33]. La majeure partie des connaissances concernant la fonction de PMP22 est issue de son implication dans les maladies dégénératives. Comme souvent, l'étude de souris mutantes, les souris Trembler (Tr), permet de déterminer la fonction de la protéine. La mutation Tr affecte un résidu localisé dans le dernier domaine hydrophobe de la protéine et engendre un défaut dans le trafic cellulaire de la protéine qui entraîne une hypomyélinisation ainsi qu'une prolifération des cellules de Schwann et une réduction de la conduction nerveuse. La mutation Tr-J concerne, elle, un résidu du premier domaine hydrophobe et affecte aussi le trafic cellulaire de la protéine. Les symptômes sont les mêmes que ceux de la souris Tr mais ils sont moins prononcés. Des souris [34] et des rats [35] possédant des copies supplémentaires de PMP22 ont été générés. Ces animaux développent des phénotypes très proches de la maladie démyélinisante de Charcot-Marie-Tooth de type 1A (CMT1A). Ceci prouve qu'une augmentation de l'expression de PMP22 est suffisante pour causer un défaut de myéline dans le SNP. Les souris PMP22<sup>-/-</sup>, quant à elles, se développent normalement jusqu'à la deuxième semaine où elles présentent des difficultés de déplacement associées avec une hypermyélinisation du SNP [36].

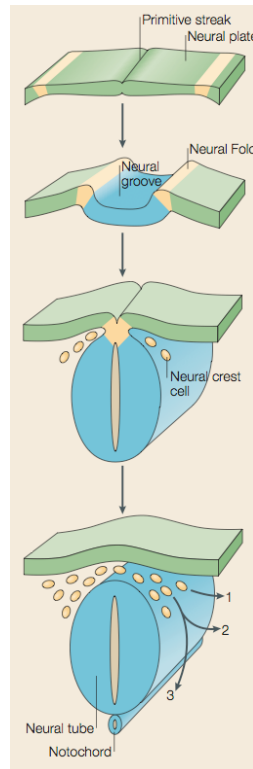
### **3. La myélinisation**

#### **3.1. Développement et différenciation des cellules de Schwann**

Les CS sont originaires des cellules souches multipotentes de la crête neurale également à l'origine des neurones et des mélanocytes [37]. Au cours de la neurulation, la plaque neurale se situant sur la face dorsale de l'embryon s'invagine et forme le tube neural par fusion des bordures. Les cellules de la crête neurale débutent leur migration dans deux directions distinctes. Latéralement, elles donneront naissance aux mélanocytes (Figure 5, flèche 1) et ventralement, elles donneront les neurones des ganglions sensitifs (Figure 5, flèche 2), les neurones autonomes et la glie (Figure 5, flèche 3).

A chaque étape de leur développement, les cellules de la lignée schwannienne nouent des relations spécifiques avec les cellules environnantes et en particulier les neurones. Ainsi, les cellules de la crête neurale migrent tout le long de la matrice extracellulaire, puis les précurseurs des CS et les CS embryonnaires établissent des

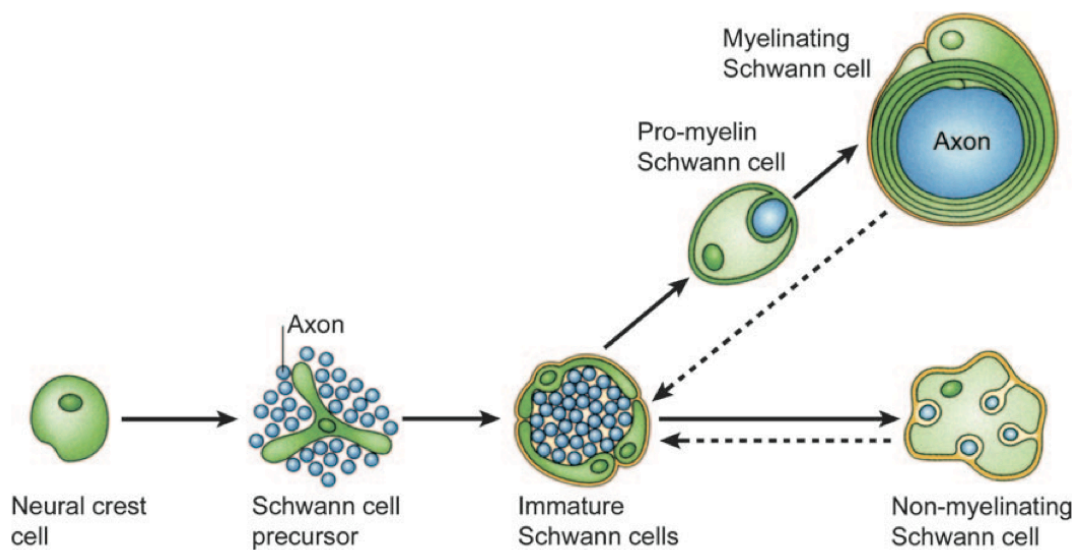
contacts étroits avec les neurones (axones). La lame basale qui est absente au stade "cellules de la crête neurale" et "précurseurs des CS" apparaît dans les CS. Les relations entre ces différentes composantes se font par l'intermédiaire de protéines de signalisation qui varient au fil du développement.



**Figure 5 : Schéma de migration des cellules de la crête neurale [37].** Au cours de la neurulation, la plaque neurale s'invagine, forme un sillon, les bordures fusionnent pour donner le tube neural. Puis, les cellules de la crête neurale se détachent et débutent leur migration.

Ces cellules souches subissent des maturations et des différenciations successives pour donner des cellules myélinisantes matures. Les cellules souches de la crête neurale entrent en différenciation et donnent après 12 à 13 jours de vie embryonnaire (E) chez la souris (E14-15 chez le rat) des précurseurs de CS. A ce stade, les cellules nerveuses sont indispensables à la survie des précurseurs. Ces derniers migrent le long des neurones et se différencient ensuite, entre E13 et E15 (E15-E17 chez le rat), en CS embryonnaires. Elles dépendent des neurones pour poursuivre leur différenciation. À la naissance, et en fonction du diamètre de l'axone associé, les CS embryonnaires s'engagent dans deux voies de différenciation distinctes. Pour un diamètre axonal de 0,8 à 1  $\mu\text{m}$ , les CS embryonnaires s'orientent vers le phénotype myélinisant pour former une

gaine de myéline en passant par un stade intermédiaire de maturation, celui des CS prémyélinisantes. Pour un diamètre inférieur, les CS embryonnaires deviennent des CS non-myélinisantes dont les extensions cytoplasmiques entourent plusieurs axones de manière individuelle (les axones sont isolés les uns des autres) et forment les fibres de Remak. Les CS myélinisantes matures sont désormais autonomes pour leur survie cellulaire et cessent leur prolifération [38]. Les CS sont douées d'une forte plasticité. A la suite d'une lésion, les CS matures peuvent se dédifférencier jusqu'à un stade CS embryonnaires puis proliférer de nouveau (Figure 6).



**Figure 6 : Schéma du processus de maturation des cellules de Schwann [37].**

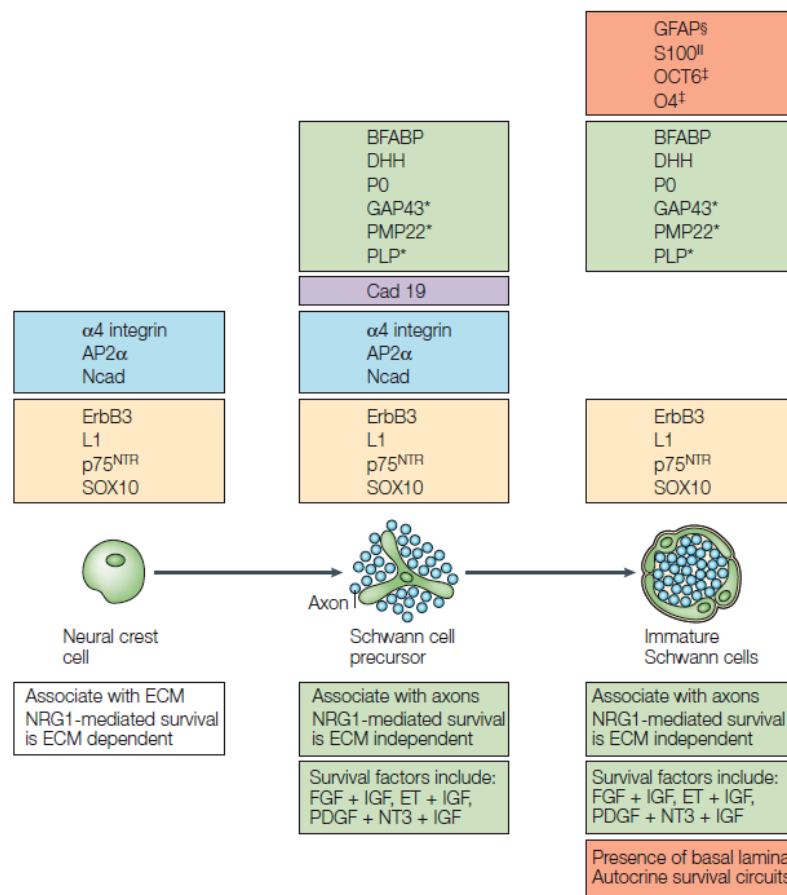
Le développement embryonnaire des CS comprend plusieurs stades : les cellules de la crête neurale, les précurseurs de CS et enfin les CS immatures. Le destin de ces cellules dépend du diamètre de l'axone à laquelle elles sont associées et de facteurs neuronaux. La différenciation est réversible lorsque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

## **3.2. Les marqueurs exprimés au cours de chaque stade du développement glial**

### **3-2-1 De la crête neurale aux CS embryonnaires**

Chaque stade du développement de la lignée schwannienne se caractérise par l'expression des marqueurs de différenciation [37] qui peuvent être regroupés en 5 catégories (Figure 7) :

- Les marqueurs dont l'expression est maintenue à chaque stade du développement de la glie, comme SRY (sex determining region Y) box 10 (SOX10).
- Les marqueurs exprimés transitoirement au cours des premiers stades. Ainsi, Activator Protein 2 $\alpha$  (AP2 $\alpha$ ) est exprimé dans les cellules de la crête neurale et les précurseurs des CS, mais inhibé dans les CS embryonnaires.
- Un gène exprimé uniquement par les précurseurs des CS, cadherin 19.



**Figure 7: Les marqueurs moléculaires exprimés au cours du développement de la lignée schwannienne jusqu'au stade CS embryonnaires [37].** Les encadrés du haut indiquent l'évolution de l'expression de différents facteurs. Ceux du bas, précisent les relations des cellules du lignage schwannien avec son environnement.

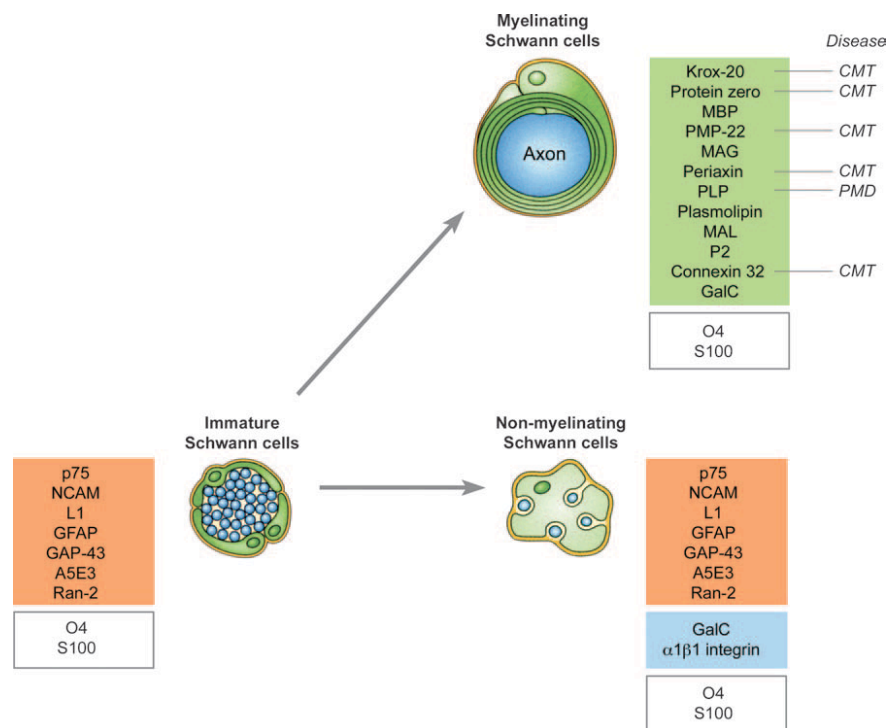
- Les marqueurs présents dans les précurseurs des CS et dans les CS embryonnaires, mais pas dans les cellules de la crête neurale, comme brain fatty acid-binding protein (BFABP), myelin protein zero (PO) mRNA et desert

hedgehog (DHH) [39]. Ces marqueurs marquent le passage du premier stade du lignage schwannien, qui voit les cellules de la crête neurale se différencier en précurseurs de CS.

- Les marqueurs spécifiques aux CS embryonnaires, comme la GFAP, S100 et GAO4 (glycolipid antigen O4).

### 3-2-2 Des CS embryonnaires aux CS matures

Durant la myélinisation, les protéines Krox-20, myelin-associated protein (MAG), periaxin, Protein zero (P0), myelin basic protein (MBP), peripheral myelin protein 22 (PMP22), plasmolipin and galactocerebroside (GalC) sont fortement exprimées par les CS matures myélinisantes.



**Figure 8 : Les marqueurs moléculaires exprimés au cours du passage des CS embryonnaires en CS matures [40].** L'encadré vert indique les marqueurs des CS myélinisantes, l'orange présente ceux des CS non myélinisantes, le bleu, les facteurs spécifiques aux CS non myélinisantes. Le passage du stade CS immature à CS myélinisante se fait grâce à un équilibre dans la régulation des facteurs.

Le passage au dernier stade de différenciation est aussi caractérisé par l'inhibition de l'expression des molécules exprimées au stade CS immatures, telles que L1, NCAM et le



récepteur des neurotrophines p75. Ces molécules demeurent cependant exprimées dans les CS matures non-myélinisantes. De plus, ces cellules expriment au moins deux molécules,  $\alpha 1\beta 1$  integrin et GalC, qui ne sont pas exprimées par les CS immatures (Figure 8).

### **3.3. Les facteurs contrôlant le développement de la lignée schwannienne**

L'engagement des CS dans un des stades de maturation du développement du lignage glial est une balance entre différents signaux. Il dépend essentiellement de facteurs de survie, de facteurs mitogènes et de signaux de différenciation provenant des axones. En effet, *in vivo*, les cellules souches multipotentes de la crête neurale sont à la fois à l'origine des cellules gliales mais aussi des neurones et des mélanocytes. A un stade plus avancé, les précurseurs des CS donnent naissance aux CS et aux fibroblastes. Enfin, les CS embryonnaires s'engagent dans deux voies de différenciation distinctes, pour générer les CS myélinisantes ou non-myélinisantes, selon le type d'axone avec lequel elles sont associées. Ainsi, à chaque stade du développement des CS, il existe une régulation fine, un équilibre délicat entre des voies de signalisation, des marqueurs moléculaires qui engagent ou non les cellules dans le processus de myélinisation.

#### **3.3.1. Le contrôle du développement de la glie à partir de la crête neurale**

Les facteurs et voies de signalisation impliqués dans le développement de la glie à partir des cellules de la crête neurale sont nombreux et bien recensés. Parmi ceux-ci, le facteur de transcription Sox10 est indispensable pour l'entrée des cellules de la crête neurale dans le lignage schwannien. La voie de la Neuréguline 1 (NRG1) est elle aussi déterminante au cours de la myélinisation et met en lumière l'importance de l'interaction avec l'axone et plus globalement la cellule nerveuse. Enfin, les voies Notch, BMP2/4 (Bone Morphogenetic Protein2/4), l'endothéline et le facteur de transcription AP2 $\alpha$  font aussi partie de ces facteurs nécessaires au cours du lignage glial (Figure 10).

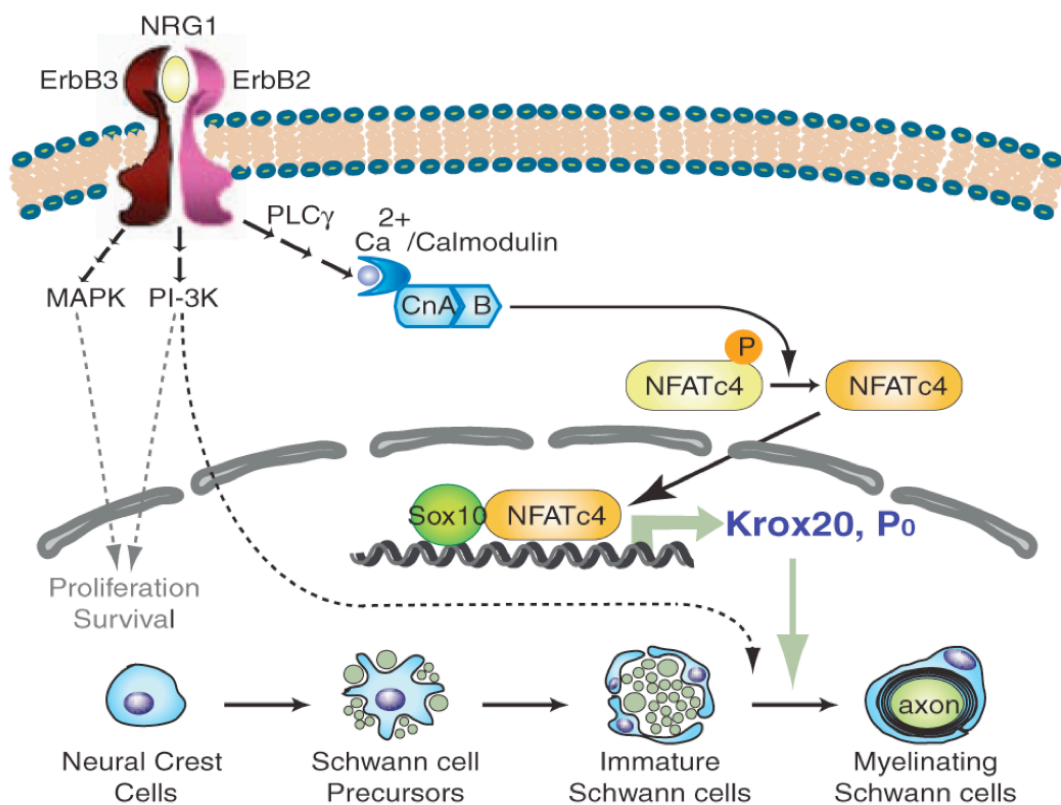
- Le facteur de transcription SRY (Sex determining Region Y) box 10 (Sox10) est indispensable pour le développement du lignage glial à partir des cellules souches de la crête neurale [41]. Son expression persiste tout au long du

développement de la lignée gliale aussi bien dans le système nerveux périphérique que central. A l'inverse, il est réprimé dans les cellules nerveuses. Son invalidation chez la souris conduit à l'absence de précurseurs de CS tandis que les neurones sont présents en quantité normale chez ces souris mutantes. Si l'invalidation se fait à des stades ultérieurs, l'absence des précurseurs de CS conduit à la dégénérescence sévère des neurones sensitifs et moteurs [42]. Par ailleurs, Sox10 contrôle l'expression de ErbB3 (v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3) dans les cellules de la crête neurale. Ce facteur code pour un récepteur aux neurégulines, elles aussi importantes en cours de myélinisation. Des expériences *in vitro* montrent aussi le rôle prépondérant de Sox10 dans l'initiation et le maintien du phénotype glial [43].

- La mise en place du SNP passe entre autres par l'établissement de contacts, de relations entre les cellules nerveuses et gliales. La survie, la migration et la différenciation des cellules gliales dépendent directement de l'interaction de ces cellules avec les neurones. Les signaux existants entre les deux populations cellulaires passent en partie par l'intermédiaire d'une famille de facteurs trophiques : les neurégulines (NRG) qui agissent comme la plupart des facteurs trophiques sur des récepteurs tyrosine-kinases de la famille erbB. Dès la phase de détermination, l'isoforme III de la NRG1 agit en induisant l'engagement des cellules progénitrices des crêtes neurales vers la lignée gliale, et ce processus peut être accéléré par FGF2 (fibroblast growth factor 2) [44]. Chez la souris, ces cellules progénitrices donnent naissance, à E15, à des précurseurs de CS qui dépendent de signaux axonaux pour survivre, proliférer et se différencier. Il se met alors en place une véritable interdépendance permettant d'adapter la population gliale à celle des neurones : seules les cellules en contact avec les neurones survivent. L'effet trophique des cellules de Schwann sur les neurones est mis en évidence par l'étude de souris mutantes «erbB2/3» chez lesquelles la mutation empêche l'engagement des cellules souches de la crête neurale dans la voie de différenciation des cellules de Schwann. Il en résulte d'abord une absence de précurseur schwannien le long des nerfs périphériques embryonnaires. Ensuite, l'absence de cellules gliales prive les neurones de leur soutien trophique, la majorité d'entre eux meurt et les survivants sont incapables de produire des

neurites innervant leurs organes cibles [45]. De plus, les NRG1 fournissent un nombre approprié de CS pour assurer le processus de myélinisation. Chez les souris invalidées pour l'isoforme III de la NRG1, les précurseurs de CS sont initialement formés, mais leur nombre diminue considérablement à E14, montrant le rôle essentiel de cette isoforme III dans la survie des précurseurs de CS *in vivo* [46]. Les effets de la NRG1 sont modulés par la sheddase TACE (ADAM17). Cette enzyme clive l'isoforme de type III et contrôle ainsi sa quantité et de fait, la myélinisation [47]. Une fois la myélinisation accomplie, la signalisation NRG-erbB est abolie pour n'être réactivée que lors de traumatismes nerveux pour assurer la régénération de la myéline [48].

Les deux facteurs Sox10 et NRG1 participent à une voie de signalisation commune en vue de développer le lignage schwannien et réguler les gènes de la myéline périphérique (Figure 9).



**Figure 9 : Effets synergiques de NFATc4 et Sox10 sur l'expression de Krox 20 et P0 [49].** Ce modèle de myélinisation nécessite la fixation de la NRG1 d'origine axonale sur son récepteur ErbB2/3. L'entrée de calcium active la calmoduline qui déphosphoryle NFATc4, permettant sa translocation au noyau. Il interagit alors avec Sox10 pour réguler l'expression de Krox20 et P0. Les flèches en pointillés sont des voies de signalisation précédemment déterminées.

La fixation de la NRG1 d'origine axonale sur ses récepteurs schwanniens ErbB2/3 entraîne une augmentation du calcium intracellulaire et par l'intermédiaire de la calmoduline, la déphosphorylation du facteur de transcription NFATc4 (Nuclear Factor of Activated T-cells c4). Ce dernier transloque ainsi au noyau où il forme un complexe protéique avec Sox10 pour activer Krox20 au cours de l'étape CS prémyélinisante. Les deux partenaires interagissent également au stade CS myélinisante pour réguler le gène P0 [49].

- La signalisation Notch, de la même façon que la voie NRG1, inhibe la différenciation neuronale et augmente le nombre de CS, en stimulant soit la transition des précurseurs de CS en CS soit la prolifération des CS [50]. En outre, Notch augmente la quantité de ErbB2, le récepteur de NRG1 favorisant ainsi la différenciation des précurseurs de CS.
- Les facteurs BMP2/4 inhibent, *in vitro*, la différenciation des cellules gliales à partir des cellules de la crête neurale [51].
- Les endothélines et le facteur de transcription AP2 $\alpha$  participent à la survie et à la progression du lignage glial. Des études *in vitro* montrent que les endothélines stimulent la survie des précurseurs de CS chez le rat, mais retardent le passage des précurseurs de CS en cellules de Schwann matures [52].

### 3.3.2. Le contrôle de la survie des CS embryonnaires

Au cours du développement postnatal, le nombre de cellules de Schwann est finement régulé afin d'établir une association individuelle et unique avec l'axone qu'elles entourent (appelée radial sorting) [53]. L'équilibre entre la prolifération et l'apoptose influence grandement ce phénomène. Dans un premier temps, l'apoptose est modulable par plusieurs mécanismes comme les facteurs de survie autocrines LIF (Leukemia Inhibitory Factors) [54], IGF-2, PDGF et neurotrophine-3 [55]. Dans un second temps, l'apoptose est réprimée par la neuréguline NRG-1 d'origine axonale. En effet, l'absence de contact entre les cellules nerveuses et la lignée schwannienne provoquent l'apoptose de ces dernières. Il a aussi été démontré que l'administration de NRG sauve de l'apoptose les CS ayant perdu le contact axonal pendant la période postnatale [56-58]. Les relations des cellules de la lignée gliale ne se limitent pas aux neurones. Dans son environnement, la lame basale contribue à la différenciation des CS. En effet, les souris

invalidées pour la laminine ou la  $\beta$ 1-intégrine présentent des défauts de myélinisation [59-62] (Figure 10).

Enfin, la dernière possibilité de réguler la survie cellulaire fait appel à un phénomène direct d'apoptose par l'intermédiaire du récepteur à la neurotrophine p75<sup>NTR</sup> (p75 neurotrophin receptor), qui agit par le biais du NGF [57, 63]. L'expression de la p75 est augmentée dans les CS après une axotomie du nerf périphérique [64]. La protéine est impliquée dans la mort de plusieurs types de cellules nerveuses comme les ganglions rétiniens et sensitifs [65, 66]. Il a été démontré *in vitro* que les CS ayant atteint le stade embryonnaire survivent sans contact axonal grâce à une stimulation autocrine multifactorielle par les NT3 (neurotrophin 3) et les IGFs (insulin-like growth factors). De plus, ces facteurs s'avèrent importants pour la migration des CS *in vitro* ; il est donc possible que ces signaux gouvernent les mouvements des CS, *in vivo*, pendant cette étape de différenciation des CS embryonnaires [67, 68]. Le signal de mort cellulaire implique aussi la protéine TGF $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ ) et son activité phosphorylase de la protéine c-Jun [63]. La voie p38 des MAPK joue aussi un rôle important, avant la myélinisation, dans l'association des CS aux axones [69].

En parallèle de l'apoptose, différents facteurs exercent des effets prolifératifs sur les CS. Des études *in vitro* montrent que les axones stimulent la prolifération des CS [70]. Des expériences de co-cultures utilisant des CS et des neurones de rat ou humains montrent que la NRG1 est un puissant agent mitogène d'origine axonale [71]. De plus, il a été montré que les facteurs de transcription Ets et la laminine stimulent la survie et la prolifération des CS [62], ainsi que les facteurs de transcription SOX2 et c-Jun, même si c-Jun est aussi impliqué dans la mort cellulaire. De façon contraire, l'ATP et l'adénosine inhibent la division des CS [72].

### **3.3.3. La régulation de la myélinisation**

La dernière étape de la différenciation des CS, le processus de myélinisation, ne fait pas exception aux autres stades de développement. Il est finement régulé par un ensemble de signaux plus ou moins à l'équilibre selon les conditions. Les facteurs promyélinisants sont exprimés au cours du développement à l'état physiologique. On recense entre autres, KROX20, OCT6 (Octamer-binding transcription factor 6), BRN2 (Brain 2 class III POU-domain protein) ou bien encore NRG1. Lors de la lésion d'un nerf ou de neuropathies, la balance de facteurs s'inverse afin d'entamer un processus de dé-

différenciation grâce à la grande plasticité dont font preuve les CS. Ces facteurs sont aussi importants au cours du développement physiologique, car ils contrôlent l'initiation de la myélinisation ainsi que sa vitesse (Figure 10).

Parmi les facteurs pro-myélinisants, le facteur de transcription KROX20 est essentiel. Dans le modèle de souris KROX20<sup>-/-</sup>, les CS entourent les axones, mais sont incapables de former la gaine de myéline, attestant son rôle fondamental dans le processus de myélinisation [73]. Par ailleurs, il est également impliqué dans la régulation de la myéline au stade adulte. L'inactivation de KROX20 dans les CS de souris adulte conduit à une démyélinisation, une dédifférenciation des CS, une augmentation de la prolifération suivie d'un blocage au stade promyélinisant [74]. De plus, il a été montré que KROX20 inhibe la prolifération des CS en culture suite au traitement par la NRG1 d'origine axonale et inhibe la mort des CS suite au traitement par TGFβ, deux situations caractéristiques des CS embryonnaires [75].

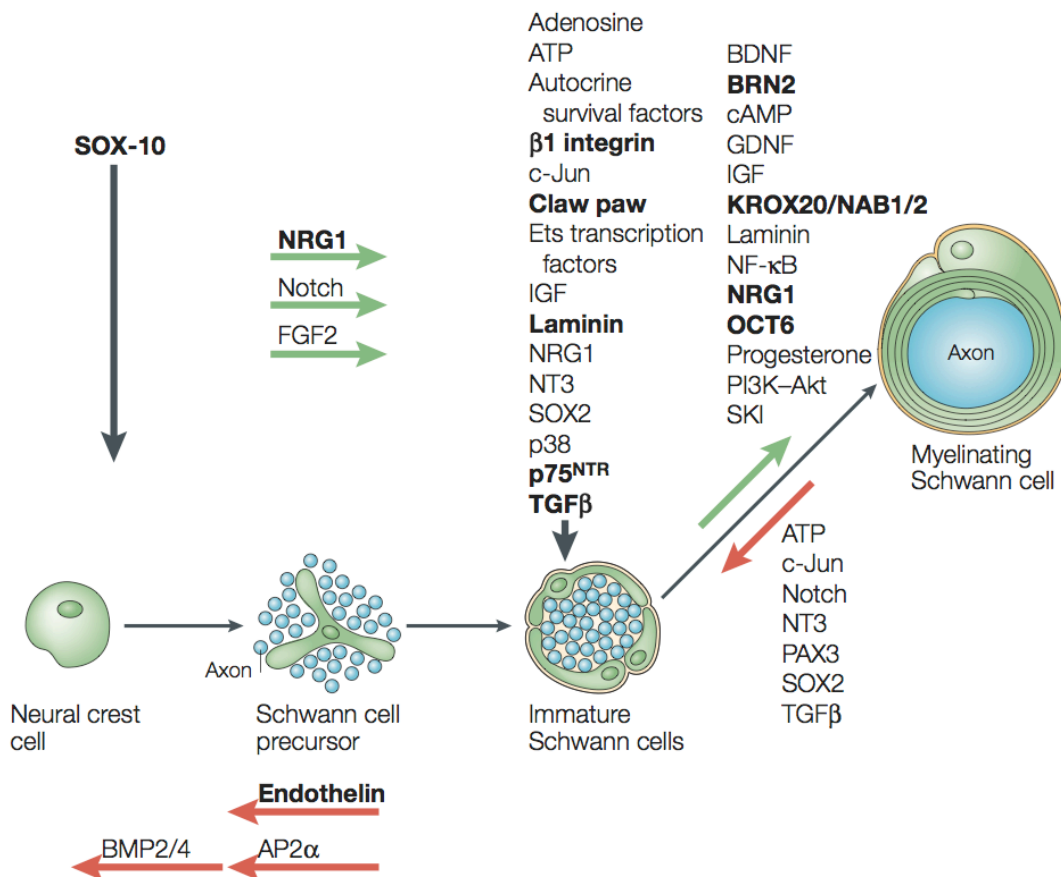


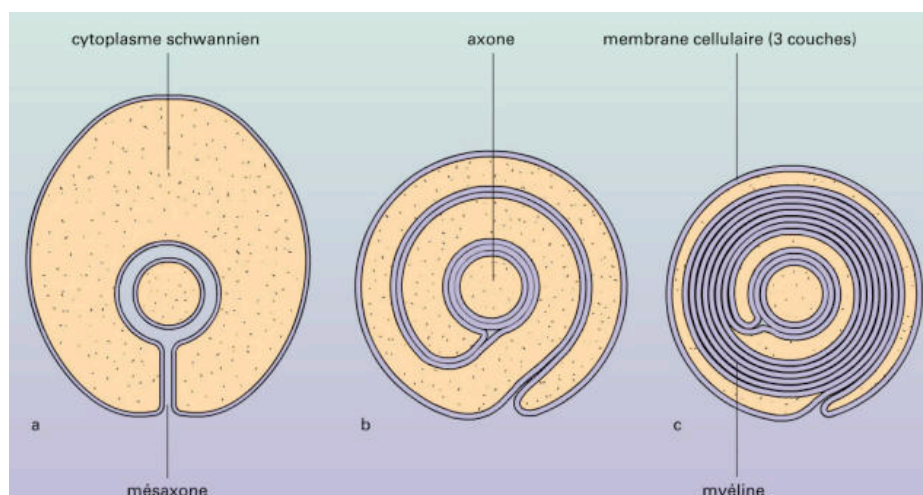
Figure 10 : Les facteurs contrôlant le développement des CS myélinisantes [37].

D'autres signaux tiennent un rôle important en vue du passage au dernier stade de développement. La neurogénine 1 tient encore un rôle prépondérant. Son isoforme de type III participe à la régulation de l'épaisseur de la gaine. La souris présentant une haploinsuffisance pour *Nrg1* possède une gaine plus fine que la souris sauvage [76]. Les facteurs de transcription OCT6 (Octamer-binding transcription factor 6) et BRN2 (Brain 2 class III POU-domain protein) possèdent des fonctions partiellement redondantes mais sont essentiels pour le bon déroulement de la myélinisation [77]. Des études *in vitro* montrent aussi que NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor- $\kappa$ B) contrôle l'expression de OCT6 ; il est donc probablement impliqué lui aussi dans l'initiation de la myélinisation [78].

De plus, NAB1/2 (NGFI-A-binding proteins 1 and 2), la voie PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) et le proto-oncogène SKI (v-ski sarcoma viral oncogène homologue) qui est un inhibiteur de la voie TGF $\beta$ , participent au développement et régulent la myélinisation [79, 80].

#### 4. Elaboration de la gaine de myéline par les cellules de Schwann

L'élaboration de la gaine de myéline par les CS nécessite l'invagination de l'axone dans une dépression de la cellule gliale. Une fois entouré, il ne subsiste qu'une fente reliée à la surface : le mésaxone [38].



**Figure 11 : Formation de la gaine de myéline [38].** La gaine de myéline se forme par enroulements successifs et le cytoplasme est progressivement éliminé.

La CS produit alors une quantité considérable de membranes qui s'enroulent autour de l'axone (>100 fois). Dans un premier temps, la CS est remplie de cytoplasme, puis, l'accolement des membranes élimine le cytoplasme intermédiaire et forme un complexe lipoprotéique, la gaine de myéline compacte (Figure 11).

Chez l'Homme, la myélinisation n'est pas complète à la naissance, son développement le plus intense se fait au cours du premier semestre postnatal. Elle se poursuit toutefois jusqu'à la puberté, voire au-delà à un rythme moins marqué. La myélinisation des faisceaux reliant le cerveau à la moelle (faisceaux cortico-spinaux) se poursuit jusqu'à la fin de la 2<sup>ème</sup> année postnatale. Chez la souris, la myélinisation se déroule durant les 21 premiers jours après la naissance.

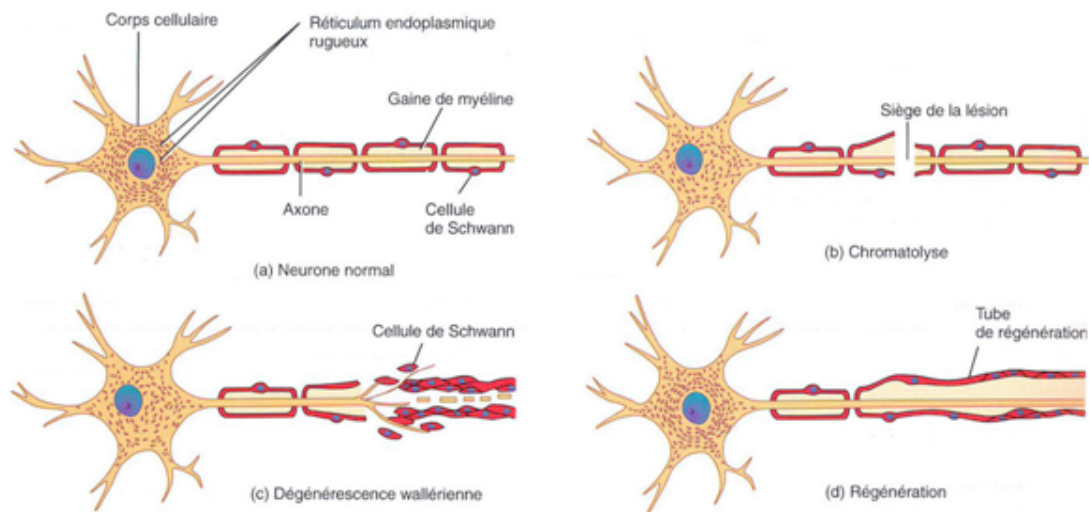
## **5. Démyélinisation à la suite d'une lésion nerveuse**

Lors d'un traumatisme (pincement, section, étirement) du nerf périphérique on observe un processus connu sous le nom de dégénérescence wallérienne (Figure 12).

La dégénérescence wallérienne est un phénomène qui suit une lésion du nerf et qui implique une dégénérescence axonale et une dégradation de la gaine de myéline. La démyélinisation des CS débute mécaniquement par une fragmentation de la gaine en de petites structures ovoïdes et, moléculairement, par une diminution de l'expression des gènes de la myéline [81]. La fragmentation de la gaine de myéline a lieu à proximité d'une structure appelée incision de Schmidt-Lantermann. Cette région présente un enroulement de myéline de moindre compaction avec des jonctions adhérentes atypiques. En parallèle, à proximité de la lésion, la fibre nerveuse bourgeonne pour former plusieurs cônes de croissance par axone. Les CS de la région distale survivent au traumatisme malgré la perte de contact avec l'axone sous-jacent [82].

Au cours de ce processus de démyélinisation, le cytosquelette de la cellule joue un rôle important. Les travaux de Fernandez-Valle ont montré le rôle joué par l'actine dans la forme prise par la cellule ainsi que l'expression des gènes de la myéline [83]. L'inhibition de la polymérisation d'actine filamenteuse par la cytochalasine D au niveau des incisions de Schmidt-Lantermann de nerfs sciatiques lésés provoque la dégradation des cadhérines de type E et empêche la formation des débris ovoïdes de myéline[84].





**Figure 12 : La dégénérescence Wallérienne et la repousse axonale [85].** L'axone et la gaine de myéline dégénèrent à proximité de la lésion. Puis l'axone bourgeonne, les CS se différencient, prolifèrent puis reforment une gaine de myéline compacte autour du nouvel axone.

C'est dans ce contexte lésionnel, que l'on observe l'importance du phénomène de plasticité des CS. De nombreuses équipes se sont penchées sur l'explication moléculaire de cette plasticité. Procède-t-elle d'une diminution des signaux promyélinisants ou bien nécessite-t-elle une activation de voies de signalisation spécifiques ? Les différentes étapes de différenciation sont réversibles. Ainsi, lorsque le contact entre la cellule de Schwann et le neurone est perdu, comme c'est le cas dans les lésions du nerf, les CS se différencient vers un phénotype proche de celui des CS embryonnaires, et retournent dans le cycle prolifératif. La synthèse des protéines de la myéline (PMP22, MAG, P0, MBP...) est arrêtée, la myéline est dégradée et ses débris sont d'abord phagocytés par les CS puis par les macrophages. Ces derniers sont recrutés à la lésion dans un délai de 48 heures. Les travaux de Walter au milieu du XIX<sup>ème</sup> siècle ont posé les bases de la compréhension de l'enchaînement de ces événements.

Une fois dénervées et différenciées, les CS entrent dans un cycle de prolifération pour favoriser la réparation du nerf lésé. Cet événement se déroule grâce à la stimulation des débris axonaux et myéliniques ainsi que des facteurs sécrétés par les macrophages. Les CS acquièrent un phénotype proche de celui des cellules non-myélinisantes et immatures en activant la synthèse de diverses protéines dont des facteurs de croissance et leurs récepteurs (GDNF, NRG1, BDNF, IGFs, progestérone...),

des protéines d'adhésion (NgCAM , L1, N-cadhérine) et des protéines de la lame basale (la laminine, fibronectine, collagènes, protéoglycanes...) [86-88].

Toutes ces modifications concourent à produire un environnement propice à stimuler la neuritogenèse post-lésionnelle, mais aussi à garantir la survie des CS. Les CS terminent leur processus de redifférenciation une fois la repousse axonale achevée en resynthétisant la gaine de myéline compacte.

La dédifférenciation qui se produit dépend de voies de signalisation qui s'opposent à l'effet pro-myélinisant des voies telles que KROX20, AMP cyclique et NRG1. La plupart des voies de signalisation qui régulent négativement le processus de myélinisation, sont activées au stade CS embryonnaires, et leur activité cesse au cours de la myélinisation.

Par exemple, le facteur de transcription c-Jun, un des effecteurs de la voie de signalisation JNK (c-Jun-amino (N)-terminal kinase), est activé dans les CS embryonnaires d'E18 jusqu'à la naissance, alors qu'il est désactivé dans les CS qui commencent à myéliniser. En effet, si la voie JNK reste active, il en résulte l'arrêt de la myélinisation et l'inhibition de l'expression des gènes de la myéline qui est normalement induite par des signaux pro-myélinisants comme KROX20 ou l'élévation de la quantité d'AMP cyclique [89].

De même, la voie Notch, qui stimule la prolifération des CS embryonnaires, est désactivée par KROX20 quand les CS commencent à myéliniser. Elle est réactivée uniquement en cas de lésion du nerf chez l'adulte pour stimuler la dédifférenciation des CS myélinisantes en CS embryonnaires. La démyélinisation et la dédifférenciation des cellules de Schwann sont contrôlées par l'activation d'un groupe de facteurs de transcription comprenant entre autres c-Jun, Sox-2, Pax-3 et Id2 [81, 90]. Ces facteurs sont exprimés au cours de la prolifération cellulaire puis selon un système de balance, inhibés dans les cellules myélinisantes. De plus, il a été montré que l'ATP, NT3 et TGFβ retardent la myélinisation [72, 91, 92].

Le processus de remyélinisation dans le SNC est bien moins connu. Les facteurs intervenants ne sont pas tous identifiés et la cinétique d'action de ces facteurs semble beaucoup influencer leur potentiel promyélinisant [93]. Il apparaît que les astrocytes sont impliqués dans le processus de remyélinisation [94]. De plus, bien que les astrocytes activés soient souvent associés aux processus neurodégénératifs (notamment via la sécrétion de facteurs inhibant la repousse axonale, comme la protéine MAG et le marqueur de surface Nogo [95]), Liberto *et al.* ont démontré que ces astrocytes activés pouvaient créer un environnement permissif pour la réparation neuronale (en

produisant des substrats énergétiques et des facteurs pour les neurones et les oligodendrocytes, en chélatant les excès de glutamate et de radicaux libres et en restaurant la barrière hématoencéphalique entre autres [96]).

## **6. Les pathologies du système nerveux périphérique**

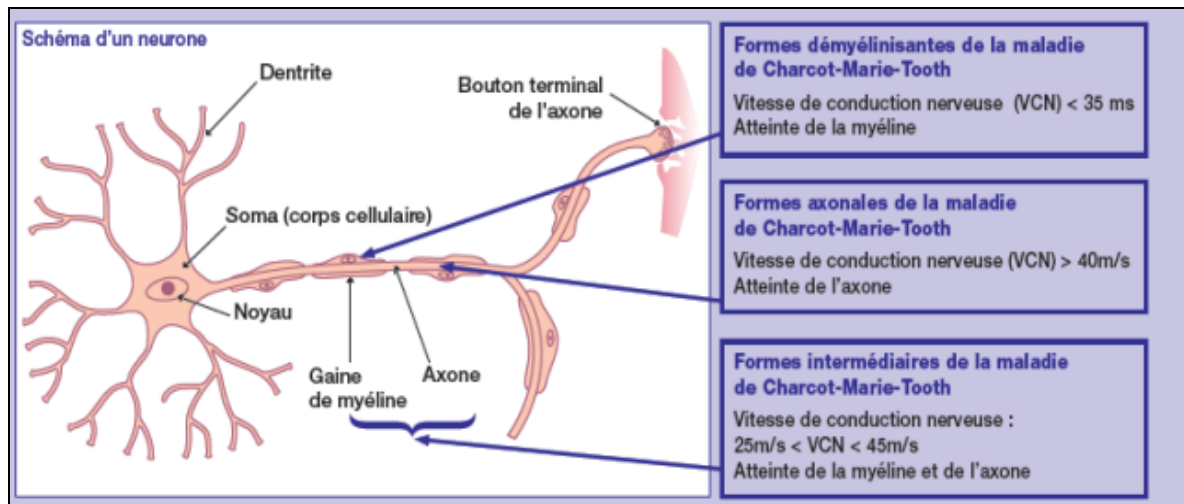
### **6.1. La maladie de Charcot-Marie-Tooth**

La maladie de Charcot-Marie-Tooth (CMT) aussi connue sous le nom d'Hereditary Sensory and Motor Neuropathy (HSMN) a été décrite par trois cliniciens en 1886, les français Charcot et Marie ainsi que l'anglais Tooth. Elle comprend plusieurs groupes de troubles génétiquement et cliniquement hétérogènes caractérisés par une atteinte des nerfs périphériques, une atrophie musculaire, une faiblesse et une perte de sensibilité des membres. La maladie héréditaire de Charcot-Marie-Tooth est la plus fréquente parmi les pathologies du système nerveux périphérique. Sa prévalence est de 1/2500 et elle touche indifféremment les deux sexes.

#### **6.1.1 Classification**

Le mode de transmission, le phénotype et la sévérité des différents types de CMT sont variables. En effet, les différentes formes sont classées selon la nature de l'atteinte du nerf ou le mode de transmission génétique ainsi que selon les anomalies génétiques en cause et les protéines déficitaires :

- la nature de l'atteinte du nerf (Figure 13) :
  - formes axonales (vitesse de conduction nerveuse > 40 m/sec) ;
  - formes démyélinisantes (vitesse de conduction nerveuse < 35 m/sec) ;
  - formes intermédiaires mixtes (vitesse de conduction nerveuse intermédiaire entre 25 m/sec et 45 m/sec).



**Figure 13 : Etiologie des différentes formes de la maladie de Charcot-Marie-Tooth (d'après Odile Dubourg, 2009).**

- le mode de transmission génétique ainsi que les anomalies génétiques en cause et les protéines déficitaires [97]:
  - Pour les formes autosomiques dominantes, la maladie de Charcot-Marie-Tooth de type 1 (CMT1) correspond à la forme démyélinisante et la maladie de type 2 (CMT2) à la forme axonale. Par la suite, la nomenclature associe une lettre qui correspond au gène ou locus identifié. Ainsi, la CMT1A correspond à la forme autosomique dominante, démyélinisante, liée au gène PMP22, tandis que la CMT1B correspond à la forme autosomique dominante, démyélinisante, liée au gène MPZ.
  - Pour les formes autosomiques récessives, la maladie de type 4 (CMT4) correspond à la forme démyélinisante et la maladie autosomique récessive de type AR-CMT à la forme axonale.
  - Les formes dominantes liées au chromosome X (CMTX) et les formes intermédiaires (DI-CMT).

Nous nous limiterons à l'étude de la forme la plus répandue de neuropathie démyélinisante de transmission autosomique dominante, la CMT1.

Type	Gene	Specific phenotype
Autosomal dominant CMT1 (AD CMT1)		
CMT1A	<i>Dup 17p (PMP22)</i> <i>PMP22</i> (point mutation)	Classic CMT1 Classic CMT1/DSD/CHN
CMT1B	<i>MPZ</i>	CMT1/DSD/CHN/CMT2
CMT1C	<i>LITAF</i>	Classic CMT1
CMT1D	<i>EGR2</i>	Classic CMT1/DSD/CHN
CMT1F	<i>NEFL</i>	CMT2 but can have slow MCVs in CMT1 range +/- early-onset severe disease
Hereditary neuropathy with liability to pressure palsies (HNPPs)		
HNPP	<i>Del 17p (PMP22)</i> <i>PMP22</i> (point mutation)	Typical HNPP Typical HNPP
Autosomal recessive CMT1 (AR CMT1/CMT4)		
CMT4A	<i>GDAP1</i>	CMT1 or CMT2 usually early-onset and severe/vocal cord and diaphragm paralysis described/rare AD CMT2 families described
CMT4B1	<i>MTMR2</i>	Severe CMT1/facial/bulbar/focally folded myelin
CMT4B2	<i>MTMR13</i>	Severe CMT1/glaucoma/focally folded myelin
CMT4C	<i>SH3TC2</i>	Severe CMT1/scoliosis/cytoplasmic expansions
CMT4D (HMSNL)	<i>NDRG1</i>	Severe CMT1/gypsy/deafness/tongue atrophy
CMT4E	<i>EGR2</i>	CMT1/DSD/CHN phenotype
CMT4F	<i>PRX</i>	CMT1/more sensory/focally folded myelin
CMT4G (HMSN Russe)	<i>HK1</i>	Severe early-onset CMT1
CMT4H	<i>FGD4</i>	CMT1
CMT4J	<i>FIG4</i>	CMT1/predominantly motor/progressive
CCFDN	<i>CTDP1</i>	CMT1/gypsy/cataracts/dysmorphic features
AR CMT1	<i>PMP22</i> (point mutation)	Classic CMT1/DSD/CHN
AR CMT1	<i>MPZ</i>	CMT1/DSD/CHN/CMT2
Autosomal dominant CMT2 (AD CMT2)		
CMT2A1	<i>KIF1Bβ</i>	Classic CMT2
CMT2A2	<i>MFN2</i>	CMT2/more progressive/optic atrophy
CMT2B	<i>RAB7</i>	CMT2 with predominant sensory involvement and sensory complications (similar phenotype to HSN1 secondary to SPTLC1 mutation)
CMT2C	<i>TRPV4</i>	CMT2 with vocal cord and respiratory involvement/congenital distal SMA/scapulo-peroneal syndrome
CMT2D	<i>GARS</i>	CMT2 with predominant hand wasting/weakness or dHMN-V
CMT2E	<i>NEFL</i>	CMT2 but can have slow MCVs in CMT1 range +/- early-onset severe disease
CMT2F	<i>HSPB1</i>	Classic CMT2 or dHMN-II
CMT2I	<i>MPZ</i>	Classic CMT2
CMT2J	<i>MPZ</i>	CMT2 with hearing loss and pupillary abnormalities
CMT2K	<i>GDAP1</i>	Late-onset CMT2
CMT2L	<i>HSPB8</i>	Classic CMT2 or dHMN-II
CMT2N	<i>AARS</i>	Classic CMT2
Autosomal recessive CMT2 (AR CMT2)		
CMT2B1	<i>LMNA</i>	CMT2 proximal involvement and rapid progression described/also causes muscular dystrophy/cardiomyopathy/lipodystrophy
CMT2B2	<i>MED25</i>	Classic CMT2
CMT2H	<i>GDAP1</i>	CMT2/pyramidal features
X-linked CMT		
CMT 1X	<i>GJB1</i>	Males CMT1 (+/- patchy MCVs)/females CMT2
CMTX5	<i>PRPS1</i>	CMT2 and early-onset deafness/optic neuropathy
Dominant intermediate CMT (DI-CMT)		
DI-CMTB (CMT2M)	<i>DNM2</i>	Classic CMT
DI-CMTC	<i>YARS</i>	Classic CMT

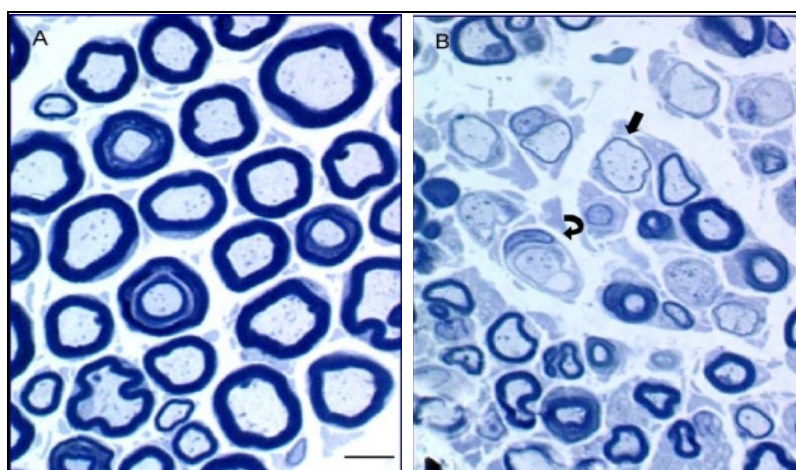
**Tableau 1 : Classification des maladies de Charcot-Marie-Tooth [97].**

### 6.1.2 La maladie de Charcot-Marie-Tooth de type 1

La neuropathie démyélinisante CMT1 est une atteinte du nerf périphérique, et de façon prépondérante, de la gaine de myéline qui entoure le nerf. Elle est d'origine génétique et se transmet sur le mode autosomique dominant.

On distingue quatre formes de CMT1 :

- la CMT1A, la plus fréquente (près de 70% des cas), est associée à une duplication d'une séquence de 1,5 Mb sur le chromosome 17 en position 17p11.2±12, entraînant la présence d'une copie supplémentaire du gène PMP22 [98]. Cette duplication entraîne une neuropathie périphérique qui se manifeste généralement avant l'âge de 20 ans et produit des faiblesses musculaires distales. Histo-pathologiquement, cette neuropathie est caractérisée par une hypermyélinisation [99], suivie d'une démyélinisation, une perte des fibres nerveuses myélinisées et une hypertrophie concentrique des cellules de Schwann ("bulbe d'oignon", signe d'une répétition de cycles de démyélinisation et de remyélinisation) (Figure 14).



**Figure 14 : Coupes semi-fines de nerf sciatique coloré au bleu de toluidine [100].** (A) Rat sauvage. (B) Rat transgénique CMT1A. On observe la présence de plusieurs fibres nerveuses entourées par une gaine de myéline très fine (flèche) et une hypertrophie concentrique des CS en forme de bulbe d'oignon (flèche courbée). Barre = 2.5 µm.

- la CMT1B représente moins de 10% des CMT1 et se caractérise par des anomalies du gène MPZ qui est sur le chromosome 1 en position 1q22.

- la CMT1C présente des anomalies de la région 16p13.1-p12.3 (gène LITAF).
- la CMT1D, forme représentant moins de 1% des CMT1 non A et non B.

### 6.1.3 Symptômes

En règle générale, ces maladies débutent avant l'âge de 20 ans. Les premiers symptômes peuvent apparaître avant l'âge de 10 ans pour 50% des CMT1A. À l'opposé, certains patients CMT1A (porteurs de la mutation) restent asymptomatiques sur le plan clinique. Les premiers signes sont le plus souvent des troubles de la marche (retard à l'acquisition de la marche, chutes, déficit des muscles releveurs des pieds qui entraînent un *steppage* - impossibilité de relever la pointe du pied qui oblige à soulever le pied à chaque pas comme si on montait un escalier 'step') et des déformations des pieds (pieds creux) (Figure 15). Ils sont dus à une faiblesse musculaire distale, c'est-à-dire des extrémités des membres et une atrophie progressive, plus marquée aux jambes (atrophie musculaire péronière). Fatigabilité, troubles de l'équilibre et pénibilité de la station debout ou à la montée des escaliers sont des symptômes fréquents. L'atteinte des mains est en général tardive, n'apparaissant qu'après plusieurs années d'évolution. Les fonctions vitales (dont le système cardiovasculaire) et intellectuelles ne sont généralement pas atteintes. Les patients présentent aussi des troubles sensitifs qui peuvent entraîner des douleurs.

Dans certaines formes, d'autres symptômes peuvent être présents : atteinte respiratoire, atteinte des cordes vocales, surdité et ulcères aux pieds.



**Figure 15 : Atrophies musculaires fibulaires et déformations des pieds chez des patients atteints de CMT1A [101].** Les panneaux (A) et (B) présentent la perte musculaire des mollets et de la partie inférieure de la cuisse. Les panneaux (C) et (D) illustrent des déformations des pieds de sévérités différentes.

#### 6.1.4 Evolution de la maladie

L'évolution reste extrêmement variable entre les différents types de CMT, y compris au sein d'une même famille : certaines personnes présentent peu ou pas de symptômes alors que d'autres ont un handicap fonctionnel important. L'évolution est en général lente et progressive, mais elle peut aussi se faire par poussées (notamment à l'adolescence).

Les formes sévères sont rares. En règle générale, la gêne fonctionnelle est modérée et la marche reste le plus souvent possible. La longévité n'est pas affectée et il est possible de conserver une activité socio-professionnelle normale ou quasi-normale dans



la plupart des cas. La forme CMT1B peut cependant conduire à un handicap sévère chez certaines personnes, entre 20 et 40 ans.

Des études réalisées sur des patientes atteintes de CMT1A ont montré qu'il n'y a pas d'augmentation de la fréquence des complications obstétricales durant la grossesse ou l'accouchement. S'il y a une aggravation de la maladie au cours de la grossesse (ce qui arrive parfois dans les formes qui ont débuté tôt), celle-ci est transitoire.

### **6.1.5 Pistes thérapeutiques**

A l'heure actuelle, il n'existe pas de traitement médicamenteux efficace contre la CMT et les moyens de luttés se portent sur l'activité physique et les interventions chirurgicales contre des problèmes osseux. Plusieurs essais ont été réalisés en vue de soigner la CMT ou du moins d'atténuer ses symptômes. Ainsi, l'antagoniste de la progestérone, l'onapristone se trouve être efficace dans le modèle de rat CMT1A [35]. Il diminue la surexpression du gène PMP22, tout en améliorant la masse et la force musculaire de ces rats. Cette amélioration des fonctions motrices peut être expliquée par une diminution de la perte axonale [102]. Cependant, les antagonistes de la progestérone disponibles pour le moment, sont trop toxiques pour être administrés sans risque aux patients. Le traitement de souris CMT1A par de l'acide ascorbique améliore les symptômes cliniques et neuropathologiques probablement en inhibant la PMP22 par un mécanisme médié par l'AMPc [103]. Plusieurs essais cliniques randomisés ont débuté dans différents pays (Australie, Hollande, Etats-Unis d'Amérique, Italie, Royaume-Uni et France) impliquant 280 patients atteints de CMT1A dont 190 reçoivent le traitement actif. Trois essais d'une durée d'un an ont été publiés [104-106]. Toutefois, aucun d'eux ne démontre d'effet bénéfique de l'acide ascorbique.

Les pistes thérapeutiques dans la maladie de Charcot-Marie-Tooth 1A consistent à agir au niveau des différentes étapes de la maladie : diminuer l'expression de PMP22, limiter l'accumulation anormale et toxique de la protéine PMP22 dans les cellules de Schwann et empêcher la dégénérescence des nerfs périphériques.

De plus, des équipes de recherche se penchent depuis quelques années sur les effets favorables possibles d'une substance naturelle, la curcumine, sur les maladies génétiques rares. La curcumine est l'une des composantes du curry indien et est déjà largement utilisée dans les médecines traditionnelles en Inde et en Chine. L'équipe de Nakagawa vient de démontrer que des suppléments en curcumine administrés à des

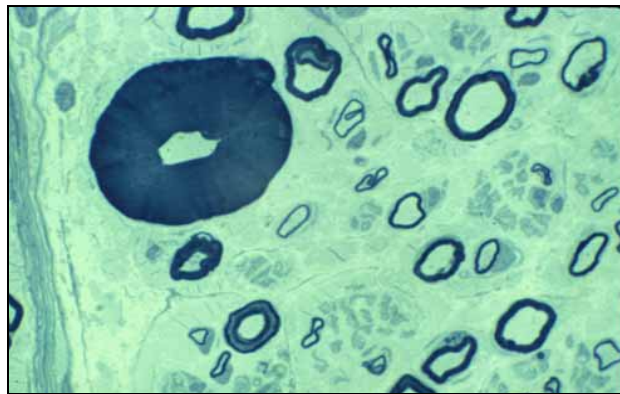
souris atteintes de maladies neurologiques proches de cette neuropathie héréditaire humaine entraînent une diminution des lésions des nerfs visibles au microscope [107]. D'un point de vue fonctionnel, ce traitement s'est traduit par une amélioration des possibilités motrices chez ces animaux. En raison de l'absence de toxicité liée à la curcumine, des essais pourront être débutés chez l'homme dans les prochaines années [107].

L'accumulation de la protéine PMP22 entraîne ainsi une dégénérescence des axones périphériques des membres et une diminution du nombre de CS. La régénération des nerfs implique des interactions complexes entre les axones, les CS et la matrice extracellulaire. Une absence prolongée de contact entre les axones et les CS, conduit à une diminution progressive du nombre de ces dernières et à une perte de l'aptitude à la régénération. Il a été montré que les CS peuvent cependant survivre en l'absence d'axone grâce à la sécrétion de divers facteurs de croissance dont fait partie la Neurotrophine-3 (NT-3). Des chercheurs ont testé l'efficacité d'un traitement par la NT-3 sur deux modèles murins de la CMT1A [108]. Après une période de huit à douze semaines, ce traitement a permis d'améliorer de façon significative la régénération axonale et les processus de myélinisation associés dans les deux modèles. A la suite de ces résultats encourageants, les auteurs ont conduit un essai clinique NT-3/placebo randomisé en double-aveugle pour évaluer l'efficacité d'une administration sous-cutanée de la NT-3 chez huit patients atteints de CMT1A. Après six mois de traitement, des améliorations significatives ont été notées chez les patients ayant reçu la NT-3, au niveau de la régénération des fibres myélinisées dans le nerf sural. Les dernières études tentent de remédier à la durée de vie relativement courte de la NT-3 en utilisant des anticorps agonistes circulants dirigés contre ses récepteurs. Le modèle murin Trembler qui présente une mutation de la PMP22 périphérique voit ses capacités de force musculaire et de remyélinisation grandement améliorées [109].

## **6-2 Fragilité héréditaire des nerfs périphériques à la pression**

L'HNPP (Hereditary Neuropathy with liability to Pressure Palsies) est une neuropathie aussi appelée "fragilité héréditaire des nerfs périphériques à la pression" ou "neuropathie tomaculaire". C'est une neuropathie sensitivomotrice héréditaire, à

transmission autosomique dominante, caractérisée par la survenue d'accès transitoires et récidivants de paralysie dans le territoire bien défini d'un tronc nerveux. Ces accès sont souvent consécutifs à un traumatisme minime ou à une compression prolongée de la région. Cette neuropathie est due à un défaut de synthèse de la protéine PMP22. Ce défaut de synthèse est lui-même dû, dans près de 90% des cas, à une délétion de 1,5 Mb dans la région 17p11.2±12 incluant le gène PMP22 [110-112]. La région délétée est la même que celle qui est dupliquée dans la maladie de Charcot-Marie-Tooth de type 1A. Ce phénomène de duplication/délétion d'une séquence génomique identique est dû à un crossing-over inégal favorisé par la présence de part et d'autre de la région en cause de séquences partageant une forte homologie, appelées CMT1A-REP. Des mutations ponctuelles du gène PMP22 ont pu être mises en évidence dans de rares cas de HNPP. La biopsie nerveuse met en évidence des renflements focalisés de certains segments de la gaine de myéline (tomacules) (Figure 16). Le mécanisme de constitution des tomacules est considéré comme consécutif à une hypermyélinisation, en relation avec une anomalie de fonctionnement de la CS [113].



**Figure 16 : Coupe d'une biopsie nerveuse d'un patient atteint de HNPP [110].** Cette coupe de nerf marquée au bleu de Toluidine montre une zone d'épaississement de la myéline très important (tomacula) et des axones entourés ou non de myéline (x3400).

Le nombre de personnes souffrant d'HNPP n'est pas défini de manière précise. On estime actuellement que 2 à 5 personnes sur 100 000 sont atteintes, mais il reste possible que ce chiffre soit sous-évalué.

## II. Le cytosquelette

Le cytosquelette est un système cytoplasmique de fibres indispensables pour le maintien de l'architecture et la motilité cellulaire. Les trois types de fibres du cytosquelette (filaments d'actine, filaments intermédiaires et microtubules) sont des polymères faits de sous-unités protéiques assemblées par des liaisons non covalentes.

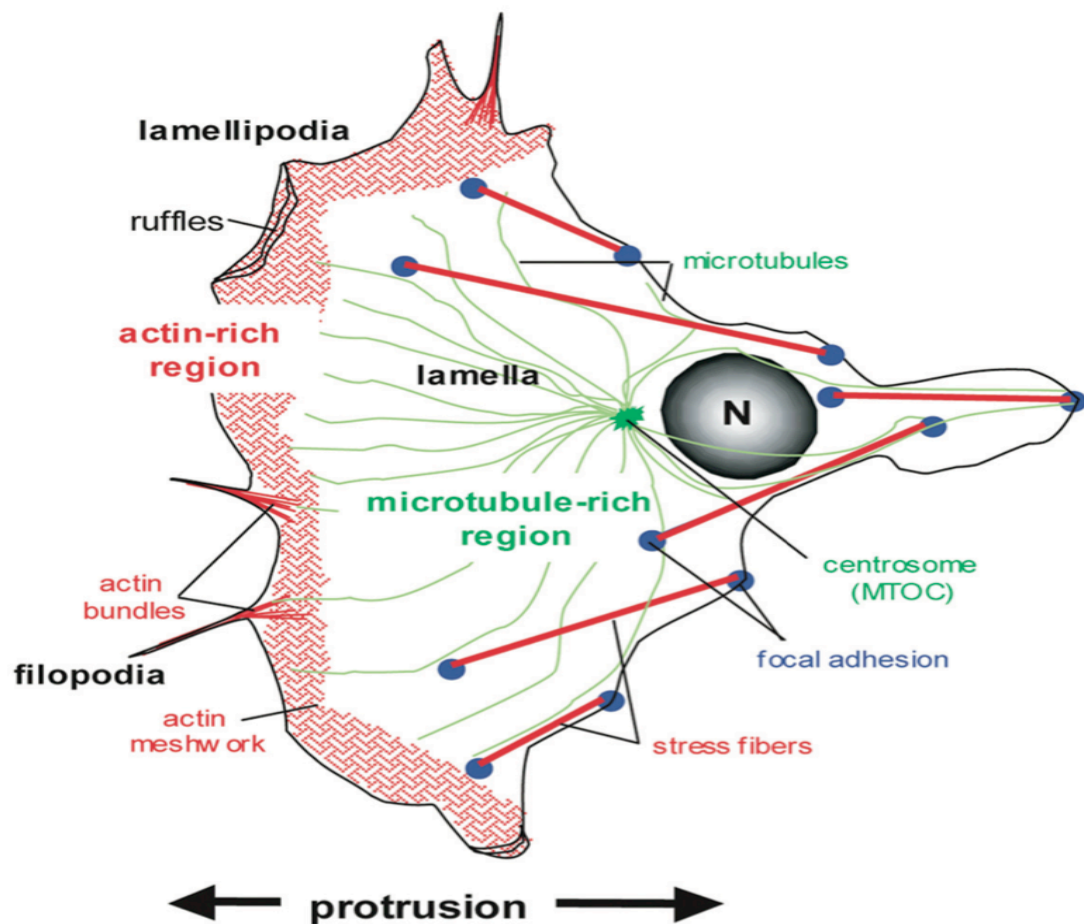


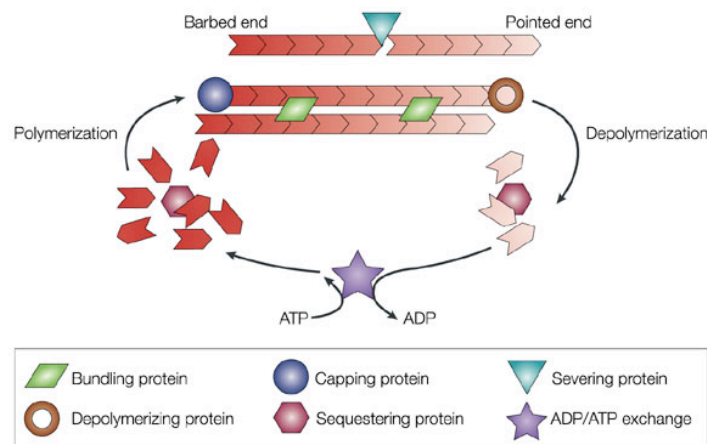
Figure 17 : Organisation du cytosquelette d'actine et de tubuline dans une cellule en cours de protrusion [114]. On distingue une région riche en actine (rouge) comprenant entre autres des faisceaux d'actine dense ou filopodes et une région riche en microtubules (vert) organisés autour du centrosome. La cellule adhère au substrat grâce à un réseau de fibres de stress (barres rouges) et de points d'adhésion focaux (points bleus).

# 1. L'actine

L'actine est la protéine intracellulaire la plus abondante dans la plupart des cellules eucaryotes. De taille modérée (poids moléculaire 42 kDa), l'actine est codée par une grande famille de gènes hautement conservés.

Les filaments d'actine, aussi appelés microfilaments ont un diamètre de 8 à 9 nm et une structure double brin hélicoïdal. L'actine existe comme un monomère globulaire appelé actine G et comme un polymère filamenteux appelé actine F. Il existe 3 types d'actines, l'actine  $\alpha$  présente dans les cellules musculaires, l'actine  $\beta$  et l'actine  $\gamma$  qui sont présentes dans les autres types cellulaires [115].

*In vitro*, l'actine polymérise en trois phases appelées nucléation, élongation et équilibre. Au cours de la première phase, des monomères d'ATP-actine G forment lentement des complexes stables. Ceux-ci s'allongent rapidement au cours d'une deuxième phase par apport de sous unités aux deux bouts du filament. Une fois incorporés, les monomères hydrolysent lentement l'ATP pour devenir des éléments stables d'ADP-actine F. Enfin, ces dernières se retrouvent dans un état plutôt stationnaire, d'ajout et de perte de monomère [116].



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

**Figure 18 : Structure et dynamique des filaments d'actine [117].** Les monomères d'actine sont polarisés et présentent une extrémité (+) ou "barbed" et une extrémité (-) ou "pointed". Ils s'associent pour former des polymères linéaires ou branchés. Ces polymères sont dynamiques, ils s'assemblent et se désassemblent en permanence. De nombreuses protéines s'associent à l'actine pour moduler ou guider cette dynamique.

Les microfilaments d'actine sont des structures polarisées avec une extrémité « plus » où la polymérisation de l'actine est rapide, et une extrémité « moins » où la polymérisation de l'actine est plus lente. Par convention, le bout auquel la fente de fixation de l'ATP de la sous unité terminale est exposé à la solution environnante est désigné par le signe (-). A l'autre extrémité, désignée par (+), la fente est en contact avec la sous unité voisine et n'est donc pas exposée. Les microfilaments subissent le phénomène de tapis roulant ou « treadmilling » (ajout de sous unité à une extrémité et perte de sous unité à l'autre extrémité) [118].

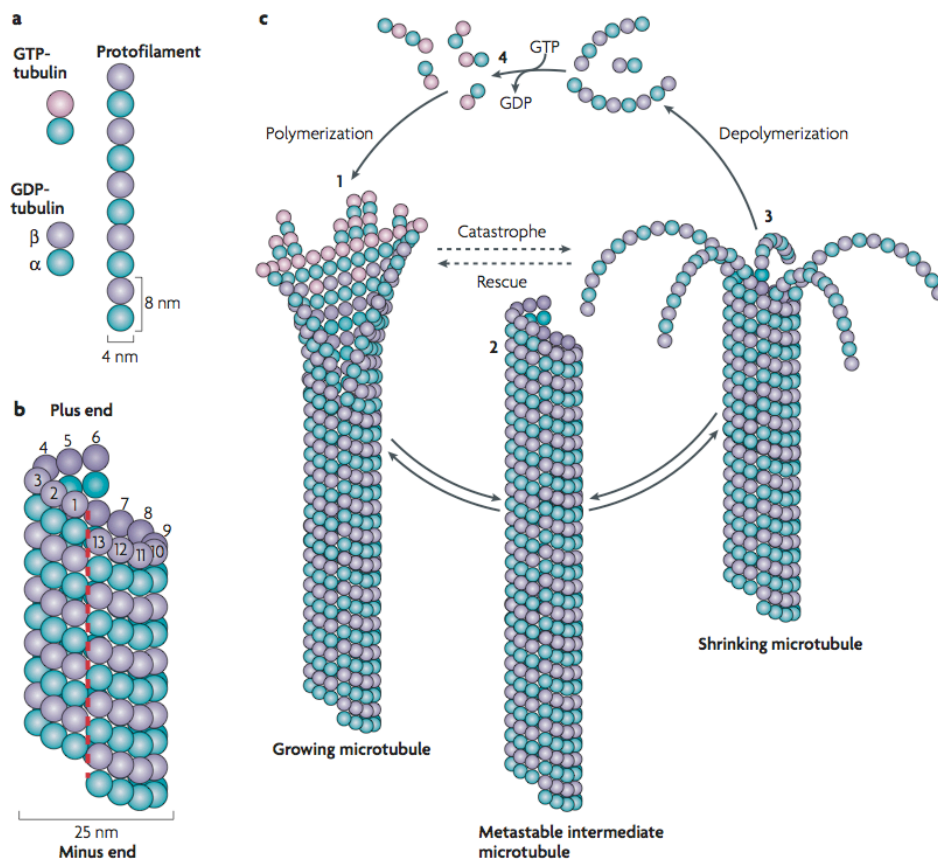
De nombreuses protéines sont associées aux microfilaments d'actine, permettant de réguler la polymérisation (profiline) ou la stabilité (CapZ). La polymérisation de l'actine permet la formation de diverses structures intracellulaires. Les fibroblastes et les cellules épithéliales en culture développent deux types de structures basées sur les filaments d'actine : un réseau branché, dans les protrusions membranaires (lamellipodes et filopodes), et des câbles, alignés parallèlement dans les fibres de stress. Si les protrusions semblent être générées dans un espace plutôt fluide et déformable de la cellule, les fibres de stress témoignent d'une contractilité élevée et sont le support de toute la traction que la cellule développe sur le substrat. Les premières sont stimulées par l'action de Rac alors que les secondes par celle de RhoA. Ces deux types de RhoGTPases s'inhibent mutuellement, les protrusions et les fibres de stress sont deux assemblages antagonistes et exclusifs [119, 120].

Parallèlement, les filaments d'actine forment une sorte de gel, réticulé par des moteurs, le long de la membrane plasmique dans laquelle il est ancré. L'ensemble forme ce que l'on appelle le cortex cellulaire. Cette coque d'actine sert d'ancrage et de stabilisation pour de nombreuses protéines près de la membrane.

## **2. Les microtubules**

Les microtubules sont des polymères non covalents du cytosquelette qui se retrouvent dans toutes les cellules eucaryotes. Ils sont impliqués au cours des processus de mitose, de migration, de transport intracellulaire, de sécrétion, de maintien de l'architecture de la cellule ou bien encore de la polarisation.

Les sous-unités de tubuline sont des structures polarisées, composées d'hétérodimères de tubuline  $\alpha$  et de tubuline  $\beta$ . Les sous-unités se lient entre elles pour former d'abord un polymère linéaire, le protofilament. Les microtubules sont l'association cylindrique de 10 à 15 protofilaments (le plus souvent 13 protofilaments chez les mammifères). L'association des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  se fait selon le modèle de la tubuline  $\gamma$  [121] qui initie la polymérisation. Les taux d'association et de dissociation d'un dimère sont différents sur l'extrémité  $\alpha$  et l'extrémité  $\beta$ , en raison de l'hydrolyse du GTP lié à la tubuline  $\beta$ . Chaque microtubule comporte donc un bout (+) qui croît plus vite que le bout (-) car la vitesse d'association par rapport à celle de dissociation y est plus importante.



**Figure 19: Structure des microtubules et instabilité dynamique [122].** Les tubulines  $\alpha$  et  $\beta$  s'associent (partie a) pour former des protofilaments. L'association cylindrique de 13 protofilaments conduit à la formation à la structure de base du microtubule (partie b). L'ensemble subit alors des phases successives de polymérisations et dépolymérisations plus ou moins rapides (partie c).

Les périodes de croissance lente sont interrompues par des périodes de dépolymérisations rapides nommées catastrophes. La fréquence des catastrophes diffère à chaque extrémité du microtubule. Ce processus cyclique de croissance lente ponctuée de dépolymérisations rapides est appelé instabilité dynamique. Cette instabilité confère à ce réseau une grande adaptabilité en réponse à la variabilité des conditions géométriques dans lesquelles il se développe et lui permet de sonder efficacement l'espace intracellulaire [123].

Les taux de croissance et fréquences de catastrophe dans la cellule sont sous le contrôle de protéines associées spécifiquement aux bouts (+) ou (-). Parmi ces protéines, citons la famille des protéines EB (end-binding protein), CLASP (Cytoplasmic Linker Protein Associated Protein) ou bien encore APC. Ces protéines de bouts (+) ou (-) sont très étudiées aujourd'hui car elles régulent la dynamique du réseau de microtubules [124]. Les protéines de bouts (+) forment un manchon autour du microtubule permettant de recruter d'autres protéines participant à la croissance du microtubule, de limiter l'apparition de catastrophes et de s'accrocher avec d'autres protéines associées à l'actine ou à la membrane plasmique [125]. En influant sur la composition du manchon stabilisateur au bout (+), certaines protéines régulent la stabilité des microtubules et ainsi participent à la polarisation des cellules [126].

Ces stabilisations/déstabilisations sont influencées par la présence de la membrane cellulaire. Les microtubules s'assemblent régulièrement jusqu'à la membrane où ils rentrent dans une alternance de phase de croissance et de dépolymérisation [127]. Cette instabilité de croissance des microtubules n'a pas la même dynamique dans toutes les régions de la cellule. Certaines protéines vont ainsi stabiliser des microtubules à des endroits particuliers comme le front de migration d'une cellule [128-130]. Le réseau entier est donc lui-même polarisé en zones dynamiques et en zones plus stables. Ces différences de stabilité sont révélées par des modifications covalentes des monomères de tubuline constituant le microtubule. La tubuline  $\alpha$  ou  $\beta$ , une fois assemblée en microtubule peut être modifiée par des enzymes. Par exemple lorsque le dernier acide aminé est une tyrosine. Un microtubule jeune est riche en tubuline tyrosinée. La tubuline peut être détyrosinée et le dernier acide aminé est alors un acide glutamique, signe que le microtubule a été stabilisé. Ce processus de modification sélective de la tubuline participe à la polarisation du réseau de microtubules et à celle de la cellule [131, 132]. D'autres modifications post-traductionnelles de la tubuline participent à la



régulation de signaux, à la sélectivité du transport intra-cellulaire, et à la polarisation du réseau de microtubules [133].

## **2.1. Le centrosome, un centre organisateur du réseau de microtubules**

Le centre d'organisation des microtubules (MTOC) organise les microtubules cytosoliques en amorçant d'abord l'assemblage des microtubules, puis en participant à leur ancrage, à leur libération et enfin à leur orientation. Dans les cellules animales, le MTOC correspond au centrosome, un ensemble de protéines associées aux microtubules qui contient parfois une paire de centrioles. La conséquence morphologique de ce mécanisme de nucléation centralisée est la formation d'un réseau en aster, polarisé par les bouts (-) accrochés au centrosome et les bouts (+) dirigés vers la périphérie. Les microtubules poussent à partir d'un complexe nucléateur, le  $\gamma$ -TURC ( $\gamma$ -Tubulin Ring Complex). Ce matériel péricentriolaire est capable d'amorcer la polymérisation [134].

Les microtubules sont des rails pour le transport intracellulaire. Des moteurs moléculaires s'activent le long de ce réseau en transportant des molécules ou des vésicules. Certains moteurs se dirigent vers les bouts (+) comme la plupart des kinésines, d'autres comme les dynéines, se dirigent vers les bouts (-). L'association de ces déplacements orientés et de la structure en aster du réseau de microtubules permet une ségrégation de certaines protéines autour du centrosome et d'autres à la périphérie et donc l'organisation d'un tri.

Cette fonction est indispensable au maintien de la polarité cellulaire [135]. De plus la capacité de collecter des informations de toute la périphérie cellulaire en un point central et de renvoyer une réponse en périphérie confère au centrosome un rôle majeur dans l'intégration des signaux et la coordination de la réponse cellulaire. L'instabilité dynamique des microtubules offre à ce "système sensoriel et moteur" une grande adaptabilité spatiale et un temps de réponse bien supérieur à ce que permettrait un système basé sur la simple diffusion des signaux dans le cytoplasme.

## **2.2. Les protéines associées aux microtubules (MAPs)**

Ces protéines sont réparties en 2 grands groupes selon leur fonction :

- d'une part, les MAPs structurales ;

- d'autre part, les MAPs motrices.

Par ailleurs, il existe, à l'heure actuelle, d'autres MAPs en plus des deux grands groupes cités précédemment, comme les protéines liant les extrémités plus des microtubules ou + TIPs (+ end TrackIng Proteins).

### **2.2.1 Les MAPs structurales**

Les MAPs structurales regroupent principalement des MAPs de Type I (famille des MAP1) et II (Famille des MAP2/MAP4/Tau). Ces MAPs structurales sont responsables de la bonne conformation des microtubules regroupés en faisceau. Elles permettent la liaison de microtubules entre eux, entraînant un espacement correct des microtubules les uns par rapport aux autres. Chaque protéine de cette famille est synthétisée sous forme d'un précurseur polypeptidique qui est par la suite clivé, à proximité de l'extrémité C terminale, en une chaîne lourde et une chaîne légère.

Ces protéines se lient le long de microtubules par un domaine de liaison aux microtubules (MTBD pour MicroTubule Binding Domain) localisé du côté N terminal de la chaîne lourde de la protéine. En fait, ces MAPs stabilisent les microtubules en diminuant la fréquence des périodes de dépolymérisation massive et en augmentant celle de polymérisation. La phosphorylation induit une diminution de l'affinité des MAPs pour les microtubules. Elles se détachent donc et ne jouent plus leur rôle stabilisateur. Les microtubules sont alors moins « protégés » face au processus d'instabilité dynamique, ils peuvent être donc, plus facilement, dépolymérisés.

### **2.2.2 Les MAPs motrices**

Les MAPs structurales qui régulent le cytosquelette microtubulaire ne sont pas les seules à se lier à ce réseau. En effet, il existe aussi les MAPs motrices que sont la dynéine et la kinésine. Elles ont une activité motrice et se déplacent le long des microtubules qui constituent pour l'occasion de véritables rails d'acheminement. Ces déplacements moléculaires ne se font qu'en présence d'ATP à hydrolyser. [136, 137]. Ce rôle de convoyeur est fondamental dans le système nerveux et plus particulièrement au sein des axones. Les processus de transcription et de traduction ayant lieu dans le corps cellulaire, il est nécessaire d'acheminer l'ensemble de ces éléments à la totalité de la structure neuronale, des axones jusqu'aux terminaisons synaptiques [138].

Par ailleurs, les microtubules interviennent aussi auprès des partenaires privilégiés des neurones du SNP, les cellules de Schwann. Au sein de ces dernières, ils permettent

l'acheminement des transcrits codant pour la MBP et ainsi provoquer l'extension cytoplasmique nécessaire à la bonne formation de la gaine [139].

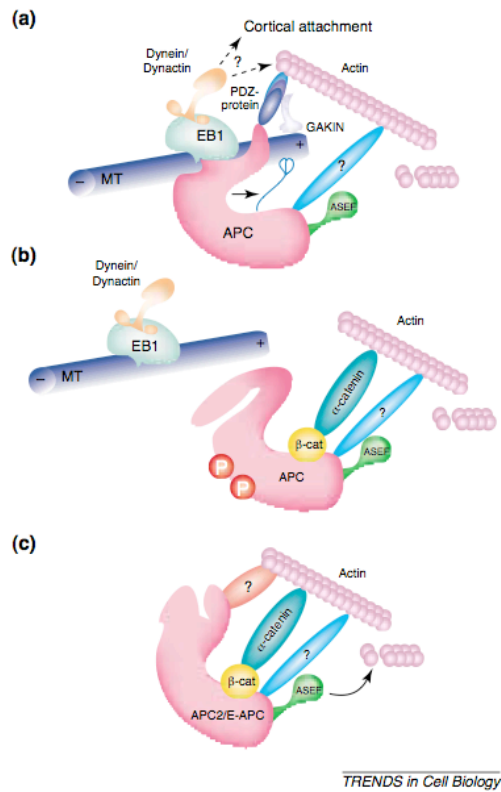
La kinésine se déplace vers l'extrémité plus des microtubules. Ce déplacement est appelé transport antérograde [140]. La dynéine se déplace elle vers l'extrémité moins des microtubules [141, 142] formant le transport rétrograde.

Les souris hétérozygotes pour la protéine KIF1B, une kinésine de la superfamille des protéines KIF responsable du transport mitochondrial, souffrent de perte progressive de force musculaire. Ce phénotype est à rapprocher de la neuropathie humaine Charcot-Marie-Tooth de type 2A. Après analyse génétique, il s'est avéré que l'haploinsuffisance de KIF1B était responsable de la maladie aussi bien chez l'Homme que chez la souris [143].

### **2.3. Interactions actine-microtubules**

Comment le réseau de microtubules et celui d'actine peuvent-ils se transmettre des informations ? Les monomères d'actine et de tubuline ne peuvent pas former de liaison directe. Nous avons vu que leurs dynamiques d'assemblage étaient interdépendantes car les deux réseaux sont impliqués dans des boucles d'interactions avec les RhoGTPases [114, 144]. Par ailleurs plusieurs protéines dont APC et EB1 sont capables de se fixer aux deux réseaux. Ces connecteurs peuvent s'associer plus particulièrement à certaines formes du réseau d'actine (fibres de stress ou protrusions) et à certaines parties des microtubules (bouts (+) et protéines associées, corps du microtubule).

La protéine APC, est clairement impliquée dans ce type d'interaction actine-microtubule [145].



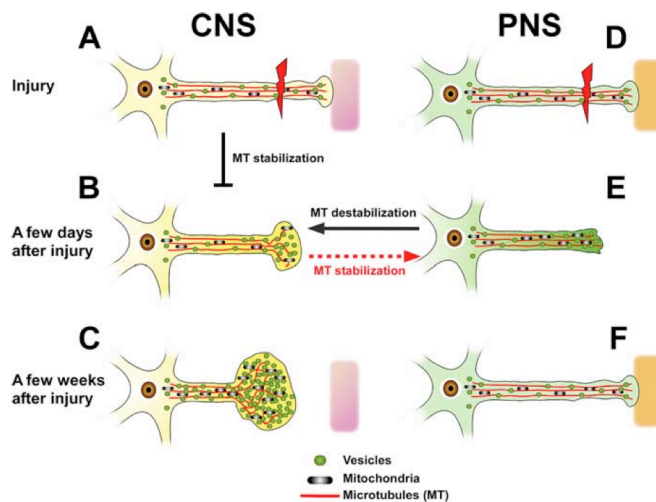
**Figure 20 : Modèle d'implication d'APC dans le cytosquelette [145].** (a) APC peut se lier directement ou par l'intermédiaire de EB1 aux microtubules et à l'actine par l'intermédiaire de ASEF. (b) La phosphorylation d'APC diminue son affinité pour les microtubules et augmente celle pour la  $\beta$ -catéline qui peut alors constituer un lien avec l'actine. (c) Les isoformes d'APC sans site de liaison aux microtubules peuvent s'associer indirectement à l'actine.

La protéine APC se lie au cytosquelette microtubulaire via son domaine C terminal. De plus, la protéine entière comme le domaine C terminal seul sont capables d'induire l'assemblage des microtubules [146, 147]. Plus précisément, APC se lie à l'extrémité (+) des microtubules et permet d'induire la formation de faisceaux [148, 149].

En outre, APC est capable de stabiliser les microtubules grâce à son interaction avec EB1, une protéine associée au bout (+) des microtubules [150]. En effet, en présence de nocodazole (substance dépolymérisante), des microtubules associés à APC dépolymérisent moins vite que des microtubules seuls [151]. Au sein du système nerveux, la protéine APC est préférentiellement localisée dans les neurones [152] où elle est retrouvée associée aux microtubules dans le cône de croissance ainsi que dans les neurites [153, 154].

## 2.4. Rôles des microtubules après une lésion dans le système nerveux central et périphérique

Récemment, les travaux de l'équipe de Bradke ont comparé les effets morphologiques et les réponses intracellulaires d'une lésion dans le SNC et dans le SNP [155]. Les axones du SNC ne repoussent pas après lésion et présentent à leur extrémité un bulbe de rétraction caractérisé par un réseau de microtubules désorganisés et instables. A l'inverse, les microtubules d'un axone post-lésionnel du SNP sont organisés en fuseaux stables formant un cône de croissance à l'extrémité. La désorganisation du réseau à l'aide de nocodazole entraîne la formation d'un bulbe de rétraction et stoppe la croissance axonale.



**Figure 21 : Rôles des microtubules après lésion dans le SNC et le SNP [155].** Les axones du SNC (A) et du SNP (D) subissent une section complète de l'axone. Après quelques jours, un bulbe de rétraction se forme dans le SNC (B) et demeure après plusieurs semaines (C) tandis que le cône de croissance dans le SNP (E) permet la reconnection avec le tissu cible (F).

Ainsi, la stabilité et l'organisation du réseau de microtubules apparaissent essentielles dans le devenir d'un axone lésé du SNC et du SNP. Les microtubules semblent donc jouer un rôle primordial au cours de la régénération axonale et pourraient constituer d'importantes cibles pour réguler ce phénomène.

### III. Les voies de signalisation Wnt

Les protéines Wnt (ou Wingless (Wg) chez la drosophile) appartiennent à une famille de glycoprotéines morphogènes secrétées. Leurs effets auto- et paracrines entraînent différentes cascades de signalisation (Figure 23 et Figure 24) qui contrôlent de multiples processus biologiques comme la prolifération, la différenciation, l'apoptose, la survie, la migration et la polarisation cellulaire. A ce jour, 19 membres de la famille Wnt ont été identifiés chez l'homme et la souris. Par ailleurs, dans l'espèce humaine, 11 protéines Frizzled différentes, les récepteurs des ligands Wnt, ont été répertoriées (Figure 22).

HUMAN		MOUSE		FLY	
Wnt	Fz	Wnt	Fz	Wnt	Fz
WNT1	FZD1	Wnt1	Fzd1	wg	Fz
WNT2	FZD2	Wnt2	Fzd2	DWnt2	Fz2
WNT2B/13	FZD3	Wnt2b/13	Fzd2-rs1	DWnt3/5	Fz3
WNT3	FZD4	Wnt3	Fzd2-rs2	DWnt4	Fz4
WNT3A	FZD5	Wnt3a	Fzd3	DWnt6	smo
WNT4	FZD6	Wnt4	Fzd4	WntD/DWnt8	
WNT5A	FZD7	Wnt5a	Fzd5	DWnt10	
WNT5B	FZD8	Wnt5b	Fzd6	<b>7 Total</b>	<b>5 Total</b>
WNT6	FZD9	Wnt6	Fzd7		
WNT7A	FZD10	Wnt7a	Fzd8		
WNT7B	SMOH	Wnt7b	Fz9		
WNT8A		Wnt8a	Fzd10		
WNT8B		Wnt8b	smo		
WNT9A		Wnt9a			
WNT9B		Wnt9b			
WNT10A		Wnt10a			
WNT10B		Wnt10b			
WNT11		Wnt11			
WNT16		Wnt16			
<b>19 Total</b>	<b>11 Total</b>	<b>19 Total</b>	<b>13 Total</b>		

WORM	
Wnt	Fz
Cwn-1	Lin-17
Cwn-2	Mom-5
Lin-44	Mig-1
Mom-2	
Egl-20	
<b>5 Total</b>	<b>3 Total</b>

**Figure 22: Désignation des protéines Wnts et Fz chez quatre espèces différentes [156].** Liste des protéines Wnt et Fz chez l'humain, la souris, la mouche et le vers de terre. Les cases grisées indiquent les protéines impliquées dans le développement de la synapse et son fonctionnement. Ces informations proviennent pour partie du site d'informations du Dr. Nusse, Wnt Homepage (<http://www.stanford.edu/group/nusselab/cgi-bin/wnt/>).

La classification physiologique fut établie selon l'induction ou non d'un axe dorso-ventral au cours de l'embryogénèse du xénope.

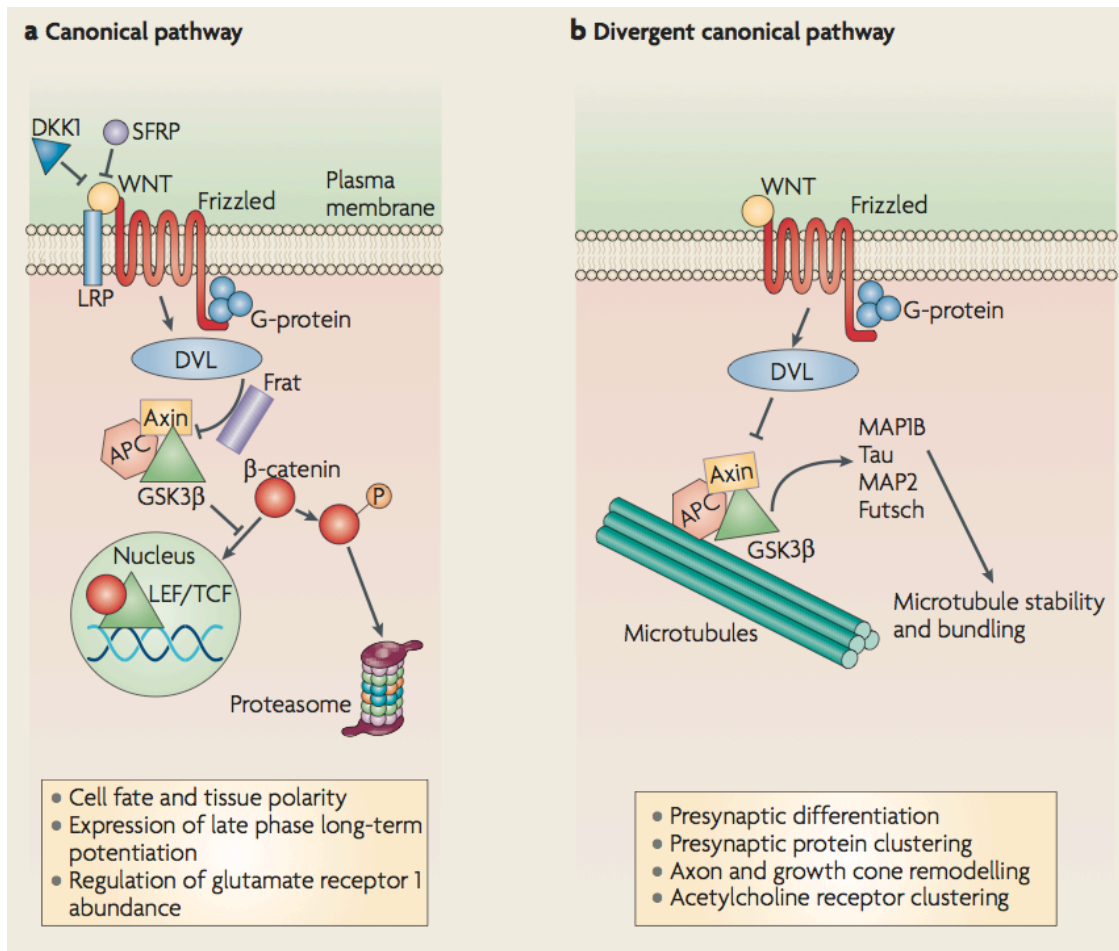
Les ligands Wnts se fixent au récepteur à 7 domaines transmembranaires Frizzled (Fz ou Fzd) qui se dimérise avec son co-récepteur Low-Density Lipoprotein (LDL) receptor-related protein 5/6 (LRP5/6). Le complexe ainsi formé active la protéine Dishevelled (Dvl) qui est un carrefour de trois voies de signalisation :

- la **voie canonique ou Wnt/  $\beta$ -caténine** stabilise la  $\beta$  caténine permettant son accumulation au noyau et la régulation transcriptionnelle de gènes cibles (Figure 23a) ;
- la **voie PCP** (Planar Cell Polarity) aboutit à l'activation de GTPases (comme RhoA) et de kinases (comme JNK). Cette voie est surtout impliquée dans la migration et la polarisation cellulaire (Figure 24c) ;
- la **voie calcique**, passe par les protéines G, active la PLC et augmente ainsi la concentration intracellulaire en calcium (Figure 24e).

## I. Les voies Wnt canoniques

Au sein de la voie canonique, en présence de ligands Wnts, le récepteur Fz se dimérise avec son co-récepteur Low-Density Lipoprotein (LDL) receptor-related protein 5/6 (LRP5/6) qui est phosphorylé par Dvl (Figure 23a). Il recrute le complexe Axin à la membrane qui ainsi séquestré ne peut plus phosphoryler la  $\beta$ -caténine. Celle-ci peut désormais s'accumuler dans le cytoplasme puis passer dans le noyau où elle se fixe aux facteurs de transcription T Cell Factor (TCF) et Lymphoid Enhancer binding Factor 1 (LEF) puis à leurs éléments de réponses sur l'ADN. La fixation sur les éléments de réponses TCF/LEF entraînent la transcription des gènes cibles de la voie telles la cycline D1 ou la connexine 43.

En l'absence du ligand Wnt, le complexe Axin composé des protéines Axin, du suppresseur de tumeur *adenomatous polyposis coli* (APC), de la caséine kinase 1 (CK1) et de la sérine/thréonine kinase Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ), phosphoryle la  $\beta$ -caténine. Cette phosphorylation qui a lieu dans la partie N-terminale entraîne la reconnaissance de la  $\beta$ -caténine par une ubiquitine ligase  $\beta$ -Transducing Repeat-Containing Protein ( $\beta$ -Trcp) et provoque son adressage et sa dégradation dans le protéasome.



**Figure 23: Les différentes voies de signalisation Wnt, 1ère partie [157].** En (a) est représentée la voie Wnt/ $\beta$ -caténine qui sous l'effet d'un ligand Wnt permet la translocation de la  $\beta$ -caténine au noyau et la régulation de l'expression de ses gènes cibles. En (b) est représentée la voie divergente dont la protéine majeure est la GSK3 $\beta$ . Cette dernière peut phosphoryler des protéines associées aux microtubules et provoquer la destabilisation du réseau.

Il existe une forme divergente de cette voie canonique (Figure 23b) qui établit les relations entre Dvl et les microtubules. Nous développerons cette voie dans la partie portant sur le rôle de Wnt sur le cytosquelette (page 62).

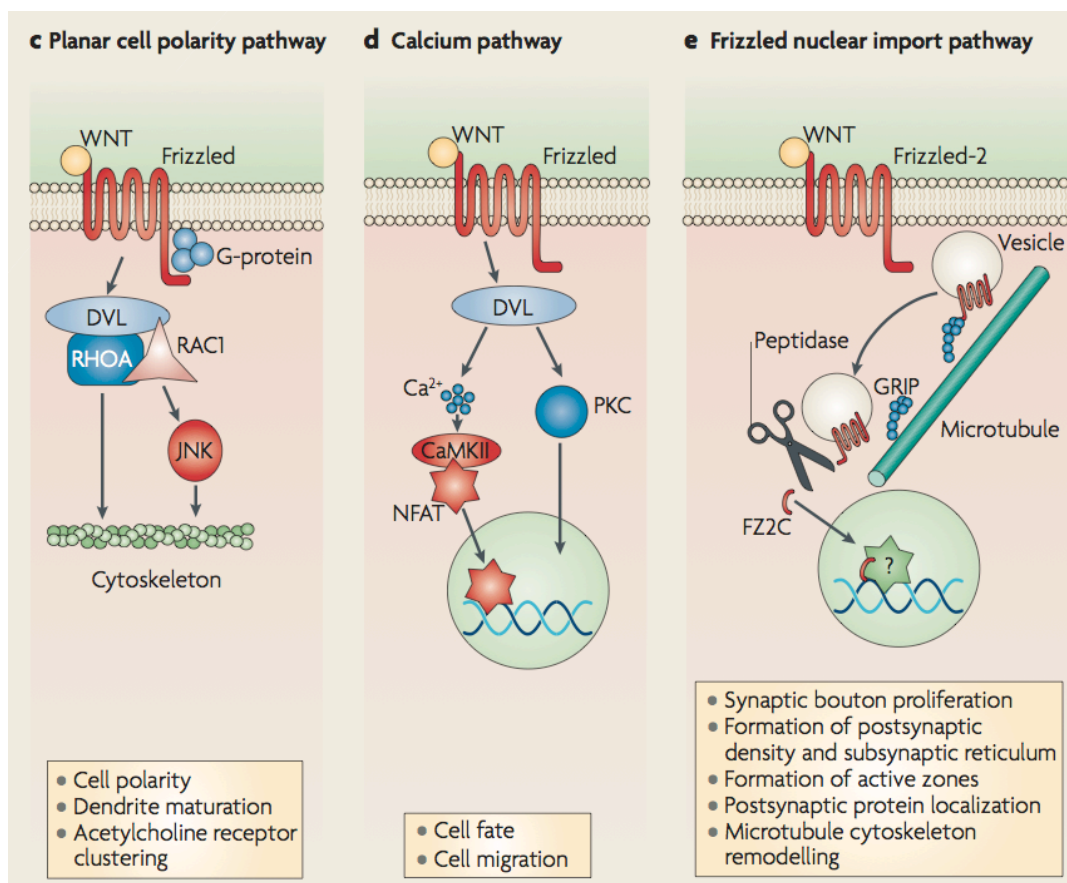
## 2. Les voies Wnt non canoniques

La voie **Planar Cell Polarity pathway (PCP)** ou Wnt-Jun N-terminal kinase (JNK) tient son nom du comportement et de la polarité qu'adoptent les cellules sur un épithélium au cours de la formation de la soie chez la drosophile ou de la gastrulation.



Au sein de cette voie de signalisation (Figure 24c), Wnt se fixe sur Fz, active Dvl qui va former des complexes avec RhoA ou Rac1 et la kinase JNK pour stabiliser le cytosquelette d'actine et le réseau de microtubules.

La **voie calcique** (Figure 24d) déclenche une série de réactions qui aboutit à l'accumulation intracellulaire de calcium. Le ligand Wnt se fixe sur son récepteur Fz, puis, par l'intermédiaire de Dvl et de la phospholipase C, conduit à la formation de diacylglycerol (DAG) et d'inositol-triphosphate (IP3). Le flux de calcium généré provoque l'activation d'enzymes telles que la protéine kinase C (PKC) et la calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMK2).



**Figure 24: Les différentes voies de signalisation Wnt, 2nd partie [157].** En (c), la voie PCP régule le cytosquelette par l'intermédiaire de RhoA et JNK. En (d), la voie calcique active les facteurs de transcription NFAT. Enfin, en (e), une partie du récepteur Fz est internalisée pour réguler la transcription.

Enfin, il existe une voie alternative (Figure 24e) ou **voie d'importation nucléaire récepteur Fz**. Au cours de cette signalisation, les récepteurs membranaires de type Fz2,

sont internalisés, clivés et enfin importés dans le noyau [158] à l'aide d'un partenaire GRIP (un récepteur au glutamate à 7 domaines PDZ). Cette voie est surtout impliquée au cours de la formation du bouton synaptique.

Il est à noter qu'au sein de ces différentes voies de signalisation, la protéine Dvl a un rôle prépondérant de plaque tournante, orientant aussi bien vers la régulation transcriptionnelle que la stabilisation du cytosquelette.

### **3. Dialogues entre les différentes signalisations Wnt**

Plusieurs équipes ont démontré que la signalisation non canonique pouvait inhiber la voie canonique. Ainsi, la surexpression de Wnt5a bloque la formation de l'axe secondaire par Wnt8 chez le xénope [159]. Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer ces mécanismes d'inhibition. Wnt5a pourrait inhiber l'activité transcriptionnelle de la  $\beta$ -caténine en induisant la phosphorylation de TCF-4 par la Nemo like kinase (NLK) [160]. L'inhibition de la voie canonique par la voie non canonique pourrait aussi s'expliquer par la compétition touchant Dvl, partenaire impliqué dans les deux signalisations. A ce titre, il a récemment été montré, que les protéines NFAT réprimaient la signalisation canonique en interagissant avec Dvl, participant ainsi à la régulation et à la prolifération des progéniteurs neuronaux [161]. Enfin, il a par ailleurs été démontré chez la souris que la  $\beta$ -caténine peut être dégradée par le facteur Siah 2 dont la transcription est augmentée par Wnt5a [162].

Les frontières entre les voies canoniques et non canoniques sont perméables et dépendent précisément du contexte cellulaire. Ainsi, l'équipe de Roel Nusse a mis en évidence que selon le contexte de récepteurs membranaires présents à la surface cellulaire, Wnt5a pouvait soit inhiber soit activer la voie Wnt/  $\beta$ -caténine. Dans le cas où les récepteurs Fz4 et LRP5 sont à la surface, Wnt5a peut activer la voie canonique. En revanche, si le co-récepteur Ror 2 est présent, Wnt5a induit une signalisation non canonique tout en inhibant la voie canonique [163].

Les effets des Wnts sont si finement régulés que des signalisations différentes sont mises en places dans les régions pré- et post-synaptiques. Il a ainsi été montré dans un modèle de souris que Wnt3 participait au regroupement de récepteurs à l'acétylcholine dans la région post-synaptique [164]. Une boucle de rétrocontrôle négatif par

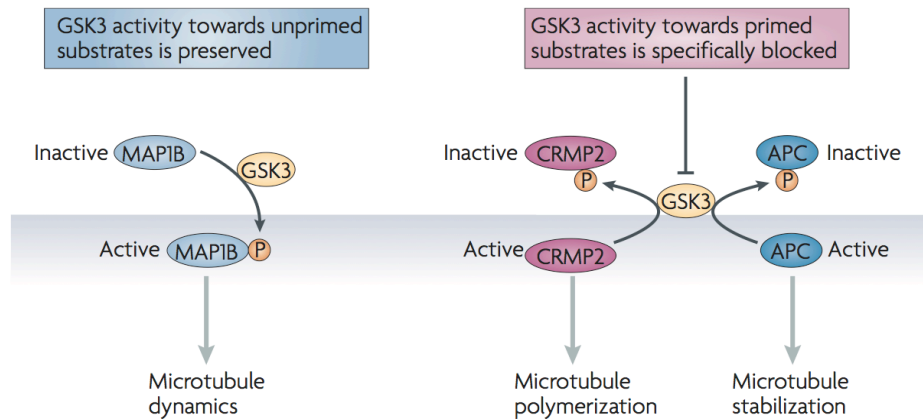
l'intermédiaire de Wnt3a permet alors de limiter l'agrégation de ces mêmes récepteurs à l'acétylcholine [165]. Il est à ce stade important de préciser que les ligands Wnts qui participent au développement et au fonctionnement de la synapse ne sont pas seulement sécrétés de façon auto- et paracrine par les composantes pré- et post-synaptiques mais aussi par les cellules gliales [166].

#### **4. Rôle de la voie Wnt sur le cytosquelette**

La voie Wnt peut modifier le cytosquelette cellulaire indépendamment de toute activité transcriptionnelle dans le noyau en passant par la voie canonique divergente ou la voie Wnt PCP. Cette régulation touche non seulement la stabilité des microtubules mais également l'architecture de l'ensemble du réseau sous-cortical d'actine. Ainsi, la régulation de la stabilité des microtubules est fondamentale pour le bon alignement du fuseau mitotique, la migration cellulaire, la polarisation ou bien encore le contrôle de l'arborisation terminale des axones et des dendrites.

Ces modifications du cytosquelette passent en partie par l'inhibition de la GSK3 $\beta$ , l'une des protéines pivots de la signalisation Wnt. La protéine Dvl qui est un acteur de cette voie de signalisation est étroitement associée aux microtubules et plus préférentiellement à leur forme stabilisée [167]. De manière surprenante, la protéine Axine qui est un régulateur négatif de la voie, se fixe et stabilise les microtubules. Son rôle pourrait donc être davantage celui d'un modulateur que d'un inhibiteur. L'inhibition de la GSK3 $\beta$  modifie la phosphorylation de protéines associées au cytosquelette telles que MAP1B, MAP2, Tau, CRMP2 ou encore APC et par conséquent la structure et la stabilité du cytosquelette. Il est important de souligner que la phosphorylation de ces protéines associées aux microtubules peut les activer ou les inactiver. Ainsi MAP1B phosphorylée se retrouvera activée et associée à un réseau de microtubules instables et dynamiques. La phosphorylation de CRMP2 ou APC par la GSK3 $\beta$  inactivera ces protéines, renforçant ainsi l'état instable du réseau de microtubules (Figure 25).

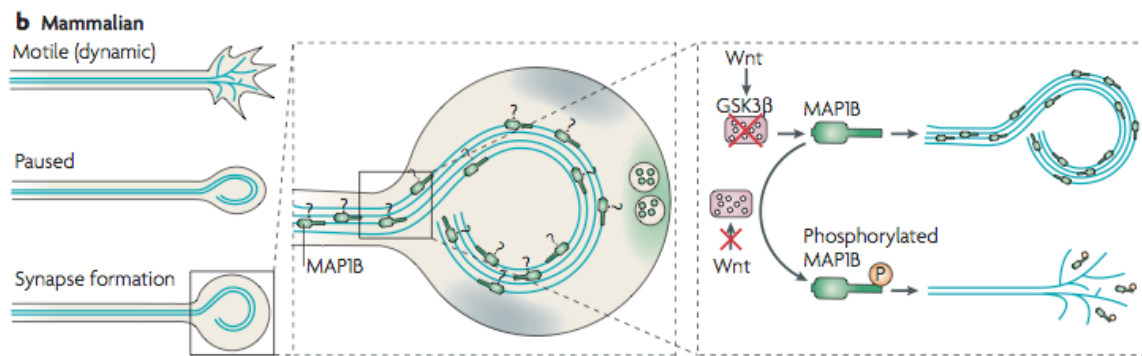
A l'inverse, la diminution du taux de phosphorylation de MAP1B, CRMP2 et APC (ce qui aura pour effets d'activer ces deux dernières) permettra aux microtubules de polymériser et de se stabiliser.



**Figure 25: Régulation des substrats de la GSK3 $\beta$  au cours de la croissance axonale [168].** La phosphorylation activatrice de MAP1B et inactivatrice des protéines CRMP2 et APC rend les microtubules dynamiques et instables. A l'inverse, déphosphorylée, MAP1B est inactive tandis que CRMP2 et APC sont actives et stabilisent les microtubules.

Ce processus a été particulièrement bien décrit au cours de la pousse axonale et de l'arborisation ou phénomène de « branching » induit par Wnt7a. Faisant partie de la voie canonique, Wnt7a inhibe la GSK3 $\beta$  conduisant à une diminution de quantité de la forme phosphorylée de la MAP1B (Figure 26). Cette forme phosphorylée de la protéine est préférentiellement associée à des microtubules instables. Ainsi, la dynamisation du réseau tubulaire conduit à un important remodelage axonal des neurones cérébelleux en cours de développement [169].

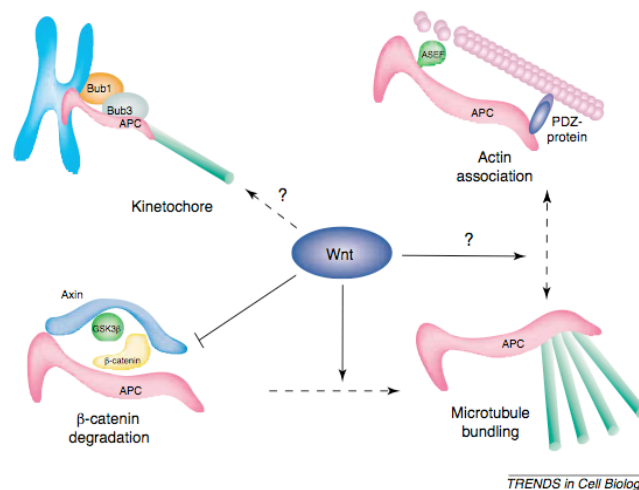
Dans le cervelet des vertébrés, plusieurs équipes ont montré que les Wnts jouaient un rôle de guidage, de signal rétrograde émis par les neurones cibles avant la formation de la synapse. Les cônes de croissance axonaux sont composés de microtubules et d'organites dans leurs parties centrales et d'une région riche en actine hautement dynamique en périphérie. La régulation fine de la signalisation Wnt favorise l'augmentation du diamètre des cônes de croissance ainsi que la formation de boucles de microtubules préalables à la formation des synapses. A la périphérie du cône de croissance, l'absence de Wnt favorise la dynamique et l'instabilité des microtubules permettant ainsi l'arborisation axonale.



**Figure 26: Régulation de la stabilité des microtubules au cours de la pousse axonale [170].** La signalisation Wnt est nécessaire pour stabiliser les microtubules et permettre la formation du bouton synaptique. En son absence, on observe une importante arborisation axonale.

Chez *C. elegans*, la signalisation Wnt contrôle l'orientation du fuseau mitotique dès le stade blastomères [171]. Chez la drosophile, la protéine APC est nécessaire pour le bon accrochage du réseau microtubulaire sous-cortical et ainsi réaliser des divisions cellulaires symétriques [172]. APC pourrait également intervenir dans la fixation et la régulation du réseau d'actine [173].

Ainsi, la protéine APC apparaît être à l'interface de plusieurs effets possibles de la voie Wnt (Figure 27).



**Figure 27: Effets possibles de la signalisation Wnt sur le cytosquelette par l'intermédiaire de la protéine APC [145].** Les ligands Wnts semblent avoir la capacité d'augmenter la fixation d'APC sur les microtubules et les filaments d'actine et ainsi de les stabiliser. Ils pourraient par ailleurs jouer un rôle au cours de la division mitotique en favorisant la liaison d'APC au kinétochore.

La signalisation non canonique peut également agir sur le cytosquelette cellulaire. La contribution de GTPases de type Rho au cours de la migration cellulaire a été mise en évidence aussi bien *in vitro* que *in vivo*. Les trois membres les plus étudiés, Rho, Rac et Cdc42 font partie intégrante de la voie PCP. Rho contrôle l'assemblage des filaments d'actine-myosine en vue de générer la force contractile. Tandis que Rac et Cc42 activent la polymérisation d'actine à la périphérie cellulaire afin de générer la force protrusive sous la forme de lamellipodes et filopodes. Les Rho GTPases participent également au changement de la forme de la cellule en influant la réorganisation du cytosquelette d'actine.

L'expérience *in vitro* de la lésion d'une mono couche cellulaire confluente en culture (expérience de « scratch assay ») a permis de mettre en évidence les polymérisations d'actine et de microtubules au front de migration [174]. Dans ces conditions Cdc42 se retrouve à jouer un rôle important aux bordures, à proximité de la lésion. Par l'intermédiaire du complexe Par6/aPKC, il inhibe la GSK3 $\beta$  et favorise l'accumulation de l'APC aux extrémités (+) des microtubules [175]. Dans une autre étude, il a été montré que la lésion d'une mono couche cellulaire confluente en culture provoquait par l'intermédiaire de Wnt5a l'activation de la voie non canonique. Cette voie coopère avec le complexe cdc42/Par6/aPKC permettant ainsi la réorganisation du cytosquelette de microtubules [176].

La voie Wnt non canonique et plus précisément la voie PCP agit par l'intermédiaire de la protéine JNK sur le réseau de microtubule. Il a été montré que l'isoforme JNK1 pouvait phosphoryler la protéine MAP2 et ainsi stabiliser les microtubules [177].

Jusqu'à présent, les effets de la voie Wnt sur le cytosquelette ont été surtout étudiés sur les neurones et ses prolongements. Nous nous sommes pour notre part focalisés sur le rôle des différents ligands Wnt sur le cytosquelette des cellules de Schwann.

L'analyse des mutants pour différents Wnts met en lumière l'importance et la variété des processus biologiques qu'ils contrôlent. Chez la drosophile, wingless est impliquée dans de nombreux stades du développement embryonnaire et larvaire [178] ainsi qu'au cours de la différenciation synaptique [179]. Chez les vertébrés, la délétion du gène Wnt peut provoquer des phénotypes dramatiques allant de la létalité embryonnaire, de malformations du SNC à l'absence de rein ou de membre. Cette variété indique que la signalisation Wnt a de nombreux effets transcriptionnels dépendant du type cellulaire (tableau 2).

Gene	Knockout (KO) phenotypes or other functions	Redundancies/ similarities with other KO	References
<i>Wnt1</i>	Deficiency in neural crest derivatives, reduction in dorsolateral neural precursors in the neural tube (with <i>Wnt3A</i> KO) Decrease in thymocyte number (with <i>Wnt-4</i> KO)	Redundant with <i>Wnt3a</i> and <i>Wnt4</i> ; similar to TCF1	(Ikeya et al. 1997, Mulroy et al. 2002)
<i>Wnt3</i>	Early gastrulation defect, perturbations in establishment and maintenance of the apical ectodermal ridge (AER) in the limb	In limbs, similar to loss of $\beta$ -catenin	(Barrow et al. 2003, P. Liu et al. 1999)
<i>Wnt3a</i>	Paraxial mesoderm defects, tailbud defects, deficiency in neural crest derivatives, reduction in dorsolateral neural precursors in the neural tube (with <i>Wnt1</i> KO) Loss of hippocampus Somitogenesis defects	Redundant with <i>Wnt1</i> , similar to LEF1/TCF1	(Aulehla et al. 2003; Galceran et al. 1999, 2000; Ikeya et al. 1997; Lee et al. 2000; Yoshikawa et al. 1997)
<i>Wnt4</i>	Defects in female development; absence of Mullerian duct, defects in adrenal gland development Decrease in thymocyte number (with <i>Wnt1</i> KO)	<i>Wnt1</i>	(Heikkila et al. 2002, Mulroy et al. 2002, Vainio et al. 1999)
<i>Wnt5a</i>	Truncated limbs and AP axis Defects in distal lung morphogenesis Chondrocyte differentiation defects, perturbed longitudinal skeletal outgrowth Inhibits B cell proliferation, produces myeloid leukemias and B-cell lymphomas in heterozygotes		(Li et al. 2002, Liang et al. 2003, Yamaguchi et al. 1999, Y. Yang et al. 2003)
<i>Wnt7a</i>	Female infertility; in males, Mullerian duct regression fails Delayed maturation of synapses in cerebellum		(Hall et al. 2000, Parr & McMahon 1998)
<i>Wnt7b</i>	Placental development defects Respiratory failure, defects in early mesenchymal proliferation leading to lung hypoplasia		(Parr et al. 2001, Shu et al. 2002)
<i>Wnt11</i>	Ureteric branching defects and kidney hypoplasia		(Majumdar et al. 2003)

**Tableau 2 : Phénotypes des souris délétées de la protéine Wnt [180].** Ces différents phénotypes indiquent que la signalisation Wnt provoquent plusieurs effets transcriptionnels. Dans de nombreux cas, le type cellulaire spécifie la nature de la réponse transcriptionnelle.

## 5. Rôles de Wnt dans le développement du système nerveux

Le profil d'expression des différents composants de la signalisation Wnt a été étudié dans le cerveau de souris [181]. Cette étude montre des différences d'expression de la  $\beta$ -caténine, TCF4, LEF-1 et de la GSK3 $\beta$  dans les neurones, les astrocytes et les oligodendrocytes à différents stades du développement.

Lors du développement, la voie Wnt/ $\beta$ -caténine est impliquée dans les différentes étapes de la formation du système nerveux [182]. Elle intervient dans un premier temps lors de la détermination de l'axe antéro-postérieur [178]. Le chlorure de lithium qui est un inhibiteur reconnu de la GSK3 $\beta$  [183] et donc un activateur mimant la voie canonique, bloque la formation des structures antérieures. La délétion de l'effecteur

final de la voie, le facteur de transcription  $\beta$ -caténine entraîne une anomalie de formation de l'axe antéro-postérieur qui est létale au stade embryonnaire (E7) [184].

L'utilisation des souris KO pour différents Wnts a permis de mettre en évidence l'importance de la glycoprotéine morphogène dans l'établissement des structures du cerveau. En effet, les homozygotes  $Wnt3a^{-/-}$  présentent d'importants défauts de formation de l'hippocampe [185]. Ces malformations sont pour la plupart retrouvées lors de l'inactivation de la  $\beta$ -caténine dans les régions d'expression de  $Wnt1$  [186] ainsi que les souris KO pour  $LEF1$ .

Les souris invalidées pour  $Wnt1$  présentent un défaut de formation du mésencéphale et du rhombencéphale assez similaire au phénotype des souris mutantes pour la  $\beta$ -caténine, ce qui suggère que  $Wnt1$  contrôle le développement de cette partie du cerveau par l'intermédiaire de la voie canonique. Cette anomalie du cerveau moyen-cerveau antérieur serait due à une diminution de la différenciation et de la survie des cellules de la crête neurale [187].

Les expériences de perte et gain de fonction de la  $\beta$ -caténine ont permis de montrer dans la moelle épinière et le cerveau que cette signalisation régulait non seulement la survie, mais aussi l'équilibre entre la prolifération et la différenciation cellulaire. En effet, un défaut en  $\beta$ -caténine entraîne une diminution importante de la taille de la moelle épinière et une diminution de la prolifération des progéniteurs neuronaux associée à une augmentation de leur différenciation. A l'inverse, la mutation gain de fonction de  $\beta$ -caténine provoque une augmentation de la taille de la moelle épinière et de la prolifération des progéniteurs neuronaux associée à une diminution de leur différenciation [188].

La voie  $Wnt/\beta$ -caténine intervient pendant la différenciation des oligodendrocytes, car l'activation de la  $\beta$ -caténine retarde, transitoirement, la maturation des oligodendrocytes, l'expression des protéines de la myéline ainsi que l'apparition des axones myélinisés, sans modifier le nombre de précurseurs des oligodendrocytes [189, 190]. Une autre étude montre que les enzymes  $HDAC1/2$  sont essentielles pour la formation et la différenciation des oligodendrocytes. Chez les souris  $HDAC1/2$  KO (dCKO), la  $\beta$ -caténine est stabilisée et donc activée, ce qui inhibe la différenciation des oligodendrocytes en activant l'expression de  $Id2/4$ , des inhibiteurs de la différenciation [191]. Même si ces études évoquent un rôle potentiel de la  $\beta$ -caténine dans la



différenciation oligodendrocytaire, elles ne décrivent aucun effet de la voie Wnt sur l'expression des gènes de la myéline.

## **6. Implications de la voie Wnt dans les maladies neurodégénératives**

### **6.1. Maladie d'Alzheimer**

La signalisation Wnt est aussi impliquée dans la maladie d'Alzheimer (AD) [192]. Un premier travail a montré que l'hyperphosphorylation (donc la stabilité) de la protéine Tau est contrôlée par un groupe de sérine-thréonine kinases dont la GSK3 $\beta$  [193]. L'inhibition de la GSK3 $\beta$  prévient l'hyperphosphorylation de Tau, la rupture des microtubules neuronaux ainsi que l'initiation des processus de mort cellulaire. De plus, il a été démontré que la  $\beta$ -caténine et la GSK3 $\beta$  font partie du complexe multiprotéique de la presenilin 1 (PS1). La PS1 aide à la régulation de la quantité de  $\beta$ -caténine disponible. Enfin, une étude récente indique que la protéine APP (Amyloid Precursor Protein), associée à l'AD, module la dégradation de la  $\beta$ -caténine ce qui indique qu'une surexpression de l'APP pourrait entraîner l'AD via une inhibition de l'expression de la  $\beta$ -caténine [194]. La maturation de l'APP et la neurotoxicité du peptide  $\beta$ -amyloïde pourraient être modulées par le lithium. L'ensemble des données montre donc le rôle d'une inhibition de la signalisation Wnt dans l'AD.

### **6.2. Wnt et neuroprotection**

Plusieurs études montrent que le chlorure de lithium (LiCl), un inhibiteur de la GSK3 $\beta$ , est capable d'activer ou de mimer la voie Wnt/ $\beta$ -caténine [183]. En effet, l'administration de LiCl à des souris, stabilise et accumule la  $\beta$ -caténine dans le cytoplasme, ce qui entraîne son entrée dans le noyau. Par ailleurs, les souris invalidées pour la GSK3 $\beta$  présentent le même phénotype que les souris traitées au LiCl (baisse de l'immobilité à un test de nage) [195]. Le lithium est déjà utilisé comme stabilisateur de l'humeur pour le traitement des maladies bipolaires [196, 197]. Des études récentes menées *in vitro* et *in vivo* suggèrent que le lithium pourrait être utilisé dans le traitement des lésions cérébrales aiguës ou dans les maladies neurodégénératives telles que la

maladie de Parkinson, l'AD, la sclérose en plaques et la maladie de Huntington [198, 199]. De plus, le lithium a des effets neuroprotecteurs en inhibant la mort neuronale et en stimulant la neurogenèse [200]. En effet, le traitement par le lithium augmente l'expression des gènes de survie comme Bcl-2, Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF), hsp70,  $\beta$ -caténine et CREB [201-203]. A l'opposé, le lithium inhibe l'expression des gènes ou l'activité des protéines pro-apoptotiques comme les caspases, Bax, le cytochrome c et le peptide  $\beta$ -amyloïde.

### **6.3. Wnt et pathologies génétiques**

Une étude de 2004 a permis de proposer la mutation perte de fonction de Wnt3 comme responsable de la tetra-amelia, une maladie génétique humaine rare qui se caractérise par l'absence de membre [204]. Chez l'adulte, des défauts de signalisation de la voie Wnt peuvent conduire à de nombreuses anomalies et maladies dégénératives. Ainsi, une mutation du gène codant pour la LRP5 a été identifiée dans des pathologies touchant la densité osseuse. Une mutation non sens de l'Axine 2 provoque une agénésie dentaire sévère. Cette même protéine Axine 2 qui est une cible transcriptionnelle de la voie Wnt, induit une boucle de rétro-contrôle négatif qui aboutit à la dégradation de la  $\beta$ -caténine. Elle est fortement exprimée dans les lésions cérébrales du nouveau-né présentant des hypoxies ischémiques ainsi que chez l'adulte atteint de scléroses multiples [205].



# **MATERIEL ET METHODES**



Nous nous limiterons dans cette partie aux méthodes qui ne sont pas décrites dans les deux articles présentés dans la partie résultats.

- **La Microscopie à Force Atomique (AFM) :**

Le principe du microscope à force atomique (AFM) consiste à déplacer une pointe ultrafine à proximité de l'échantillon et à mesurer les interactions locales entre la surface de l'échantillon et la pointe. Il existe plusieurs modes d'utilisation de l'AFM, nous utilisons le mode contact, où la pointe, montée sur un levier souple, est placée en contact de la surface de l'échantillon ; une force constante est imposée pendant le balayage. Ainsi, lorsque la pointe se déplace et qu'elle rencontre une aspérité, le levier est défléchi ; cela entraîne l'intervention d'une boucle de rétrocontrôle qui va maintenir constante la distance et donc la force d'interaction entre la pointe et l'échantillon. La position du levier est détectée par réflexion d'un faisceau laser sur sa face supérieure (recouverte d'or) vers une photodiode à quatre cadrans (Figure 28). Les céramiques piézoélectriques qui assurent le déplacement de la pointe limitent actuellement à 100  $\mu\text{m}$  environ la taille du balayage dans le plan avec une amplitude verticale de 6  $\mu\text{m}$ . Pour l'étude d'échantillons biologiques, les mesures s'effectuent dans le milieu de culture. De plus, afin de ne pas endommager les cellules, les forces appliquées doivent être faibles (de l'ordre de quelques picoNewtons) et le levier le plus souple possible (constante de raideur d'environ 10 mN/m).

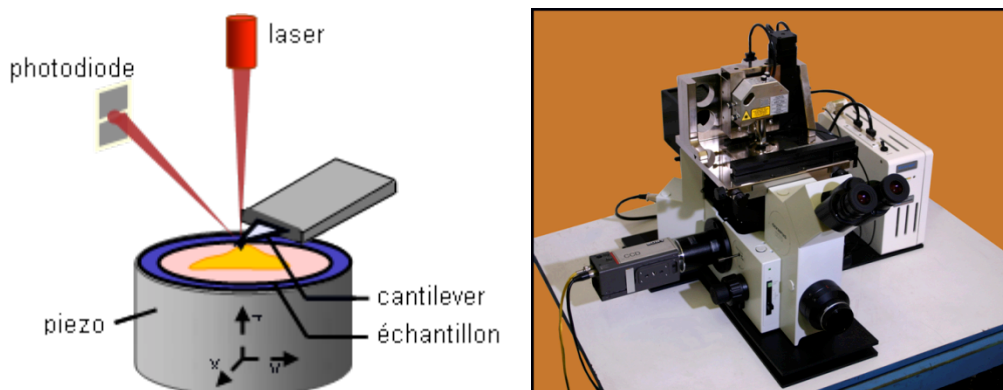
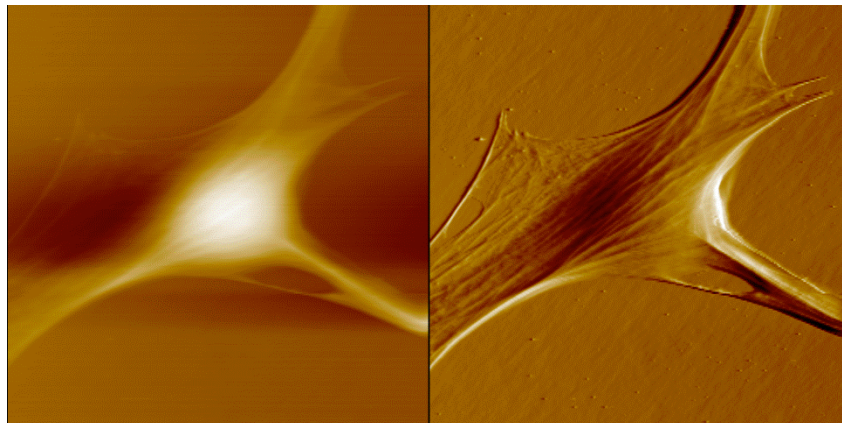


Figure 28: Schéma de principe de l'AFM et du dispositif utilisé.

Au cours du balayage de la surface, deux images sont collectées simultanément (Figure 29):

- une image topographique (encore appelée image hauteur) qui nous renseigne sur le relief de la cellule et permet de déterminer sa hauteur, sa surface d'adhésion ou bien son volume ;
- une image dite de déflexion qui correspond aux réajustements électroniques de la position relative entre la pointe et l'échantillon. Cette image fait ressortir plus nettement les détails de la surface. Dans le cas de cellules adhérentes, on peut visualiser le cytosquelette sous-membranaire (Figure 29).



**Figure 29: Images de hauteur (gauche) et de déflexion (droite) de cellules de Schwann (MSC80) dans leur milieu de culture (100 µm x 100 µm).**

Le microscope à force atomique utilisé est un Bioscope™ de chez Digital Instruments/Veeco, le pilote étant le Nanoscope 3a. L'AFM est monté sur un microscope inversé Olympus IX 70 qui permet de visualiser les cellules et de choisir la zone d'intérêt. Les pointes utilisées (Veeco) sont en nitrure de silicium, leur constante de raideur est comprise entre 10 à 30 mN/m.

- **Lésion d'une monocouche cellulaire *in vitro* :**

L'expérience de strie ou scratch test consiste à enlever une bande de cellules à un tapis cellulaire confluente [206]. Les cellules MSC80 sontensemencées à 2 millions de cellules par puits de plaque 6 puits. Le lendemain, la strie est réalisée à l'aide d'un cône stérile de 200µl. Le milieu de culture est changé et additionné si nécessaire de LiCl (10mM)

pendant 8h ou 24h dans un incubateur à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>. Selon l'expérience, on prélève l'ensemble du puits ou une bande de cellules récoltée à l'aide d'une spatule stérile. Après extraction des ARN totaux, une RT est réalisée puis une amplification d'ADNc et enfin les gènes sont dosés par PCR quantitative.

- **Milieus conditionnés :**

Les cellules MSC80 sontensemencées à 1,5x10<sup>5</sup> cellules par puits de plaque 6 puits. Le lendemain, les cellules MSC80 sont transitoirement transfectées en utilisant de l'Effecten® (Qiagen). Les plasmides (0,25µg par puits de plaque 6 puits) codent pour différents Wnt (3, 3a, 4, 5a, 5b, 6, 7a et 7b). Deux jours après la transfection, le milieu de culture est transféré sur des cellules MSC80ensemencées la veille à la même concentration que précédemment. Le milieu de culture est laissé 24h ou 48h puis les prolongements de CS sont mesurés au microscope à épifluorescence ou les CS sont récupérées pour doser la variation d'expression des gènes par qPCR.

- **Mesure des prolongements des CS :**

Les cellules sont observées et photographiées au microscope à épifluorescence (Nikon Eclipse TE-2000E) équipé d'une chambre thermostatée à 37°C. La mesure des prolongements cellulaires est réalisée grâce au différentiel de fluorescence (NIS Element Software) entre la cellule et le bruit de fond. Ainsi le logiciel parvient à délimiter une zone correspondant à la surface de la cellule.

- **Détermination du nombre et de la viabilité cellulaire :**

Le compteur de cellules (CASY® Model TT, Schärfe System, Reutlingen) dénombre précisément les cellules ainsi que leur viabilité en fonction de leur diamètre et leur facteur d'agrégation. Les cellules sont resuspendues dans un électrolyte spécifique (CASY® ton) et aspirées à travers un capillaire où règne une fréquence de 1MHz. La résistance électrique des cellules est mesurée indiquant le degré de viabilité (les cellules



mortes ne présentant pas la barrière électrique naturelle qu'est la membrane plasmique).

- **Microscopie infrarouge avec source synchrotron :**

Notre objectif a été de déterminer les paramètres d'acquisition pour détecter et caractériser des variations spectrales liées aux effets du LiCl à l'échelle de la cellule de Schwann isolée. De telles expériences ne peuvent pas être réalisées à l'aide d'un spectromètre infrarouge (IR) avec une source conventionnelle ; nous avons eu recours à la source synchrotron SOLEIL.

Le synchrotron SOLEIL (acronyme de Source Optimisée de Lumière d'Energie Intermédiaire du LURE) est implanté sur le plateau de Saclay à Saint-Aubin (l'Orme des Merisiers, Essonne).

- **Principe de fonctionnement de la source synchrotron SOLEIL :**

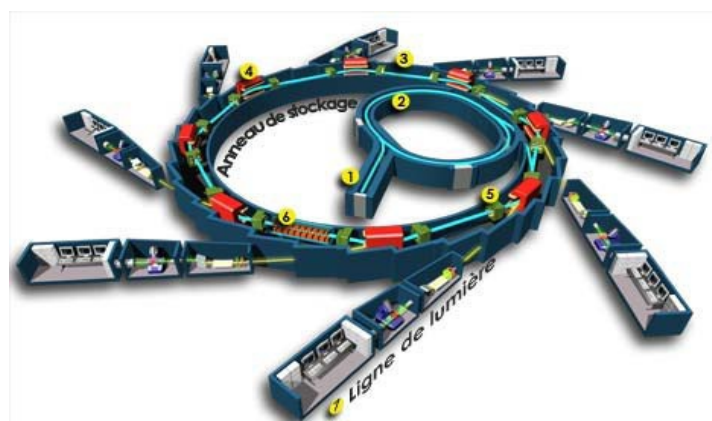


Figure 30: Schéma de principe du fonctionnement du synchrotron SOLEIL (source site Web SOLEIL)

1. Un faisceau d'électrons émis par un canon à électrons est accéléré dans un accélérateur linéaire (LINAC) de 16 m de long où ils atteignent la vitesse de la lumière et un premier niveau d'énergie : 100 MeV.

2. Après cette première accélération, le faisceau d'électrons est dirigé vers un deuxième accélérateur circulaire qui porte leur énergie à la valeur de fonctionnement du synchrotron SOLEIL soit 2,75 GeV.

3. A ce niveau d'énergie, les électrons sont injectés dans l'anneau de stockage de 354 mètres de circonférence (soit 113 mètres de diamètre) où ils vont tourner pendant plusieurs jours.

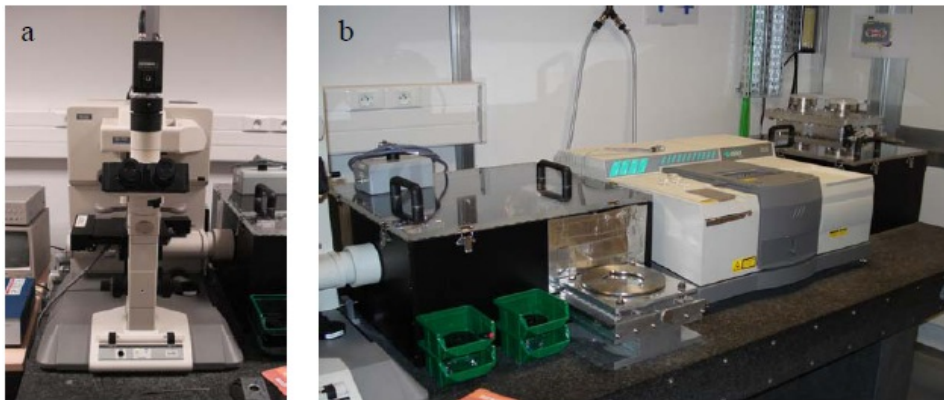
4. Dans l'anneau de stockage, des dispositifs magnétiques dévient la trajectoire des électrons ou les font osciller. Les électrons perdent donc de l'énergie sous forme de lumière, c'est le rayonnement synchrotron que l'on récupère tangentielllement à leur trajectoire.

5. L'énergie perdue par les électrons en émettant le rayonnement synchrotron est compensée par des cavités radiofréquences.

6. Le rayonnement synchrotron est dirigé, sélectionné et conditionné par des systèmes optiques vers les stations expérimentales au niveau des lignes de lumière.

- **La ligne SMIS :**

Nous avons utilisé la ligne SMIS qui dispose d'un spectromètre infrarouge à transformée de Fourier, Thermo Nicolet Magna 860 (Thermo Fischer, Courtaboeuf, France), couplé à un microscope confocal Continuum-Thermo Nicolet (Figure 31). Le faisceau est réparti sur deux instruments grâce à une combinaison de miroirs plans et de miroirs toriques.



**Figure 31: Montage utilisé sur la ligne de lumière SMIS du synchrotron SOLEIL. a) microscope confocal ; b) spectromètre IRTF (source thèse F. Draux, Université de Reims, 2009).**

Ce microspectromètre est équipé d'objectifs refracromat (32X/ON 0,65 et 15X/ON 0,6) qui assurent la focalisation du faisceau sur l'échantillon et d'un détecteur de type MCT/A (Mercure Cadmium Telluride) (250x250  $\mu\text{m}^2$ ) refroidi à l'azote liquide.

Le flux de photons sur l'échantillon est d'environ  $4.8 \times 10^{13}$  Phot/s/0.1% bw avant l'entrée dans l'interféromètre. La mesure des intensités des différentes longueurs d'onde transmises ou absorbées est réalisée avec un interféromètre de Michelson et une séparatrice en KBr/Ge, le spectre résulte du calcul de la transformée de Fourier de l'interférogramme.

Le logiciel utilisé pour l'acquisition des spectres est Omnic software (version 8.0) ; il permet d'une part le réglage des paramètres d'acquisition, et d'autre part, le traitement des données (correction atmosphérique, normalisation, calcul des dérivées et reconstruction d'images spectrales).

- **Avantages et inconvénients de cette technique :**

L'intérêt majeur de la source synchrotron dans le domaine infrarouge est sa haute brillance. Elle est estimée à environ 1000 fois celle d'une source conventionnelle type Globar®, ce qui permet de diminuer les ouvertures de manière considérable et d'atteindre une résolution spatiale pouvant aller jusqu'à  $3 \times 3 \mu\text{m}^2$ , tout en conservant un signal de bonne qualité.

Elle a ainsi permis une avancée importante dans l'acquisition d'informations biomoléculaires sur des tissus et au niveau cellulaire, avec un rapport signal/bruit jamais atteint à cette résolution [207]. Plus important encore, elle a rendu possible l'acquisition d'images infrarouge à des résolutions subcellulaires [208]. La résolution spatiale obtenue grâce à la haute brillance de la source et l'utilisation de la géométrie confocale, a permis d'atteindre la limite de diffraction ( $\lambda/2$ ) [209]. Ainsi, la source synchrotron permet l'étude d'organelles subcellulaires, mais également l'ensemble des cibles cellulaires d'intérêt.

L'inconvénient majeur de la source synchrotron est qu'elle a un coût extrêmement élevé et que son accès est fortement limité. En effet, l'accès aux lignes de lumière reste très compétitif car il repose sur des appels à projets au niveau international. De ce fait, le temps de faisceau alloué reste limité.

- **Préparation des échantillons :**

Le désavantage majeur de la spectroscopie IR réside dans la difficulté de travailler en milieu aqueux. Aussi, pour notre étude il a été nécessaire de déshydrater les dépôts cellulaires afin d'éviter le signal parasite de l'eau.

Différents protocoles ont été décrits et comparés dans la littérature pour optimiser les conditions de détection des cellules dans l'IR [210-213]. Nous en avons testé 3 et avons retenu une fixation au formalin suivi d'un séchage à l'air.

Deux jours après repiquage des MSC80 sur des lames réfléchissantes dans le domaine IR (lames MirrIR, Kevley Technologies, USA), rinçage NaCl 0,9%, fixation au formalin 4% dans NaCl 0,9% pendant 20 min à température ambiante, rinçage à l'eau distillée, séchage à l'air, RT pendant 1h.

- **Acquisition des spectres IR :**

Les spectres IR ont été enregistrés en mode réflexion après avoir sélectionné préalablement les cellules en lumière blanche et s'être positionné spécifiquement sur le noyau ou bien au niveau du cytoplasme d'une extension cellulaire. Un spectre de référence est systématiquement enregistré dans les mêmes conditions à une extrémité propre de la lame (128 accumulations, 8 cm<sup>-1</sup> de résolution).



# RESULTATS



# **I. Régulation des gènes de la myéline par les différentes voies Wnt**

## **1. La voie Wnt/ $\beta$ -caténine régule l'expression des gènes de la myéline dans le système nerveux central et dans le système nerveux périphérique (article 1)**

La voie canonique Wnt/ $\beta$ -caténine tient un rôle important au cours des processus de développement du système nerveux et participe à la plasticité neuronale. Cependant, son rôle au cours du processus de myélinisation n'était pas connu. Pour tenter de répondre à cette question, nous avons utilisé plusieurs modèles dont deux lignées murines de cellules gliales (les lignées de cellules Schwann de souris MSC80 et d'oligodendrocytes 158N), des cultures primaires de cellules Schwann (CS) et des embryons de poissons zèbres. L'utilisation de siRNA ou de dominant négatifs contre différents partenaires de la voie Wnt canonique nous a permis d'identifier cette dernière comme étant essentielle à la régulation des différents gènes de la myéline (P0 et PMP22 dans les MSC80 et PLP dans les 158N). L'induction par le ligand canonique Wnt1 augmente la liaison de la  $\beta$ -caténine aux TCF/LEF présents aux niveaux des différents promoteurs P0 et PMP22. L'étude *in vivo* menée sur des embryons de poissons zèbres ayant une perte de fonction pour TCF3 ou LRP6 établit le rôle de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine dans l'expression des gènes de la myéline et dans la compaction de la gaine de myéline dans le SNC comme dans le SNP. Ce travail nous a permis d'établir le rôle fondamental de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine dans la régulation de l'expression des gènes de la myéline.



# Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling Is an Essential and Direct Driver of Myelin Gene Expression and Myelinogenesis

Marcel Tawk,<sup>1\*</sup> Joelle Makoukji,<sup>2\*</sup> Martin Belle,<sup>2</sup> Cosima Fonte,<sup>1</sup> Amalia Trousson,<sup>2</sup> Thomas Hawkins,<sup>3</sup> Huiliang Li,<sup>4</sup> Said Ghandour,<sup>5</sup> Michael Schumacher,<sup>1</sup> and Charbel Massaad<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Unité Mixte de Recherche (UMR) 788, Inserm and University Paris-Sud 11, Biomedical Institute of Bicêtre, 94276 Kremlin-Bicêtre, France, <sup>2</sup>University Paris Descartes, UMR8194 Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), 75270 Paris, France, <sup>3</sup>Department of Cell and Developmental Biology, and <sup>4</sup>Wolfson Institute for Biomedical Research, Department of Cell and Developmental Biology, University College London, London WC1E 6BT, United Kingdom, and <sup>5</sup>CNRS FRE3289 and University of Strasbourg, 67085 Strasbourg, France

Wnt/ $\beta$ -catenin signaling plays a major role in the development of the nervous system and contributes to neuronal plasticity. However, its role in myelination remains unclear. Here, we identify the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway as an essential driver of myelin gene expression. The selective inhibition of Wnt components by small interfering RNA or dominant-negative forms blocks the expression of myelin protein zero (MPZ) and peripheral myelin protein 22 (PMP22) in mouse Schwann cells and proteolipid protein in mouse oligodendrocytes. Moreover, the activation of Wnt signaling by recombinant Wnt1 ligand increases by threefold the transcription of myelin genes and enhances the binding of  $\beta$ -catenin to T-cell factor/lymphoid-enhancer factor transcription factors present in the vicinity of the MPZ and PMP22 promoters. Most important, loss-of-function analyses in zebrafish embryos show, *in vivo*, a key role for Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in the expression of myelin genes and in myelin sheath compaction, both in the peripheral and central nervous systems. Inhibition of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling resulted in hypomyelination, without affecting Schwann cell and oligodendrocyte generation or axonal integrity. The present findings attribute to Wnt/ $\beta$ -catenin pathway components an essential role in myelin gene expression and myelinogenesis.

## Introduction

Myelin sheaths are essential for the efficient conduction of action potentials and support the integrity of axons in the vertebrate nervous system. The myelination of axons is performed during development by Schwann cells in the peripheral nervous system (PNS) and by oligodendrocytes in the CNS. Myelination involves the extension of large sheaths of membranes and their wrapping around axons, accompanied by the coordinated synthesis of a variety of myelin components, including myelin-specific proteins (French-Constant et al., 2004; Jessen and Mirsky, 2005). Although the morphology of myelin and its molecular constitution are well described, the signaling mechanisms involved in myelination and in the transcriptional control of myelin genes remain poorly understood.

Wnt ligands bind to the frizzled membrane receptors (FZD), which interact with coreceptors named the arrow/low-density lipoprotein receptor-related proteins (LRPs) (Lai et al., 2009). Wnt

binding to FZD activates different intracellular signaling pathways, including an evolutionarily conserved branch, the so-called canonical Wnt signaling pathway or Wnt/ $\beta$ -catenin pathway. In the absence of Wnt signal,  $\beta$ -catenin is phosphorylated by glycogen synthase kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) and is then targeted for proteasomal degradation. Wnt signaling through FZD and LRP activates the cytoplasmic phosphoprotein dishevelled (DSH), which prevents  $\beta$ -catenin degradation. The stabilized  $\beta$ -catenin enters the nucleus, where it regulates gene transcription by interacting with transcription factors called the T-cell factor/lymphoid-enhancer factors (TCF/LEF or TCFs) that bind to a consensus TCF/LEF response element, (A/T)(A/T)CAA(A/T)G, present in the cognate promoters (van Beest et al., 2000). Four different forms of TCFs are expressed in mouse tissues: TCF1, LEF1, TCF3, and TCF4. In the absence of nuclear  $\beta$ -catenin, the TCFs interact with transcriptional repressors and prevent Wnt target gene transcription (Bienz, 1998; Cavallo et al., 1998; Chen et al., 1999). However, when Wnt signaling is activated, the interaction with  $\beta$ -catenin converts the TCF into transcriptional activators (Nusse, 1999).

Wnt signaling is known to play a key role in neurogenesis and the fate of neural progenitors (Lee et al., 2004; Gao et al., 2007). Moreover, it has been identified as a major regulator of neuronal circuit formation during development, involved in neuron positioning, polarization, axon and dendrite development, and synaptogenesis (Salinas and Zou, 2008). In the adult brain, Wnt signaling continues supporting the proper functioning and viability of neurons (Toledo et al., 2008).

An involvement of  $\beta$ -catenin signaling in myelin formation has recently been described. The constitutive overexpression or

Received Aug. 16, 2010; revised Dec. 14, 2010; accepted Dec. 30, 2010.

This work was supported by Inserm, Centre National de la Recherche Scientifique, University Paris Descartes, University Paris-Sud 11, and the Association Française contre les Myopathies. J.M., A.T., and M.B. received PhD fellowships from the French Ministry of Research. M.T. received a postdoctoral fellowship from Inserm (Poste Junior). T.H. was supported by the European Union (EU) FP6 project ZF-MODELS and latterly by the EU FP7 project NEUROXSYS. His work was undertaken in the laboratory of Stephen W. Wilson (University College London, London, UK), which also received support from the Wellcome Trust and the Biotechnology and Biological Sciences Research Council. We are grateful for Dr. P. P. Vidal and Prof. F. Charbonnier for the critical reading of this manuscript.

\*M.T. and J.M. contributed equally to this work.

Correspondence should be addressed to Prof. Charbel Massaad, UMR 8194 CNRS, University Paris Descartes, 45 rue des Saints-Pères, 75270 Paris Cedex 6, France. E-mail: charbel.massaad@parisdescartes.fr.

DOI:10.1523/JNEUROSCI.4270-10.2011

Copyright © 2011 the authors 0270-6474/11/313729-14\$15.00/0

activation of  $\beta$ -catenin, and the disruption or inhibition of TCF, were found to impair the development of oligodendrocytes (Fancy et al., 2009; Feigenson et al., 2009; Ye et al., 2009). However, the role of canonical Wnt signaling in the control of myelination and myelin gene expression in Schwann cells and oligodendrocytes remains undetermined. Here, we report that Wnt/ $\beta$ -catenin signaling operates as a key driver of myelin gene expression and myelination. Our findings thus represent a major conceptual advance in the transcriptional control of myelin gene expression, and they cast a new insight on the role of Wnt signaling in developmental myelination.

## Materials and Methods

**Cell cultures.** The mouse Schwann cell line MSC80 exhibits normal Schwann cell characteristics [S100, myelin protein zero (MPZ), peripheral myelin protein 22 (PMP22) expression] and has retained the capacity to myelinate axons (Boutry et al., 1992; Baron-Van Evercooren et al., 1993). The 158N oligodendrocyte cell line originates from mature oligodendrocytes. It derives from normal oligodendrocytes in secondary cultures that were transfected with plasmids containing the SV40 T-antigen gene expressed under the control of the mouse metallothionein-I promoter. The immortalized stable cell line (158N) expresses transcripts and proteins of oligodendrocyte markers, including proteolipid protein (PLP), myelin basic protein (MBP), and carbonic anhydrase II (CA II). Galactocerebroside and sulfatide are also detected with immunocytochemistry. In the 158N cell line, the levels of oligodendrocyte markers (PLP, MBP, and CAII) are significantly increased by dibutyl cAMP (dbcAMP) treatment. As the 158N cell line continues to express properties of oligodendrocytes, it provides a powerful model to explore the function and regulation of myelin proteins (Feutz et al., 2001; Trousson et al., 2009). Both cell lines were maintained in DMEM supplemented with 10% or 5% decomplexed fetal calf serum (FCS), respectively (Hyclone-Perbio), 100 U/ml penicillin, and 100  $\mu$ g/ml streptomycin (Invitrogen). All cultures were grown at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>.

**Primary cell culture.** Primary mouse Schwann cell cultures were obtained from postnatal day 0 (P0) to P2 sciatic nerves. In brief, nerves were digested in enzyme buffer (0.7 mg/ml collagenase type I and 0.25% trypsin in HBSS; Invitrogen). After trituration, cells were grown on poly-D-lysine/laminin-coated dishes in minimal medium plus 5% FCS. Minimal medium is DMEM/F-12 (Invitrogen), containing 100  $\mu$ g/ml human apo-transferrin, 60 ng/ml progesterone, 5 mg/ml insulin, 16  $\mu$ g/ml putrescine, 400 ng/ml L-thyroxine, 160 ng/ml selenium, 10 ng/ml triiodothyronine, and 300 mg/ml bovine serum albumin (BSA; Fluka).

Primary glial cell cultures were prepared from newborn mouse brain hemispheres derived from PLP::GFP mice [a generous gift from Dr. W. Macklin (Cleveland Clinic Foundation, Cleveland, OH) (Mallon et al., 2002)] as described previously (Feutz et al., 2001). Briefly, meninges were removed, and cerebral hemispheres were mechanically dissociated in DMEM supplemented with 10% calf serum (Invitrogen), penicillin (50 U/ml), and streptomycin (50  $\mu$ g/ml). The cell suspension was plated in a 60-mm-diameter Petri dish (one brain per two Petri dishes) coated with 20  $\mu$ g/ml poly-L-lysine (Sigma). Cultures were then incubated in 5% CO<sub>2</sub> and 95% air in a humidified atmosphere (90%) at 37°C. The cultures were kept for either 4 d [they contain >70% of oligodendrocyte progenitor cells (OPCs)] or 12 d *in vitro* (they contain >70% of mature oligodendrocytes).

**Plasmids and chemicals.** MPZ-luc was graciously provided by Dr. G. Lemke (Salk Institute, La Jolla, CA), PMP22-luc was provided by Dr. P. Patel (Baylor College of Medicine, Houston, TX; it contains the promoter 1 of PMP22, whose expression is confined to the PNS), PLP-luc was provided by Dr. W. Macklin, Dsh-dn plasmids were provided by Dr. M. Tada (University College London, London, UK), (Tada and Smith, 2000), and TOP-Flash-luc plasmid was provided by Dr. R. T. Moon (University of Washington School of Medicine, Seattle, WA). The nuclear-localized  $\beta$ -catenin expression vector (NL- $\beta$ -catenin) was provided by Dr. M. A. Buendia (Pasteur Institute, Paris, France). PCS2+ vectors carrying a cDNA fragment encoding LRP6 $\Delta$ C (Tamai et al., 2000) were used in this study. mRNA was synthesized using the SP6 mMessage mMachine System (Ambion), and we injected 250–300 pg of

LRP6 $\Delta$ C mRNA per embryo. The small interfering RNAs (siRNAs) directed against the four TCFs (TCF1, LEF1, TCF3, and TCF4) and non-targeting siRNA (NT) were purchased from Dharmacon. Each TCF was targeted with four different sequences of siRNA directed against four different regions of the cognate mRNA. The small interfering  $\beta$ -catenin vector was described by Fonte et al. (2005). Wnt1 was purchased from Biovision.

**Transient transfections.** MSC80 and 158N cells were transiently transfected using Effecten reagent (Qiagen). One day before the transfection, cells ( $1.5 \times 10^5$  cells/well) were grown into six-well plates and incubated in the DMEM culture medium containing 10% or 5% decomplexed FCS. The MPZ-luc or the PMP22-luc or PLP-luc plasmid (0.3  $\mu$ g), the pRSV- $\beta$ -galactosidase expression vector (0.1  $\mu$ g), and the dominant-negative expression vectors, mock vectors, or siRNAs at the concentrations indicated in the figure legends were mixed with a solution containing Effecten reagents (0.85 mg/ml) in DMEM. The mixture was then added to cells and incubated overnight. Sixteen hours after transfection, the medium was replaced by DMEM. Luciferase activity was determined using the enzymatic method described by Massaad et al. (2000). The  $\beta$ -galactosidase activity was used to normalize the transfection efficiency.

**Quantitative and semiquantitative real-time PCR experiments.** Total RNA from cultured cells was obtained using RNA NOW (Ozyme). One microgram was reverse transcribed with random primers (Promega) and reverse transcriptase M-MLV-RT (Invitrogen). PCR experiments were performed using TaqDNA polymerase purchased from Promega and primers specific to each gene from Operon. PCR products were analyzed on an agarose gel (2%) and visualized under UV.

Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was performed with standard protocols using SYBRGreen ROX Mix (ABgene) as a fluorescent detection dye in ABI PRISM 7000 in a final volume of 10  $\mu$ l, which also contained 300 nM primers (Operon) and 20 ng of reverse-transcribed RNA in 384-well plates. To characterize the generated amplicons and to control for the contamination by unspecific byproducts, a melting curve analysis was applied. Each reaction was performed in triplicate, and the mean of at least three independent experiments was calculated. All results were normalized to the 26S mRNA level and calculated using the Delta Ct method. The primer sequences used in RT-PCR are listed as follows: MPZ forward (F) 5' GT-CAAGTCCCCCAGTAGAA 3'; MPZ reverse (R) 5' AGGAGCAAGAG-GAAAGCAC 3'; PMP22 F 5' AATGGACACACGACTGATC 3'; PMP22 R 5' CCTTTGGTGAGAGTGAAGAG 3'; PLP F 5' AGCAAAGTCAGCCG-CAAAAC 3'; PLP R 5' CCAGGGAAGCAAAGGGGG 3'; Wnt1 F 5' AT-GAACCTTCAACAACAG 3'; Wnt1 R 5' GGTGCTGCCTCGGTTG 3'; Wnt3 F 5' CAAGCACAACATGAAGCAGGC 3'; Wnt3 R 5' TCGGGACTCACGGTGTCTTCTC 3'; Wnt3a F 5' CACCACGTCAG-CAACAGCC 3'; Wnt3a R 5' AGGAGCGTGTCACTGCGAAAG 3'; Wnt7a F 5' CGACTGTGGCTGCGACAAG 3'; Wnt7a R 5' CTTCATGTTCTC-CTCCAGGATCTTC 3'; TCF1 F 5' TCAAGAGGTGGGGGATTAGA 3'; TCF1 R 5' GCAGGAGAAGCATTGTAGG 3'; LEF1 F 5' AAGCCTCAA-CACGAACACAG 3'; LEF1 R 5' TGCACCTCAGCTACGACATTC 3'; TCF3 F 5' ACCCTTCTGATGATTCC 3'; TCF3 R 5' CGACCTGTGTCCT-TGACT 3'; TCF4 F 5' CACGACAGGAGGATTCAGA 3'; TCF4 R 5' GGGGCTTCTTCTTCTCTC 3'; 26S F 5' AGGAGAAACAACGGTCGT-GCCAAA 3'; 26S R 5' GCGCAAGCAGGTCTGAATCGTG 3'; 18S F 5' CTACCACATCCAAGGAAGGC 3'; 18S R 5' CTCGGCCTGCTTTGAA-CAC 3'; MPZ (-8487/-8471) F 5' GGCTCTGAGTTCAAATCCC 3'; MPZ (-8487/-8471) R 5' GAACCTTCATCTGTTGTTGG 3'; MPZ (-5487/-5461) F 5' TCTCTGGACAGAAAATGGC 3'; MPZ (-5487/-5461) R 5' TTAACCTCTGGCAATCCTG 3'; PMP22 (+107/+124) F 5' GCTC-CACCAGAGAACCCTC 3'; PMP22 (+107/+124) R 5' TGCCAAT-CAAACCTCACCAGAC 3'; EF1 $\alpha$  F 5' CTTCTCAGGCTGACTGTGC 3'; EF1 $\alpha$  R 5' CCGCTAGCATTACCCTCC 3'; MBP F 5' TCCTCTC-CTCGTCTAAGTC 3'; MBP R 5' TCCATCTCAGTGTTCCTG 3'.

**Antibodies.** Primary antibodies against MPZ (rabbit polyclonal), PMP22 (rabbit polyclonal), Wnt1 (rabbit polyclonal), LRP6 (goat polyclonal), and  $\beta$ -actin (rabbit polyclonal) were purchased from Abcam; primary antibodies against  $\beta$ -catenin (mouse monoclonal) were purchased from BD Biosciences; and primary antibodies against DSH-2 (rabbit), GSK3 $\beta$  (rabbit), LEF1/TCF (mouse), and MBP (rabbit poly-

clonal) were purchased from Millipore. Secondary antibodies used for Western blotting were HRP-conjugated goat anti-mouse IgG and HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG (Millipore). Secondary antibodies used for immunofluorescence studies were Alexa 488 goat anti-mouse and Alexa 555 donkey anti-rabbit purchased from Invitrogen.

For zebrafish, we used the following primary antibodies: anti-acetylated tubulin (Sigma), anti-phosphohistone H3 (Millipore). Secondary antibodies used were Alexa 488 or Alexa 568 (Invitrogen).

**Western blot.** Protein content was determined using the “RC-DC” protein assay kit (Bio-Rad) with BSA as the standard. Aliquots of 20  $\mu$ g of total MSC80 extracts treated or not with Wnt1 (10 ng) were used for each sample. Homogenate proteins were separated on 15% SDS-polyacrylamide gels by electrophoresis and blotted onto polyvinylidene difluoride membranes. Nonspecific binding sites in the transblots were blocked at 4°C overnight with 2% ECL Advance blocking agent (GE Healthcare) and with 0.1% Tween 20 (Invitrogen) in PBS. Membranes were then incubated at room temperature for 2 h with the following primary antibodies diluted in a mixture of 2% ECL Advance blocking agent and PBS–0.1% Tween: MPZ antibody (1:750), PMP22 antibody (1:750),  $\beta$ -catenin antibody (1:1000), and  $\beta$ -actin antibody (1:10,000). They were then incubated at room temperature for 1 h, 30 min with the appropriate secondary antibody diluted in 2% blocking buffer/PBS–0.1% Tween (anti-mouse, 1:20,000; anti-rabbit, 1:20,000), followed by ECL Plus Western blotting detection (GE Healthcare) before exposure to radiographic film Hyperfilm ECL (GE Healthcare).

**Immunocytochemistry.** MSC80 Schwann cells were grown at the density of  $0.4 \times 10^5$  cells in two-well glass slides (Lab-Tek; Nalge Nunc International). Cells were then fixed with paraformaldehyde (4%) for 20 min. After three washes with PBS (1 $\times$ ), cells were permeabilized with Triton X-100 (1%) for 30 min. Then, cells were incubated with primary antibodies against Wnt1 (dilution, 1:100), LRP6 (dilution, 1:100), DSH (dilution, 1:100), GSK3 $\beta$  (dilution, 1:100),  $\beta$ -catenin (dilution, 1:250), or TCF/LEF1 (dilution, 1:100) overnight at 4°C and labeled with conjugated antibodies (dilution, 1:500) for 1 h in the dark at room temperature. The slides were imaged using a confocal microscope (LSM510; Carl Zeiss) with a 40 $\times$  [numerical aperture (NA) 1.2] lens, and sequential excitation was performed with laser lines 488 nm (Ar.ion laser) and 633 nm (HeNe laser). The DNA dye TO-PRO-3 (red) was used to identify the nuclei.

**Immunohistochemistry.** Sciatic nerves of mice aged 7 or 21 d were dissected and immediately fixed with 4% paraformaldehyde for 24 h. Nerve cross sections (10  $\mu$ m) were preincubated for 20 min in 10% BSA in 0.1 M PBS (PBS/BSA) and incubated with the primary antibodies diluted in PBS/BSA overnight at 4°C. MBP antibody (dilution, 1:500) was used to identify the myelin sheath surrounding the axons with one of the following antibodies: Wnt1 (dilution, 1:50), LRP6 (dilution, 1:100), GSK3 $\beta$  (dilution, 1:50), and  $\beta$ -catenin (dilution, 1:500). Sections were imaged using a confocal microscope (LSM510; Carl Zeiss) with a 63 $\times$  (NA 1.2) lens, and sequential excitation was performed with laser lines 488 nm (Ar.ion laser), 543 nm (HeNe laser), and 633 nm (HeNe laser).

**Chromatin immunoprecipitation.** MSC80 cells treated with Wnt1 for 4 h were fixed with 1% formaldehyde added to the medium for 10 min, scraped, and collected by centrifugation. Cells were resuspended in 300  $\mu$ l/ml lysis buffer [5 mM piperazine-*N,N'*-bis(2-ethanesulfonic acid), pH 8.0, 85 mM KCl, 0.5% NP-40] with a mixture of protease inhibitors (Roche). Cells were pelleted by centrifugation and resuspended in 300  $\mu$ l of 1% SDS, 10 mM EDTA, and 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, containing protease inhibitors. After incubation on ice for 10 min, they were sonicated six times for 30 s using Bioruptor (Diagenode). Lysates were then cleared by centrifugation, and the concentration of DNA was determined. Equal amounts of DNA were diluted 10 times in dilution buffer (0.01% SDS, 1% Triton X-100, 1.2 mM EDTA, 16.7 mM Tris-HCl, pH 8.1, 167 mM NaCl). The chromatin solution was precleared for 1 h at 4°C on protein G-agarose/salmon sperm DNA beads (Millipore). After brief centrifugation and removal of the beads, DNA was incubated overnight at 4°C on a rotating wheel with 1  $\mu$ g of either  $\beta$ -catenin antibody or nonrelevant antibody (anti-C23). Immune complexes were collected on protein G-agarose/salmon sperm DNA beads (Millipore). Beads were washed sequentially in TSE (0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH 8.1) with 150 mM NaCl, TSE with 500 mM NaCl,

buffer A (0.25 M LiCl, 1% NP-40, 1% deoxycholate, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 8.1), and twice with Tris-EDTA and eluted with 200  $\mu$ l of 1% SDS and 0.1 M NaHCO<sub>3</sub>. Cross-links were reversed by heating at 65°C for 4 h after adding NaCl to 200 mM final concentration. After treatment with proteinase K (50  $\mu$ g/ml) for 1 h at 37°C, DNA was purified using the GeneClean Turbo kit (Q-Biogene). RT-PCR analysis of inputs or immunoprecipitated DNAs was performed.

**Embryo care.** Embryos were staged and cared for according to standard protocols. Several stable transgenic fish lines were used: (1) foxd3::GFP, selectively expressing the green fluorescent protein (GFP) in myelinating Schwann cells under the control of the zFoxD3/fkd6 promoter (Gilmour et al., 2002); (2)  $\Delta$ TCF3 (hsp70:TCF-GFP), expressing an N-terminally truncated TCF3, a dominant repressor of Wnt-mediated transcription, and the GFP marker under the control of the zebrafish hsp70 promoter (Lewis et al., 2004); (3) HuC::GFP, specifically expressing GFP in neurons under the control of components of the HuC gene promoter (Park et al., 2000); and (4) olig2::EGFP, specifically expressing the enhanced green fluorescent protein (EGFP) in oligodendrocytes (H. Li, unpublished observations).

**Heat-shock activation of transgenes.** Transgenic  $\Delta$ TCF3 embryos were heat shocked at either 48 h postfertilization (hpf) or 3 d postfertilization (dpf) for 1 h at 37°C. Embryos were sorted out after nuclear GFP expression.

**In situ hybridization.** *In situ* hybridization was performed following standard protocols by using previously described MPZ, PLP, and MBP probes (Kazakova et al., 2006).

**Immunohistochemistry.** For immunostaining, embryos were fixed in 4% paraformaldehyde and stained as whole mounts. Anti-acetylated tubulin antibody was used at a dilution of 1:1000. Anti-phosphohistone H3 was used at a dilution of 1:200. Primary antibodies were detected with appropriate secondary antibodies conjugated to either Alexa 488 or Alexa 568 at a 1:200 dilution.

**Electron microscopy.** At 4 dpf and 6 hpf, embryos were fixed in 2% paraformaldehyde and 2% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer, pH 7.3. Following postfixation in cacodylate-buffered 1% w/v osmium tetroxide (OsO<sub>4</sub>; Johnson-Matthey), the tissue was dehydrated and embedded in medium Agar 100 epoxy resin (Agar Scientific). Ultrathin sections (80–90 nm) were taken in the region of 1 mm ( $\pm$ 0.5 mm) anterior to the end of the yolk sack extension. Sections were contrasted with saturated uranyl acetate solution and lead citrate and were examined and photographed using a 1010 electron microscope (JEOL) and digital camera (Gatan).

**Axon counting and analysis.** Montages of electron micrographs of the whole posterior lateral line nerves were made using Adobe Photoshop ( $n = 11$  nerves from 6 embryos for the control group and  $n = 12$  nerves from 6 embryos for the  $\Delta$ TCF3 group). Total numbers of unmyelinated axons, axons ensheathed with compacted Schwann cell lamellae, and axons ensheathed with uncompact Schwann cell lamellae were counted. Axons were defined as ensheathed if they had a 1:1 ratio with Schwann cell lamellae and had at least 1.5 wraps; if any part of the lamellae ensheathing the axon showed compaction, then the axon was counted as ensheathed with compact myelin. To allow for differences in section level between individuals, percentages of axons in the three groups were calculated, and differences were tested for significance using the Student's *t* test with Welch's correction taking  $p < 0.01$  as significant.

**Statistical analysis.** Unless specified otherwise, results are expressed as means  $\pm$  SEM. The means of two treatment groups were compared by the two-tailed Student's *t* test. For multiple group comparisons, one-way ANOVA followed by Tukey's test was used. \* $p < 0.05$  was considered statistically significant.

## Results

### Wnt/ $\beta$ -catenin signaling components are expressed in Schwann cells and peripheral myelin

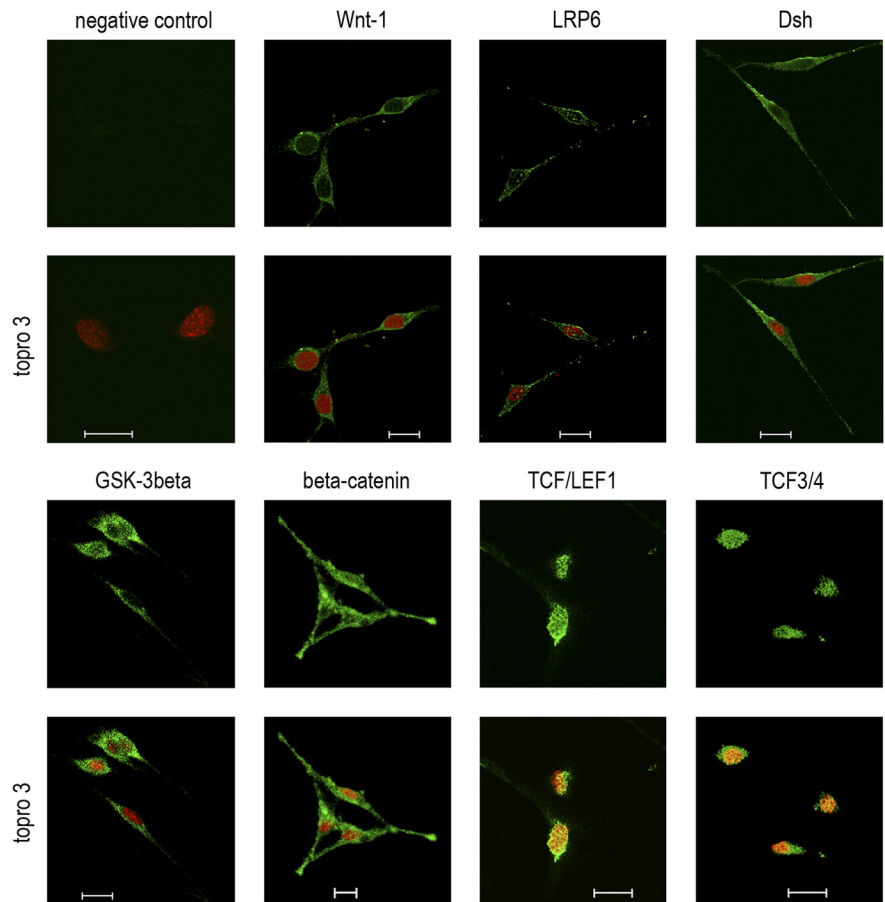
We showed that the major components of the canonical Wnt pathway (Wnt1, LRP6, DSH, GSK3 $\beta$ ,  $\beta$ -catenin, and TCF/LEF1) are expressed in the mouse MSC80 Schwann cell line (Fig. 1). Wnt1 and LRP6 showed a cytoplasmic and/or membrane local-

ization, DSH and GSK3 $\beta$  were cytoplasmic, and  $\beta$ -catenin was located in the cytoplasm, the nucleus, and the membrane. As expected, LEF1 or TCF3/4 was strictly nuclear. We have also confirmed the presence of the Wnt components in primary cultures of Schwann cells isolated from neonatal sciatic nerves (supplemental Fig. 1*b*, available at [www.jneurosci.org](http://www.jneurosci.org) as supplemental material).

We examined the expression of main Wnt ligands (Wnt1, Wnt3, Wnt3a, and Wnt7a) by qRT-PCR in the developing mouse sciatic nerve (Fig. 2*A*). Their mRNA levels accompanied the expression of the peripheral myelin genes MPZ and PMP22, and they were highest at P20. We have also analyzed the expression of major canonical Wnt pathway components at the same time points. LRP6, DSH1, DSH2, DSH3, TCF1, TCF3, and TCF4 expression was increased at P6 compared with P0 and then decreased at P20. LEF1 expression was maintained at the same levels at P6 and P20, whereas  $\beta$ -catenin transcript levels did not vary along the myelination process. We then performed immunohistochemical analysis of Wnt1 and of the main intracellular components of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in the mouse sciatic nerve at P7 and P21. At both stages, Wnt1, LRP6, GSK3 $\beta$ , and  $\beta$ -catenin were located, among other structures, in the myelin sheaths and colocalized with MBP immunoreactivity (Fig. 2*B*; see also supplemental Fig. 1*a*, available at [www.jneurosci.org](http://www.jneurosci.org) as supplemental material). We quantified the relative expression of each TCF/LEF family member in the sciatic nerves of adult mice and in primary Schwann cells. As shown in supplemental Figure 1*b* (available at [www.jneurosci.org](http://www.jneurosci.org) as supplemental material), TCF3 was the most expressed TCF/LEF family member in the sciatic nerve and primary Schwann cells. The other TCF/LEF members were all present, but less abundantly. The relative differences in TCF/LEF family member expression between P20 and adult sciatic nerves is most probably attributable to a developmental change. Thus, Wnt ligand and the major components of the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway are present in the myelin sheaths of developing peripheral nerves and in Schwann cells.

#### Wnt/ $\beta$ -catenin pathway is involved in the regulation of myelin gene promoter activity in Schwann cells

To determine whether the canonical Wnt signaling pathway is activated in MSC80 cells, we selectively inhibited the expression of LRP6, DSH,  $\beta$ -catenin, or TCF/LEF. The Schwann cell line was transiently transfected with a TCF/LEF reporter construct (TOP-Flash-luciferase), a positive control reading Wnt/ $\beta$ -catenin signaling activity, or with either MPZ or PMP22 promoter-luciferase constructs (MPZ-luc or PMP22-luc). Cotransfecting a dominant-negative expression vector either of LRP6 (LRP6 $\Delta$ C), which inhibits Wnt signaling at the level of its receptors (Tamai et al., 2000), or of DSH (DSH-dn) strongly inhibited the activity of the TOP-Flash reporter, showing the efficacy of the dominant-

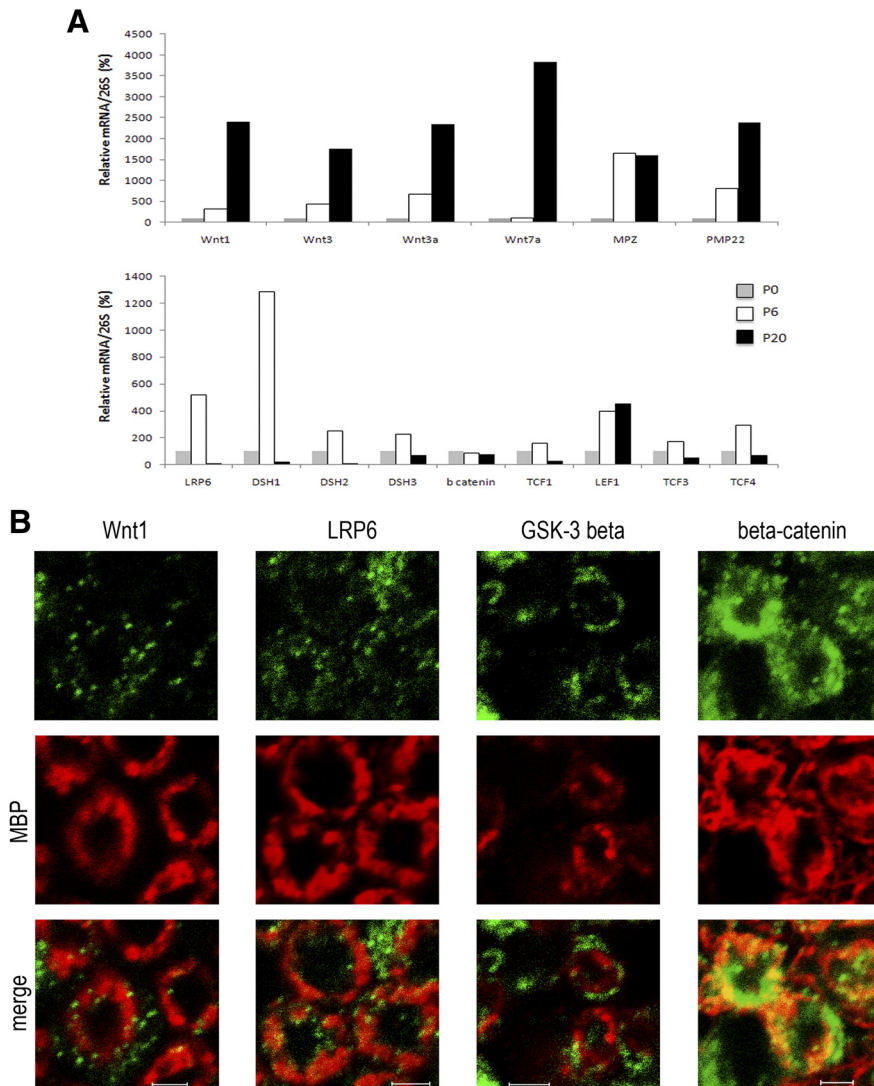


**Figure 1.** Localization of Wnt/ $\beta$ -catenin components in MSC80 mouse Schwann cell line. Immunocytochemistry experiments were performed by using primary antibodies directed against Wnt1, LRP6, DSH, GSK3 $\beta$ ,  $\beta$ -catenin, TCF/LEF1, and TCF3/4 (green). Nuclei were identified by means of TOPRO-3 DNA dye (red). The slides were analyzed with a confocal microscope. This experiment was repeated twice, and a typical experiment is presented here. Scale bar, 20  $\mu$ m.

negative mutants and demonstrating the functionality of the canonical Wnt pathway in MSC80 cells (Fig. 3*a,b*). LRP6 $\Delta$ C and DSH-dn also strongly inhibited the MPZ-luc and PMP22-luc reporter constructs. These findings suggest a role for LRP6 and DSH in the activation of myelin protein gene promoters.

The involvement of  $\beta$ -catenin in MPZ and PMP22 promoter activity in MSC80 cells was demonstrated by applying two strategies: either the overexpression of the active nuclear form of  $\beta$ -catenin or the knockdown of  $\beta$ -catenin expression by a specific siRNA. The efficacy of the siRNA was verified by  $\beta$ -catenin immunostaining (data not shown). Overexpression of nuclear  $\beta$ -catenin increased by fivefold the activity of the TOP-Flash and MPZ promoters and by threefold the PMP22 promoter activity. On the contrary, knocking down endogenous  $\beta$ -catenin expression resulted in an 80% reduction in TOP-Flash promoter activity and a 50–60% reduction in MPZ and PMP22 promoter activities (Fig. 3*c*).

We then evaluated the effect of the Wnt/ $\beta$ -catenin nuclear effectors TCF1, LEF1, TCF3, or TCF4 by knocking down their expression in the Schwann cell line with specific siRNA. The efficacy of each siRNA directed against a specific TCF was analyzed by qRT-PCR. Each siRNA significantly inhibited the cognate TCF without affecting the expression of the other TCF/LEF (supplemental Fig. 2*a*, available at [www.jneurosci.org](http://www.jneurosci.org) as supplemental material). The siRNA directed against each of the TCF/LEF resulted in a remarkable inhibition of TOP-Flash reporter activity



**Figure 2.** Expression and localization of Wnt components during sciatic nerve development. **A**, Total RNA from sciatic nerves of mice at different developmental stages (P0, P6, and P20) was prepared. qRT-PCR experiments were performed with primers specifically recognizing Wnt ligands (Wnt1, Wnt3, Wnt3a, Wnt7a), Wnt components (LRP6, DSH1, DSH2, DSH3,  $\beta$  catenin, TCF1, LEF1, TCF3, TCF4), or sequences of the peripheral myelin protein genes MPZ or PMP22. We used 26S proteasomal RNA (26S) to normalize the qRT-PCR data as the expression of 26S RNA was constant at P0, P6, and P21. We established a ratio for each RNA (Wnt1, Wnt3, Wnt3a, Wnt7a, MPZ, PMP22) relative to 26S rRNA at P0 ( $n = 3$ ). **B**, The spatial expression patterns of various members of the Wnt signaling pathway in sciatic nerve sections of mice aged 7 d. Myelin sheaths were stained with anti-MBP antibody (in red), and Wnt components were localized with antibodies against Wnt1, LRP6, GSK3 $\beta$ , and  $\beta$ -catenin (in green). The slides were analyzed with a confocal microscope. This experiment was repeated twice, and a typical experiment is presented here. The images shown represent 1  $\mu$ m of confocal Z sectioning. Scale bars, 2  $\mu$ m.

(Fig. 3*d*). Likewise, TCF3 or TCF4 knockdown inhibited MPZ promoter activity by 80%, whereas blocking TCF1 and LEF1 expression exerted a 50% inhibition (Fig. 3*d*). The knockdown of any of the four TCFs resulted in a 50% decrease in PMP22 promoter activity (Fig. 3*d*). Thus, the major components of the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway, upstream and downstream of  $\beta$ -catenin, are involved in peripheral myelin gene expression.

#### Exogenous Wnt ligand increases the expression of myelin protein gene expression in Schwann cells

We then determined whether exogenous Wnt may further increase peripheral myelin gene expression. We tested the effect of the Wnt ligands whose expression was enhanced during the myelination process (Fig. 2*A*) on MPZ and PMP22 gene expression.

First, MSC80 cells were incubated for 24 h with conditioned media containing Wnt1, Wnt3, Wnt3a, or Wnt7a. In all cases, the expression of a Wnt target gene (connexin 43) was activated in MSC80 cells indicating that the conditioned culture media contain Wnt ligands (data not shown). The expression of myelin genes (MPZ and PMP22) was analyzed by qRT-PCR. Wnt1, Wnt3, Wnt3a, and Wnt7a activated MPZ by 2- or 3-fold, whereas Wnt1, Wnt3, and Wnt3a stimulated PMP22 (1.5- and 2-fold) in MSC80 cells. Wnt7a did not enhance PMP22 (Fig. 4*a*).

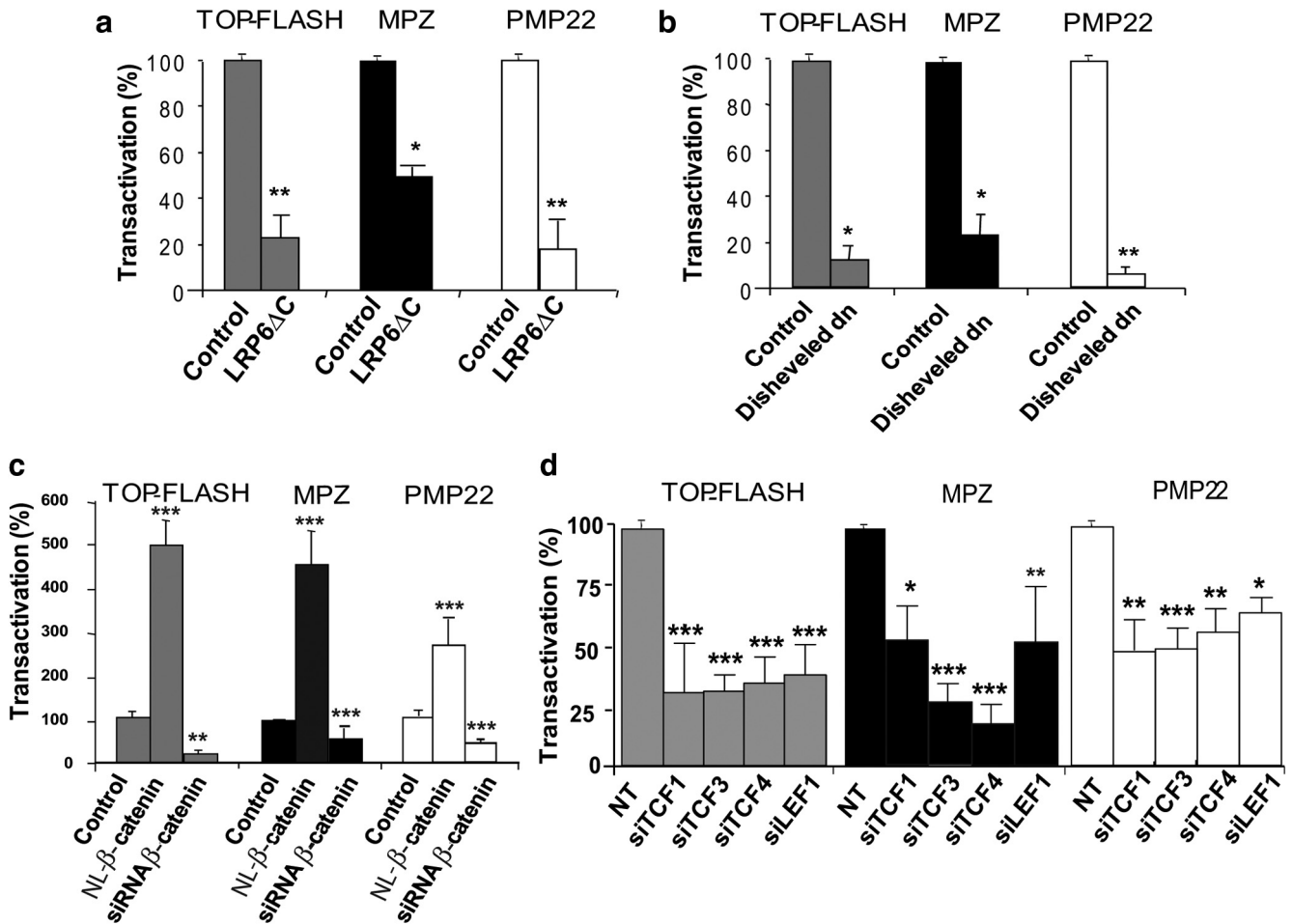
We then focused our work on Wnt1. Primary Schwann cells or MSC80 cells were incubated with recombinant Wnt1 for 1 h and harvested immediately after. As expected, Wnt1 significantly increases both MPZ and PMP22 transcripts at 1 h in primary Schwann cells and in MSC80 cells (Fig. 4*b*). Western blot analysis demonstrated a rapid (within 1 h) and marked increase in MPZ, PMP22, and  $\beta$ -catenin proteins in MSC80 cells, which lasted for up to 24 h of treatment with Wnt1 (Fig. 4*c*). Most important, treatment of MSC80 with Wnt1 modified neither the expression nor the phosphorylation state of Akt (data not shown).

To pinpoint the effects of Wnt1 treatment at the level of the mouse MPZ and PMP22 gene promoters, we located two potential TCF/LEF response elements at the level of the MPZ promoter (Fig. 4*d*). Chromatin immunoprecipitation (ChIP) analysis demonstrated that Wnt1 treatment enhanced twofold  $\beta$ -catenin recruitment by the TCF/LEF response elements located at  $-8487/-8471$  bp, but not by the second TCF/LEF response element ( $-5487/-5461$ ) (Fig. 4*e*). A potential TCF/LEF response element was also identified at position  $+107/+124$  of the PMP22 promoter, and ChIP analysis revealed that Wnt1 treatment also increased the recruitment of  $\beta$ -catenin at this site (Fig. 4*d,e*). These data show that Wnt ligand increases MPZ and PMP22 mRNA and protein levels

in the Schwann cell line via TCF transactivation.

#### Wnt/ $\beta$ -catenin pathway also drives myelin gene expression in oligodendrocytes

An important issue is whether Wnt signaling also activates myelin protein gene expression in oligodendrocytes, where the presence of Wnt/ $\beta$ -catenin pathway components has been reported previously and exerted a delay in the differentiation of OPCs (Fancy et al., 2009; Feigenson et al., 2009; Ye et al., 2009). We performed experiments with primary cultures enriched with either OPCs or oligodendrocytes. These cultures were incubated with Wnt1 or Wnt3a. Wnt1 and Wnt3a did not stimulate proteolipid protein gene (*plp*) expression in OPC-enriched cultures (data not shown). Interestingly, in oligodendrocyte-enriched cultures, Wnt1



**Figure 3.** Involvement of the Wnt signaling pathway in basal MPZ and PMP22 promoter activity. *a–c*, MSC80 cells were transiently transfected either with peripheral myelin protein gene promoter-luciferase constructs (MPZ-luc or PMP22-luc) or the TOP-Flash-Luc reporter of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling together with the following: *a*, a dominant-negative expression vector of LRP6 (LRP6 $\Delta$ C); *b*, a dominant-negative expression vector of DSH (DSH-dn); *c*, either a constitutive NL- $\beta$ -catenin expression vector or a siRNA directed against  $\beta$ -catenin. Twenty-four hours after transfection,  $\beta$ -galactosidase and luciferase activities were analyzed. Results represent the means  $\pm$  SEM of at least four independent experiments performed in duplicate. \* $p$  < 0.05; \*\* $p$  < 0.01; \*\*\* $p$  < 0.001, compared with control. *d*, MSC80 cells were transiently transfected with MPZ-Luc, PMP22-Luc, or TOP-Flash-Luc plasmids and with siRNA directed against the four TCFs or NT. Twenty-four hours after transfection,  $\beta$ -galactosidase and luciferase activities were analyzed. Results represent means  $\pm$  SEM of eight independent experiments performed in duplicate. \* $p$  < 0.05; \*\* $p$  < 0.01; \*\*\* $p$  < 0.001, by Tukey's *post hoc* test after one-way ANOVA, compared with the NT control.

and Wnt3a stimulated by 3.5-fold and 2-fold, respectively, the expression of *plp*, suggesting a differential role of the Wnt pathway during oligodendroglial development (Fig. 5a).

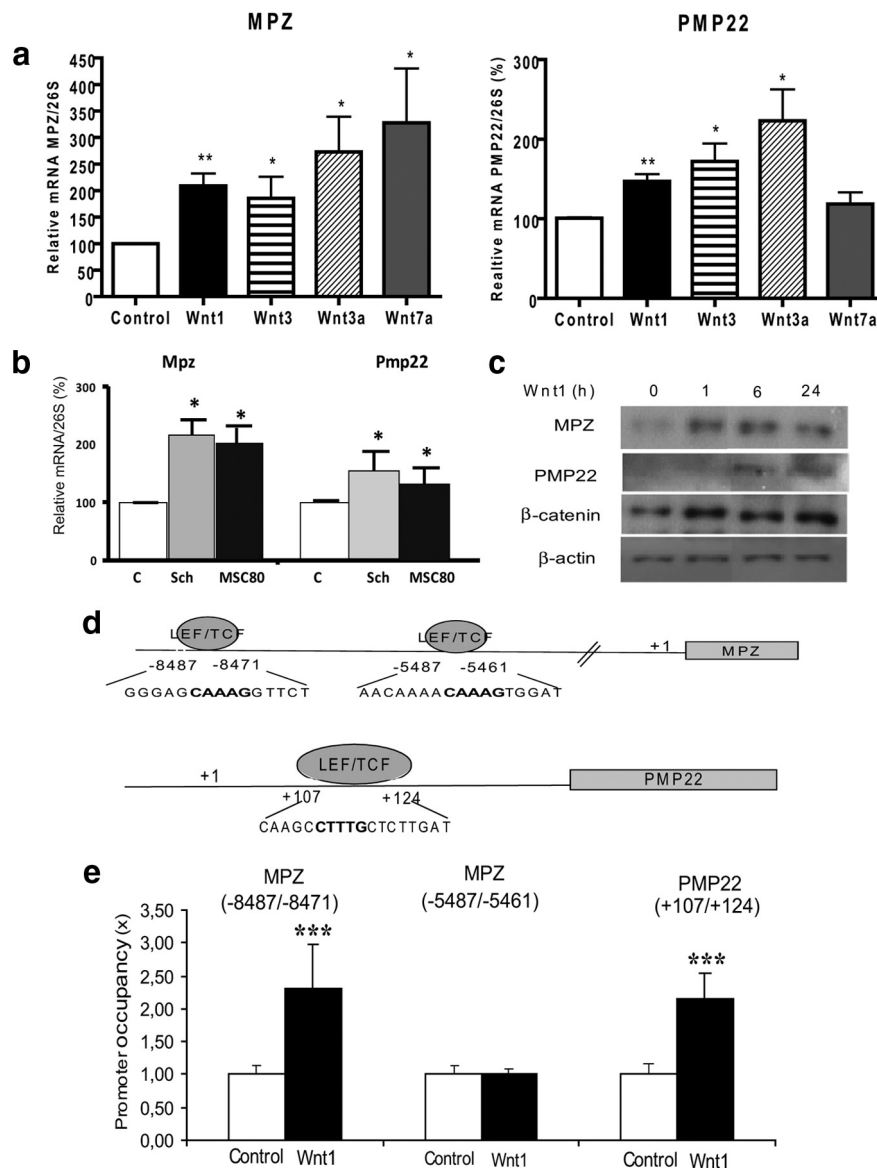
We also investigated in the mouse oligodendrocyte cell line 158N the implication of different components of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in the activation of the *plp* promoter. The oligodendrocyte cell line 158N expresses properties of oligodendrocytes, including specific markers, myelin proteins and myelin lipids. These cells thus provide a powerful model to explore oligodendrocyte functions. First, we showed that adding recombinant Wnt1, but not Wnt3a, to the culture medium stimulates *plp* expression (Fig. 5a). We then cotransfected the oligodendrocyte cell line with the TOP-Flash-luciferase or PLP promoter-luciferase (PLP-luc) constructs with or without LRP6 $\Delta$ C or DSH-dn. As in MSC80, both dominant-negative expression vectors strongly inhibited the activity of the TOP-Flash reporter, demonstrating the functionality of LRP6 and DSH in the oligodendrocyte cell line (Fig. 5b,c). Moreover, LRP6 $\Delta$ C and DSH-dn inhibited PLP promoter activity, indicating their critical involvement in PLP expression (Fig. 5b,c).

Consistent with an important role of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in oligodendrocyte myelination, knocking down  $\beta$ -catenin with siRNA inhibited TOP-Flash expression by 40% and PLP

promoter activity by 70% (Fig. 5d). Conversely, overexpression of nuclear-localized  $\beta$ -catenin enhanced PLP promoter activity by 2.3-fold (Fig. 5d). Downstream of  $\beta$ -catenin, all four TCF/LEF transcription factors are also expressed, but at different levels (supplemental Fig. 1b, available at [www.jneurosci.org](http://www.jneurosci.org) as supplemental material), in both 158N cells and oligodendrocytes, and their expression could be strongly inhibited by siRNA (supplemental Fig. 2b, available at [www.jneurosci.org](http://www.jneurosci.org) as supplemental material). The siRNA directed against each of the TCF/LEFs resulted in a remarkable inhibition of TOP-Flash reporter activity. Likewise, the knockdown of each TCF/LEF inhibited the activity of the PLP promoter by 60–70%, pointing to an important role of the transcription factors in PLP gene expression (Fig. 5e). These results demonstrate that Wnt/ $\beta$ -catenin signaling components also drive myelin gene expression in oligodendrocytes.

#### Interaction between $\beta$ -catenin and TCF3 is required for Schwann cell myelination *in vivo*

To demonstrate *in vivo* the significance of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling during developmental myelination, we used the zebrafish model, which allows the downregulation of specific components of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway at the onset of myelination. To



**Figure 4.** Effect of Wnt ligands on MPZ and PMP22 expression in Schwann cells. **a**, Conditioned media were prepared from MSC80 cells transfected with Wnt1, Wnt3, Wnt3a, or Wnt7a expression vectors. Forty-eight hours after the transfection, the culture media were collected and put on fresh MSC80 cells for 24 h. Total RNA was extracted, and qRT-PCR experiments were performed using primers recognizing MPZ or PMP22. The RT-PCR was normalized using 26S RNA. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ , by Tukey's *post hoc* test after one-way ANOVA, compared with control ( $n = 7$ ). **b**, Primary Schwann cells ( $n = 4$ ) or the MSC80 cell line ( $n = 8$ ) were incubated with Wnt1 ligand (5 ng/ml) for 1 h. Total RNA was extracted, and qRT-PCR experiments were performed using primers recognizing MPZ or PMP22. The RT-PCR was normalized using 26S RNA. \* $p < 0.05$ , by Student's *t* test, compared with control. **c**, MSC80 cells were incubated with recombinant Wnt1 (5 ng/ml) for 1, 6, or 24 h. Western blots were performed using anti-MPZ, anti-PMP22, or anti- $\beta$ -catenin antibodies to verify their expression.  $\beta$ -Actin was used to normalize the Western blots. These results were reproduced in three independent experiments, and a typical experiment is presented. **d**, Putative TCF/LEF binding sites located in MPZ or PMP22 genes were identified with MatInspector software (Genomatix). **e**, ChIP assays were performed on Schwann cell extracts treated or not with Wnt-1 for 4 h, by using C23 antibody as a nonrelevant antibody or using  $\beta$ -catenin antibody. qRT-PCR was performed with primers recognizing putative TCF/LEF binding sites located in MPZ or PMP22 genes. Results are the mean of at least five independent experiments. \*\*\* $p < 0.001$ , by Tukey's *post hoc* test after one-way ANOVA, compared with control.

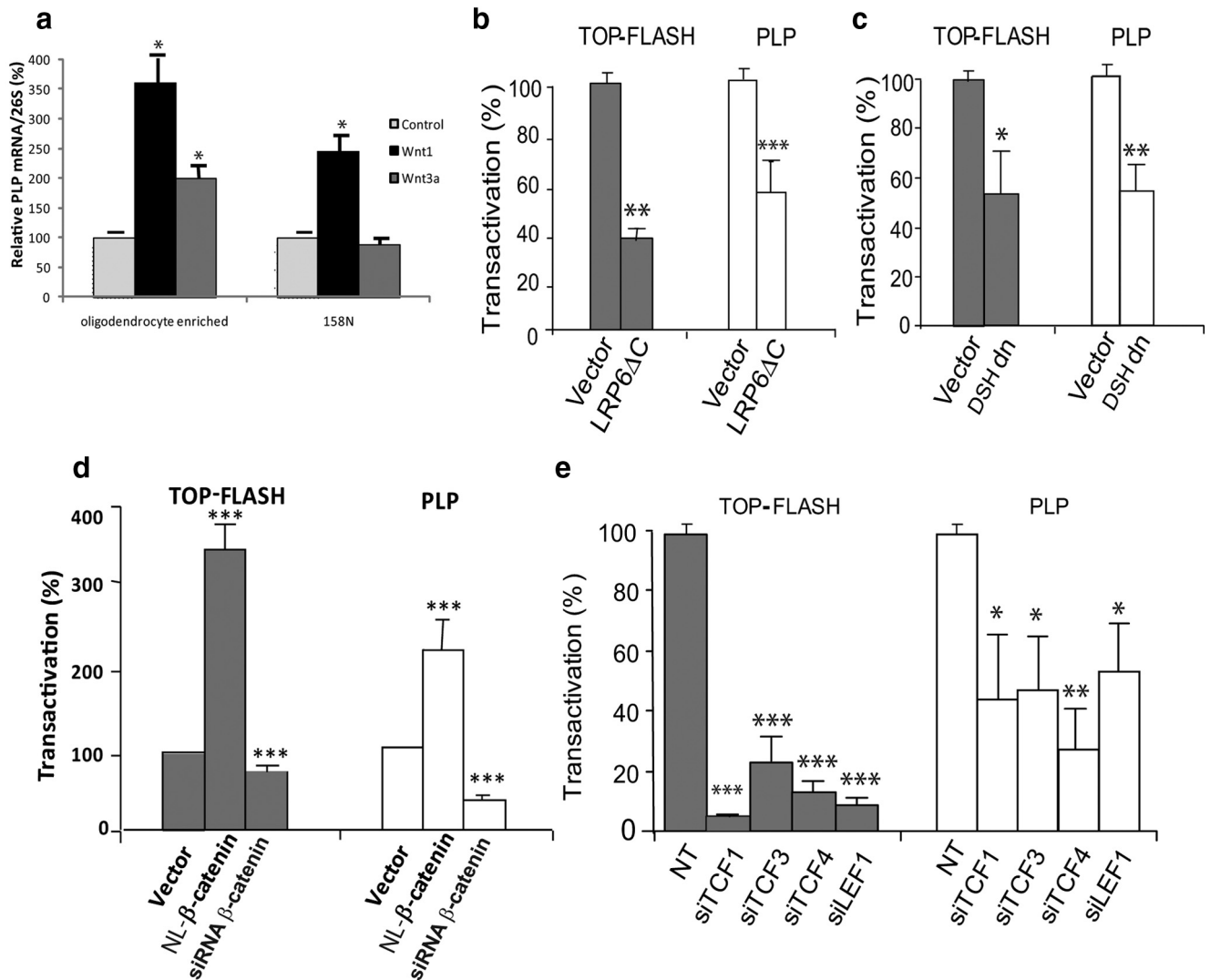
assess whether the transcriptional complex  $\beta$ -catenin/TCF is necessary for myelin gene expression in the Schwann cells of zebrafish embryos, we made use of the inducible transgenic line  $\Delta$ TCF3, which expresses a truncated form of TCF3 under the control of a heat shock promoter (hsp70; hsp70:TCF-GFP), preventing  $\beta$ -catenin from binding to TCF3 after a heat shock (Lewis et al., 2004). This transgenic line also expresses the GFP marker,

which can be seen in cell nuclei within 1 h after a heat shock. Embryos were heat shocked at 2 dpf, corresponding to the onset of zebrafish myelination, whereby oligodendrocytes and Schwann cells start expressing myelin genes (Brosamle and Halpern, 2002; Lyons et al., 2005). *mbp* mRNA expression, a widely used marker for the onset of myelination in zebrafish (Monk and Talbot, 2009), was analyzed at 4 or 5 dpf by *in situ* hybridization at the level of the peripheral lateral line (PLLn), where axons are solely myelinated by Schwann cells.

In control embryos (either wild-type or heat-shocked non-GFP), *mbp* mRNA was strongly expressed in PLLn Schwann cells at 5 dpf (Fig. 6a). However, after heat shock, *mbp* expression was either strongly reduced (Fig. 6b) or even absent ( $n = 25$  of 28) (Fig. 6c). Levels of *mbp* expression negatively correlated with the efficiency of inactivation, assessed by GFP expression (data not shown). To validate the *in situ* analysis and the specificity of the dysmyelinating phenotype, we also analyzed *mbp* expression by qRT-PCR at 4 dpf. We found a significant 40% reduction in *mbp* mRNA in heat-shocked embryos compared with controls, reflecting the mean reduction of embryos with complete or partial inhibition of TCF3/ $\beta$ -catenin interaction (supplemental Fig. 3a, available at [www.jneurosci.org](http://www.jneurosci.org) as supplemental material). These results indicate an essential role of  $\beta$ -catenin/TCF3 interaction in regulating *mbp* expression and thus a likely role in PNS myelination.

The deficiency in myelin can be mainly attributed to the lack in myelin gene expression but not to defects in axonal growth, because when heat-shocked embryos were labeled with acetylated tubulin, no changes in axonal labeling were observed between control (Fig. 6d) and  $\Delta$ TCF3 embryos (Fig. 6e) at 4 dpf. We also examined Schwann cell survival after heat shock by making use of the stable transgenic line *foxd3::GFP* (Gilmour et al., 2002), expressing GFP in myelinating Schwann cells. No differences in glial cell number and distribution were observed between controls (Fig. 6f) and  $\Delta$ TCF3 embryos (Fig. 6g). These data show that disrupting the interaction between  $\beta$ -catenin and TCF3 results in reduced *mbp* expression, without affecting axons or Schwann cells.

To assess whether  $\beta$ -catenin/TCF3 interaction continues to be required after the initiation of Schwann cell myelination, we heat shocked  $\Delta$ TCF3 embryos either at 2 or 3 dpf and examined *mbp* expression 2 d later. Results confirmed that *mbp* expression is strongly reduced when  $\beta$ -catenin/TCF3 interaction is disrupted at 2 dpf. In contrast, in  $\Delta$ TCF3 embryos heat shocked at 3 dpf,



**Figure 5.** Role of Wnt components in the basal expression of PLP in oligodendrocytes. **a**, Primary cultures enriched with oligodendrocytes or 158N oligodendrocyte cell line were incubated with Wnt1 (5 ng/ml) or Wnt3a (100 ng/ml) for 24 h. Total RNA was extracted, and qRT-PCR experiments were performed using primers recognizing PLP. The RT-PCR was normalized using 26S RNA. \* $p < 0.05$ , by Tukey's *post hoc* test after one-way ANOVA, compared with control ( $n = 5$ ). **b–d**, 158N oligodendrocytes were transiently transfected with 0.2  $\mu$ g of the PLP promoter-luciferase construct (PLP-Luc) or the TOP-Flash-Luc reporter of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling, 0.1  $\mu$ g of pRSV- $\beta$ -galactosidase plasmids, with or without a dominant-negative expression vector of LRP6 (LRP6 $\Delta$ C; **b**), a dominant-negative expression vector of DSH (DSH-dn; **c**), and either a constitutive nuclear-localized  $\beta$ -catenin (NL- $\beta$ -catenin) expression vector or an siRNA directed against  $\beta$ -catenin (**d**). Forty-eight hours after transfection,  $\beta$ -galactosidase and luciferase activities were analyzed. Results are expressed as the induction over the basal activity and represent the mean  $\pm$  SEM of at least four independent experiments performed in duplicate when compared with control. **e**, 158N oligodendrocytes were transiently transfected with PLP-Luc or TOP-Flash-Luc plasmids and with siRNA directed against one of the four TCFs or NT as indicated. Forty-eight hours after transfection,  $\beta$ -galactosidase and luciferase activities were analyzed. Results are expressed as the induction over the basal activity and represent the mean  $\pm$  SEM of at least four independent experiments performed in duplicate. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ , by Tukey's *post hoc* test after one-way ANOVA, compared with NT controls.

*mbp* expression was not affected compared with controls (supplemental Fig. 3*b*, available at [www.jneurosci.org](http://www.jneurosci.org) as supplemental material). Thus,  $\beta$ -catenin/TCF3 interaction is primarily required before 3 dpf for the onset of *mbp* expression.

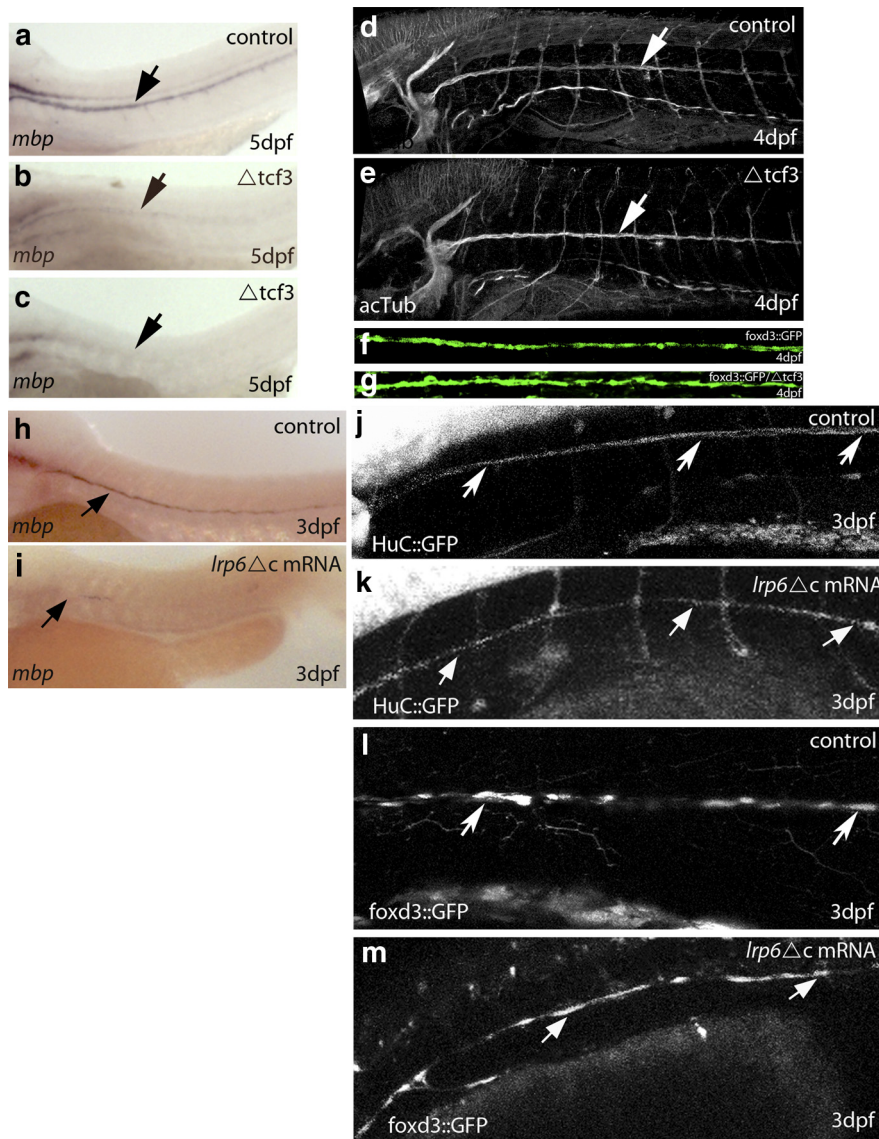
#### Wnt/ $\beta$ catenin pathway is required for *mbp* expression in the PNS

How did the dysmyelinating phenotype result from altered  $\beta$ -catenin/TCF3 interaction in zebrafish Schwann cells? In embryos injected with 250–300 pg of a dominant-negative construct of LRP6 (LRP6 $\Delta$ C), *mbp* expression at the level of the PLLn was severely reduced in 67% of the LRP6 $\Delta$ C-injected embryos at 3 dpf (Fig. 6*i*) compared with controls (Fig. 6*h*). In this experiment, embryos were already analyzed at 3 dpf, as qRT-PCR analysis

showed that the efficiency of the injected mRNA drops from 2 dpf onward (data not shown).

The pattern of PLLn axons was not affected by the amount of LRP6 $\Delta$ C injected in HuC::GFP embryos, which specifically express GFP in neurons under the control of components of the HuC gene promoter (Park et al., 2000). Most LRP6 $\Delta$ C-injected HuC::GFP embryos had a normal PLLn (11 of 15 embryos) (Fig. 6*j,k*). Moreover, the use of *foxd3*::GFP embryos demonstrated that the development of Schwann cells was not affected by the amount of LRP6 $\Delta$ C injected. Indeed, 80% of the injected embryos ( $n = 10$  of 12) showed a normal temporal development and survival of Schwann cells (Fig. 6*l,m*). Canonical Wnt signaling is required for cell proliferation (Megason and McMahon, 2002), and Schwann cell proliferation is essential for myelination (Lyons





**Figure 6.** Analysis of Schwann cell myelination in  $\Delta$ TCF3 zebrafish embryos and after LRP6 knockdown in the peripheral lateral line. **a**, Lateral view of *mbp* RNA expression in a control embryo at 5 dpf. *mbp*-expressing cells are seen along the PLLn (arrow;  $n = 60$ ). **b**, Lateral view of MBP RNA expression in  $\Delta$ TCF3 embryos at 5 dpf, heat shocked at 48 hpf. The arrow indicates *mbp*-expressing cells along the PLLn. **c**, Lateral view of *mbp* RNA expression in  $\Delta$ TCF3 embryos showing a more severe phenotype (almost no *mbp* expression) at 5 dpf, heat shocked at 48 hpf. **d**, Lateral view of acetylated tubulin-expressing axons of the PLLn (arrow) in control at 4 dpf. **e**, Lateral view of acetylated tubulin-expressing axons of the PLLn (arrow) in a  $\Delta$ TCF3 embryo at 4 dpf, heat shocked at 48 hpf. Axonal growth is similar to control ( $n = 10$  per group). **f**, **g**, Confocal images of foxd3::GFP-expressing Schwann cells at 4 dpf in control embryo (**f**;  $n = 10$ ) and in  $\Delta$ TCF3 embryo (**g**;  $n = 18$ ) heat shocked at 48 hpf. No significant differences were observed between controls and  $\Delta$ TCF3 embryos in Schwann cell distribution and survival. **h**, Lateral view of *mbp* RNA expression in control embryo at 3 dpf. The arrow indicates *mbp*-expressing cells along the PLLn ( $n = 40$ ). **i**, Lateral view of *mbp* RNA expression in a LRP6 $\Delta$ C-injected embryo at 3 dpf. The arrow indicates *mbp*-expressing cells along the PLLn. *mbp* RNA expression is significantly reduced compared with control ( $n = 19/28$ ). **j**, Lateral view of a HuC::GFP embryo expressing GFP in neurons showing PLLn (arrows). **k**, Embryo injected with LRP6 $\Delta$ C. Axonal growth is similar to controls. **l**, Lateral view of foxd3::GFP embryo expressing GFP in Schwann cells (arrows). **m**, Embryo injected with LRP6 $\Delta$ C.

et al., 2005). We thus asked whether LRP6 $\Delta$ C might affect myelin gene expression in a proliferation-dependent manner. In foxd3::GFP embryos, mitotic PLLn Schwann cells were stained with anti-phospho-H3, a marker of proliferating cells. Injection of LRP6 $\Delta$ C mRNA did not affect the number of proliferating Schwann cells at 3 dpf ( $p > 0.1$ ,  $t = 1.76$ ; controls: average, 26.75;  $n = 6$ ; LRP6 $\Delta$ C: average, 23.33;  $n = 6$ ). Together, our data suggest that the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway is essential for the onset of Schwann cell myelination and the expression of myelin genes,

independently of axonal growth, Schwann cell migration, and proliferation.

### Interaction between $\beta$ -catenin and TCF3 is required for peripheral myelin formation

We examined the ultrastructure of PLLn nerves in  $\Delta$ TCF3 embryos by transmission electron microscopy. Our previous results indicated that, although Schwann cells develop normally in heat-shocked  $\Delta$ TCF3 embryos at 2 dpf, they fail to express myelin genes, suggesting that they may be arrested at a promyelinating stage.

At 5 dpf, the multiple axons of the PLLn were surrounded by membrane wraps in both control and  $\Delta$ TCF3 embryos (Fig. 7A–D). Although there appeared to be fewer enwrapped axons in  $\Delta$ TCF3 embryos, this difference was not measurably significant; however, there was a striking difference in the quality of the myelin lamellae between groups. There were significantly fewer PLLn axons surrounded by compacted membrane lamellae in  $\Delta$ TCF3 embryos (Fig. 7E). Also, a significantly larger percentage of axons were ensheathed by lamellae that appeared to have stalled after enwrapment and had not progressed to the compaction stage (Fig. 7F). These observations suggest a failure in the normal progression of myelin formation in  $\Delta$ TCF3 embryos leading to hypomyelination. This is consistent with a crucial role for the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in the early steps of myelin formation.

### Interaction between $\beta$ -catenin and TCF3 is required for the formation of central myelin

We examined the expression of myelin genes in the CNS of zebrafish transgenic line  $\Delta$ TCF3. Embryos were heat shocked at 2 dpf, and myelin gene expression was assessed by *in situ* hybridization at 5 dpf. *mbp* mRNA was also strongly reduced or even absent in oligodendrocytes of the CNS, pointing to the involvement of the Wnt pathway in CNS myelination (Fig. 8a–c). We also examined *mpz* and *plp* mRNA, which are specifically expressed in the zebrafish CNS. Their expression was severely reduced or even absent ( $n = 23$  of 32) in  $\Delta$ TCF3 embryos compared with controls (Fig. 8d–i). The *in situ* hybridization data were also validated by qRT-PCR at 4 dpf (supplemental Fig. 3c, available at [www.jneurosci.org](http://www.jneurosci.org) as supplemental material).

It has been previously shown that Wnt signaling delays oligodendrocyte differentiation (Kim et al., 2008; Fancy et al., 2009). We thus examined whether heat shocking  $\Delta$ TCF3 embryos resulted in defective myelin gene expression because of altered oligodendrocyte development. We made use of the stable transgenic line olig2::EGFP, which selectively expresses GFP in oligodendrocytes and their precursors (Li, unpublished observations). No

differences in oligodendrocyte development and distribution were observed between  $\Delta$ TCF3 and control embryos (Fig. 9*a,b*). More important, the cell bodies and their extensions appeared normal (Fig. 9*c,d*), and the number of cells counted on confocal sections in the same area of the hindbrain did not vary between controls (average, 30;  $n = 5$ ) and  $\Delta$ TCF3 embryos (average, 30.5;  $n = 5$ ;  $p > 0.1$ ). Labeling embryos with acetylated tubulin revealed that axonal growth was also not affected in  $\Delta$ TCF3 embryos (Fig. 9*e–j*). Together, these data indicate that defects in CNS myelination observed in  $\Delta$ TCF3 embryos are related to decreased myelin gene expression, rather than to altered axonal or oligodendroglial development.

As described above, Wnt signaling is required for *mbp* expression before 3 dpf. To extend this analysis to other myelin genes in the brain, we examined *mpz* and *plp* expression at 5 dpf in  $\Delta$ TCF3 embryos heat shocked either at 2 or 3 dpf. We confirmed by qRT-PCR that the expression of both myelin protein mRNA are markedly reduced when embryos are heat shocked at 2 dpf. However, in contrast to *mbp*, *mpz* and *plp* expression continues to be reduced by heat shocking  $\Delta$ TCF3 embryos as late as 3 dpf (Fig. 8*j–m*). These results show that  $\beta$ -catenin/TCF3 interaction is required for *mpz* and *plp* expression during a more extended period in oligodendrocytes when compared with *mbp* expression.

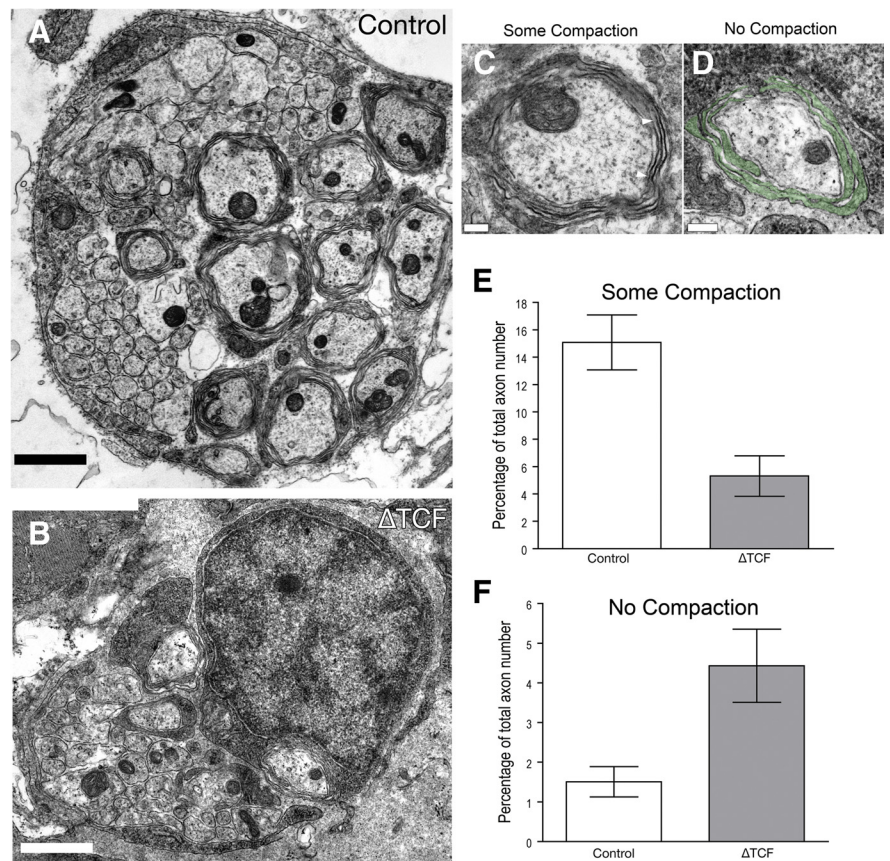
We also tested the requirement of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway for CNS myelination by injecting LRP6 $\Delta$ C, the dominant-negative form of LRP6. When compared with control embryos (Fig. 8*n*), *mpz* and *plp* expression was reduced in 60% of the LRP6 $\Delta$ C-injected embryos (Fig. 8*o*), showing normal oligodendrocyte development and axonal growth (data not shown). Together, our data demonstrate that the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway plays an essential role in myelin gene expression and in the onset of both oligodendrocyte and Schwann cell myelination *in vivo*.

## Discussion

Although recent studies have examined the role of  $\beta$ -catenin signaling in oligodendrocyte development, we investigated the role of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in myelin gene expression and myelination. This was motivated by our previous finding of a Schwann cell-specific cross talk between  $\beta$ -catenin and steroid signaling (Fonte et al., 2005). Our results show that Wnt/ $\beta$ -catenin signaling is a forward driver of myelin gene expression and myelin compaction.

### Components of the canonical Wnt signaling pathway drive myelin gene expression in Schwann cells and oligodendrocytes

We first showed that major components of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway colocalize with MBP immunoreactivity in the developing mouse sciatic nerve during the developmental period of my-

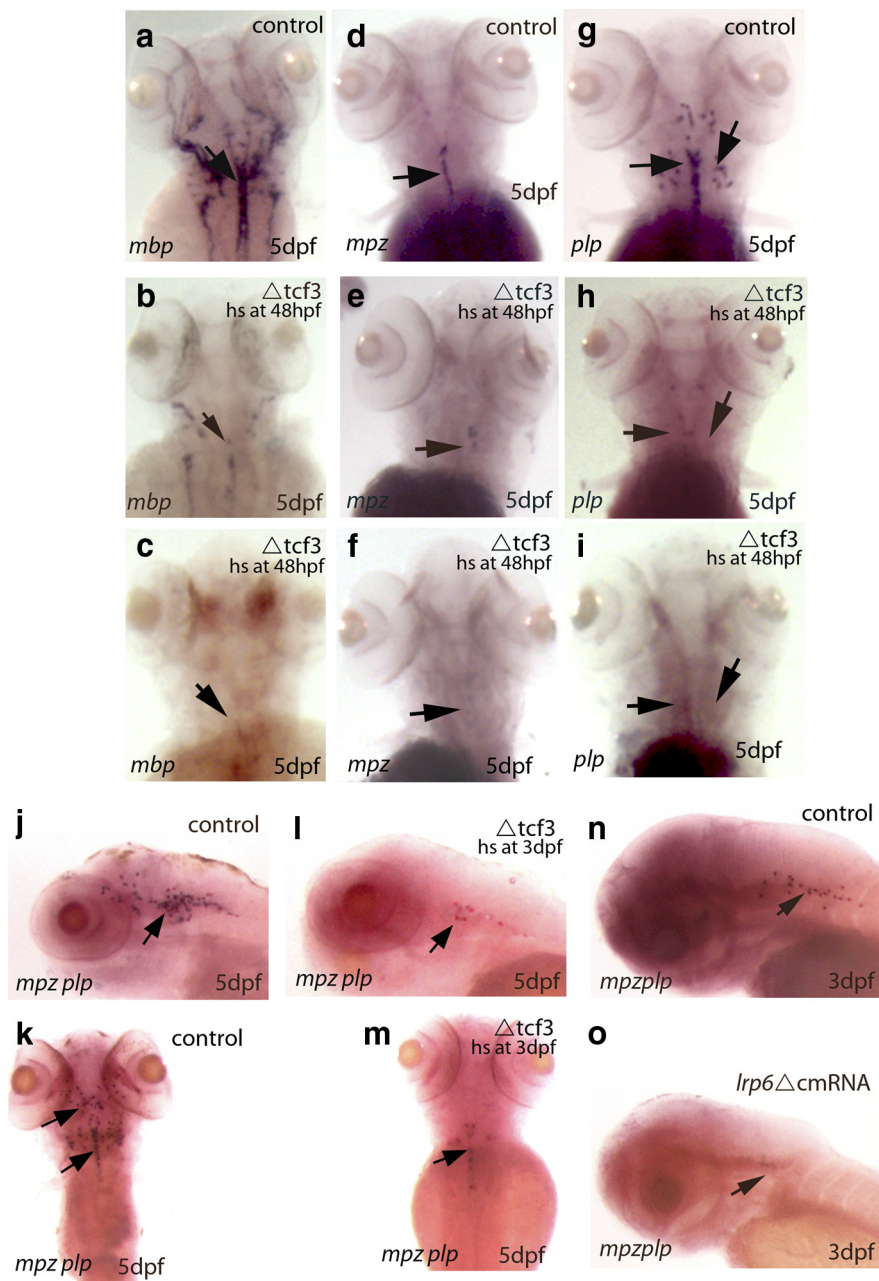


**Figure 7.** Schwann cells surround but do not myelinate axons in  $\Delta$ TCF3 zebrafish embryos. **A**, A cross section through the PLLn of a control embryo at 4 dpf and 6 hpf. Multiple axons are surrounded by membrane wraps. **B**, A cross section through the PLLn of a  $\Delta$ TCF3 embryo PLLn at 4 dpf and 6 hpf and heat shocked at 48 hpf. **C**, High-power image of a control axon wrapped by several myelin lamellae that contain “some compaction.” The compacted lamellae are particularly clear in the lamellae covering the area between the arrowheads (thick, dark-stained lamellae). **D**, High-power image of a  $\Delta$ TCF3 axon showing Schwann cell lamellae surrounding an axon (pseudocolored green). In contrast to the axon shown in **c**, these lamellae remain cytoplasmic and have not compacted to form the dark-stained compact lamellae. This is an example of an axon that was counted as having “no compaction” for quantification. Scale bars: **A, B**, 1  $\mu$ m; **C, D**, 200 nm. **E**, Quantification of the axons showing some compaction of myelin lamellae at 4 dpf and 6 hpf. The bars illustrate the percentage of axons ensheathed by processes with some compact lamellae in control embryos and  $\Delta$ TCF3 embryos heat shocked at 48 hpf. A significant difference was found between control embryos (11 nerves from six embryos) and  $\Delta$ TCF3 embryos (12 nerves from six embryos) (means  $\pm$  SEM;  $p < 0.01$ ). Images were scored blindly. **F**, Quantification of axons showing no compaction of myelin lamellae at 4 dpf and 6 hpf. The bars illustrate the percentage of axons ensheathed by lamellae without compaction lamellae in control embryos and  $\Delta$ TCF3 embryos heat shocked at 48 hpf. A significant difference was found between control embryos (11 nerves from six embryos) and  $\Delta$ TCF3 embryos (12 nerves from six embryos) (means  $\pm$  SEM;  $p < 0.01$ ). Images were scored blindly.

elination. Moreover, mRNA levels of Wnt ligands and major components (LRP6, DSH,  $\beta$ -catenin, TCF/LEF) correlate with those of peripheral myelin genes. Two observations point to a key role for Wnt signaling in Schwann cell myelination: (1) Schwann cells express Wnt ligand; and (2) the canonical Wnt signaling pathway is functional in Schwann cells, even in the absence of added Wnt ligand.

However, although endogenous Wnt is sufficient for myelin gene expression in Schwann cells, the addition of some Wnt ligands further increased MPZ and PMP22 mRNA and protein levels. This has allowed us to demonstrate the recruitment of  $\beta$ -catenin by TCF transcription factors at the level of the MPZ and PMP22 promoters by ChIP analysis. Interestingly,  $\beta$ -catenin expression was also upregulated by exposing the Schwann cell line to Wnt, pointing to a positive regulatory loop in Schwann cell Wnt/ $\beta$ -catenin signaling (Fig. 4*c*).

Although peripheral and central myelin sheaths share many similarities, there are structural differences, and they differ in lipid composition and protein content. Moreover, signaling mol-



**Figure 8.** Analysis of oligodendrocyte myelination in  $\Delta$ TCF3 zebrafish embryos and after LRP6 knockdown in the brain. *a, d, g*, Dorsal views of *mbp* (left), *mpz* (middle), and *plp* (right) RNA expression (arrows) in the hindbrain of control embryos at 5 dpf ( $n = 66$  of 70). *b, e, h*, *mbp*, *mpz*, and *plp* RNA expression in the hindbrain of  $\Delta$ TCF3 embryos at 5 dpf, heat shocked at 48 hpf. A significant decrease in the expression of *mbp*, *mpz*, and *plp* is observed between controls and  $\Delta$ TCF3 embryos. *c, f, i*, *mbp*, *mpz*, and *plp* RNA expression in the hindbrain of  $\Delta$ TCF3 embryos at 5 dpf, heat shocked at 48 hpf, showing a more severe phenotype (almost no *mbp*, *mpz*, and *plp* expression). *j, k*, Lateral (*j*) and dorsal (*k*) views of both *mpz* and *plp* RNA expression in the hindbrain of control embryos at 5 dpf, indicated by arrows. *l, m*, Lateral (*l*) and dorsal (*m*) views of both *mpz* and *plp* RNA expression in the hindbrain of  $\Delta$ TCF3 embryos at 5 dpf, heat shocked at 3 dpf. A significant decrease in both *mpz* and *plp* expression is observed ( $n = 29$  of 35). *n*, Lateral view of both *mpz* and *plp* RNA expression in control embryos at 3 dpf ( $n = 30$ ). *o*, Lateral view of both *mpz* and *plp* RNA expression in LRP6 $\Delta$ C-injected embryos at 3 dpf ( $n = 20$ ). A marked decrease in both *mpz* and *plp* expression is observed between controls and injected embryos. hs, Heat shocked.

ecules can have fundamentally different roles in peripheral and central myelination (Chan et al., 2004). Our results show that the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway is also an essential driver of myelin gene expression in oligodendrocytes and thus identify Wnt as a key regulator of myelin genes in both the PNS and CNS.

The knockdown of  $\beta$ -catenin expression by specific siRNA resulted in a noticeable reduction of MPZ and PMP22 promoter

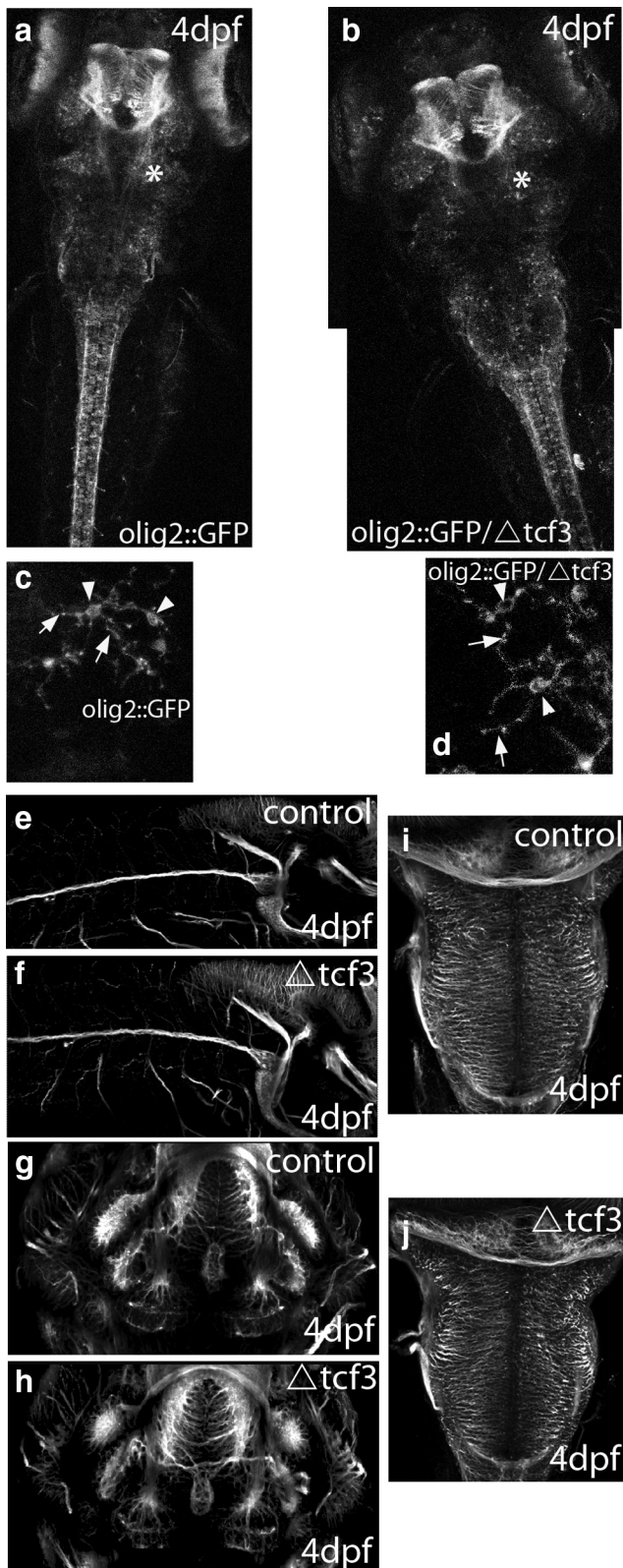
activities in the Schwann cell line and of PLP promoter activity in the oligodendrocyte cell line. However, linking  $\beta$ -catenin inhibition to canonical Wnt signaling requires a demonstration that Wnt activity upstream the TCF is involved in myelin gene expression. These evidences were obtained by inhibiting LRP6 and DSH with dominant-negative mutants and by knocking down TCF with specific siRNA. All these loss-of-function strategies resulted in the inhibition of myelin gene promoter activity.

### Canonical Wnt signaling is necessary to drive myelination *in vivo*

A key role for the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in PNS and CNS myelination was demonstrated by loss-of-function strategies in zebrafish embryos, which has become a powerful model to assess myelination in living embryos (Lyons et al., 2005; Kirby et al., 2006; Buckley et al., 2008). That is, most of the critical molecular machinery of myelination is conserved between zebrafish and mammals (Monk and Talbot, 2009). Most important, the zebrafish model allows us to precisely study signaling mechanisms at the onset of myelination.

The binding of  $\beta$ -catenin to TCF3 was disrupted in the inducible transgenic zebrafish line  $\Delta$ TCF3 by heat shock, and Wnt signaling upstream of  $\beta$ -catenin was inhibited by injecting embryos with a dominant-negative construct of LRP6 (LRP6 $\Delta$ C). In Schwann cells, the impact of Wnt impairment at 2 dpf on myelination was based on (1) the inhibition of myelin gene expression and (2) an arrest of myelin formation at a very early stage of axonal wrapping. Moreover, the extent and severity of the generated phenotypes were dependent on the degree of Wnt pathway inactivation, and this was true for the transcriptional function of  $\beta$ -catenin (TCF) and for Wnt receptor (LRP6) activity. However, the rate of Schwann cell proliferation was not affected in LRP6 $\Delta$ C-injected embryos, contrary to embryos with reduced  $\beta$ -catenin (Gess et al., 2008), a difference that might be related to  $\beta$ -catenin being at the crossroad of several pathways including Wnt/ $\beta$ -catenin and serine/threonine kinase Akt.

Together, these results suggest that Wnt/ $\beta$ -catenin signaling can modulate myelin gene expression in Schwann cells independently of cell proliferation. Similarly to Schwann cells, oligodendrocyte myelination was severely affected by preventing the interaction between  $\beta$ -catenin and TCF3 or by inhibiting LRP6. Thus, the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway is also required for myelin formation by oligodendrocytes. Most important, disrupting Wnt signaling inhibited myelination in the different compartments of the nervous system without affecting axons and the



**Figure 9.** Phenotypic analyses of  $\Delta$ TCF3 embryos in the brain. *a, b*, Confocal images of olig2::GFP embryos at 4 dpf in control embryos (*a*;  $n = 10$  of 10) and  $\Delta$ TCF3 embryos (*b*;  $n = 9$  of 10) heat shocked at 48 hpf. The overall pattern of olig2 expression is similar between controls and  $\Delta$ TCF3 embryos. *c, d*, Magnified view of oligo2-expressing cells from the hindbrain area (indicated by an asterisk in *a* and *b*) of control embryos (*c*) and  $\Delta$ TCF3 embryos (*d*) heat shocked at 48 hpf. Arrowheads indicate the bodies of these cells, and arrows point to their extensions. No significant difference in olig2::GFP cell development, survival, and morphology is observed between controls and  $\Delta$ TCF3 embryos. *e, g, i*, Confocal images of lateral (*e*), ventral

generation of Schwann cells or oligodendrocytes. Because of a lack of specific OPC markers in zebrafish, and since olig2 is expressed in both oligodendrocytes and their precursors, it is not conceivable to call the olig2::GFP/ $\Delta$ TCF3 cells as classical OPCs or oligodendrocytes. Although they have the same morphology as oligodendrocytes in control embryos, they do not express myelin genes, and they are more likely to be oligodendrocyte-like cells arrested at a promyelinating stage.

How does Wnt signaling regulate myelin gene expression in Schwann cells and oligodendrocytes? Our *in vivo*  $\Delta$ TCF3 and LRP6 $\Delta$ C analyses are not specifically restricted to these two lineages, therefore we cannot rule out that the phenotype we observe is related to a cross talk between neurons and myelinating cells. However, taking our *in vivo* and *in vitro* results together, we suggest that the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway regulates myelination, at least in part, by driving myelin gene expression in Schwann cells and oligodendrocytes.

Another finding was that the  $\beta$ -catenin/TCF3 interaction is primarily required for *mbp* expression in oligodendrocytes and Schwann cells at the time when they start myelinating axons, precisely before 3 dpf (Brosamle and Halpern, 2002). Consistent with a crucial role for Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in the very early steps of Schwann cell myelination was the failure to form compacted myelin sheaths in embryos with early disruption of TCF function. However, our results suggest that  $\beta$ -catenin/TCF3 interaction may be required for *mpz* and *plp* expression during a more extended period in oligodendrocytes. This may not be particularly related to differences between PNS and CNS myelination as *mbp* is expressed in the PNS and CNS in zebrafish and is downregulated in both tissues after  $\Delta$ TCF3 heat shock, but more probably to differences in the regulation of myelin genes: *mbp* versus *mpz* and *plp*.

#### Roles of canonical Wnt signaling in oligodendrocyte maturation and myelination

Three recent studies have addressed the potential role of Wnt signaling in oligodendrocyte development. Constitutive activation of  $\beta$ -catenin or inhibition of Adenomatous Polyposis Coli expression, resulting in the stabilization of  $\beta$ -catenin, delayed oligodendrocyte differentiation (Fancy et al., 2009; Feigenson et al., 2009). Likewise, the constitutive stabilization and nuclear translocation of  $\beta$ -catenin in cells of the oligodendrocyte lineage had a negative influence on oligodendrocyte maturation. However, the targeted disruption of TCF7L2 in mice led to severe defects in oligodendrocyte differentiation but not specification (Ye et al., 2009). Based on these findings, the consensus has emerged that canonical Wnt signaling may exert a repressive effect on oligodendrocyte differentiation and on myelination. When interpreting the results of the previous studies, the following points should be taken into consideration: (1) experiments based on the disruption of TCF function are consistent with a key role of  $\beta$ -catenin signaling in oligodendrocyte differentiation similar to our findings; (2) constitutive activation of  $\beta$ -catenin signaling may result in the dysregulation of gene expression; and (3) the Wnt signaling components so far examined in oligodendrocyte development ( $\beta$ -catenin, APC, and TCF) are all shared

←

(*g*), and dorsal (*i*) views of olig2::GFP at 4 dpf. *f, h, j*, Confocal images of lateral (*f*), ventral (*h*), and dorsal (*j*) views of olig2::GFP/ $\Delta$ TCF3 embryos at 4 dpf, heat shocked at 48 hpf. No significant difference in axonal growth and patterning was observed between controls and  $\Delta$ TCF3 embryos.

between the canonical Wnt and other major signaling pathways, in particular the PI3/AKT pathway (Nelson and Nusse, 2004; Ding et al., 2007; Blankesteyn et al., 2008; Welters and Kulkarni, 2008).

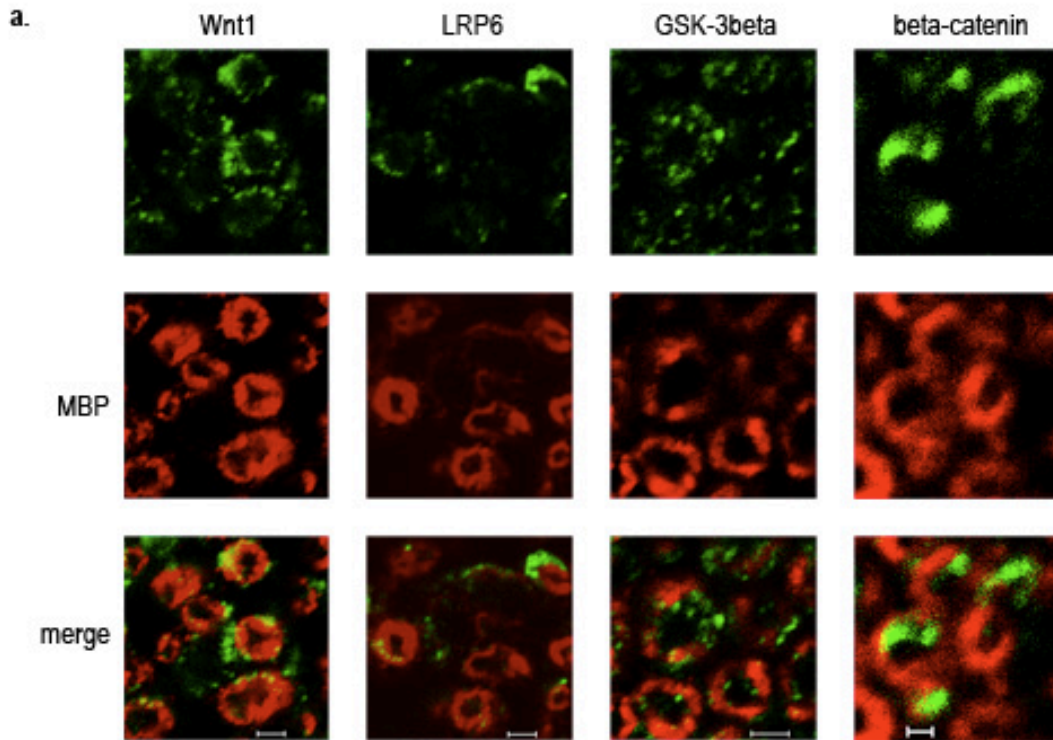
In immature OPCs isolated from neonatal rat brain, Wnt does not activate myelin gene expression. However, at a more differentiated stage, Wnt signaling becomes stimulating. This is consistent with our observation that Wnt increases PLP expression in mature oligodendrocytes in primary cultures and in 158N cells, which express characteristics of mature oligodendrocytes.

This discrepancy could be explained by different functions of canonical Wnt signaling during oligodendrocyte specification, differentiation, and the process of myelination. It is definitely well established that signaling systems can exert different actions at distinct developmental stages (Woodhoo et al., 2009). For example, Kalani et al. (2008) have demonstrated that Wnt signaling is required to generate oligodendrocytes from neural stem cells, whereas others (Fancy et al., 2009; Ye et al., 2009) show a delay in oligodendrocyte differentiation in cultures derived from OPCs or when activating  $\beta$ -catenin from early stages. Finally, here we demonstrate that the inhibition of canonical Wnt signaling in oligodendrocytes impairs the onset of myelin formation via the failure of myelin genes to be activated. Therefore, the Wnt pathway may regulate the myelination process differentially at each step of this complex process. Our findings thus contribute to a clearer understanding of the fine-tuning of the myelination process and identify components of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway as promising drug candidates for promoting myelination.

## References

- Baron-Van Evercooren A, Duhamel-Clerin E, Boutry JM, Hauw JJ, Gumpel M (1993) Pathways of migration of transplanted Schwann cells in the demyelinated mouse spinal cord. *J Neurosci Res* 35:428–438.
- Bienz M (1998) TCF: transcriptional activator or repressor? *Curr Opin Cell Biol* 10:366–372.
- Blankesteyn WM, van de Schans VA, ter Horst P, Smits JF (2008) The Wnt/frizzled/GSK-3 beta pathway: a novel therapeutic target for cardiac hypertrophy. *Trends Pharmacol Sci* 29:175–180.
- Boutry JM, Hauw JJ, Gansmuller A, Di-Bert N, Pouchelet M, Baron-Van Evercooren A (1992) Establishment and characterization of a mouse Schwann cell line which produces myelin in vivo. *J Neurosci Res* 32:15–26.
- Brosamle C, Halpern ME (2002) Characterization of myelination in the developing zebrafish. *Glia* 39:47–57.
- Buckley CE, Goldsmith P, Franklin RJ (2008) Zebrafish myelination: a transparent model for remyelination? *Dis Model Mech* 1:221–228.
- Cavallo RA, Cox RT, Moline MM, Roose J, Polevoy GA, Clevers H, Peifer M, Bejsovec A (1998) Drosophila Tcf and Groucho interact to repress Wingless signalling activity. *Nature* 395:604–608.
- Chan JR, Watkins TA, Cosgaya JM, Zhang C, Chen L, Reichardt LF, Shooter EM, Barres BA (2004) NGF controls axonal receptivity to myelination by Schwann cells or oligodendrocytes. *Neuron* 43:183–191.
- Chen G, Fernandez J, Mische S, Courey AJ (1999) A functional interaction between the histone deacetylase Rpd3 and the corepressor groucho in Drosophila development. *Genes Dev* 13:2218–2230.
- Ding Q, He X, Xia W, Hsu JM, Chen CT, Li LY, Lee DF, Yang JY, Xie X, Liu JC, Hung MC (2007) Myeloid cell leukemia-1 inversely correlates with glycogen synthase kinase-3beta activity and associates with poor prognosis in human breast cancer. *Cancer Res* 67:4564–4571.
- Fancy SP, Baranzini SE, Zhao C, Yuk DI, Irvine KA, Kaing S, Sanai N, Franklin RJ, Rowitch DH (2009) Dysregulation of the Wnt pathway inhibits timely myelination and remyelination in the mammalian CNS. *Genes Dev* 23:1571–1585.
- Feigenson K, Reid M, See J, Crenshaw EB 3rd, Grinspan JB (2009) Wnt signaling is sufficient to perturb oligodendrocyte maturation. *Mol Cell Neurosci* 42:255–265.
- Feutz AC, Pham-Dinh D, Allinquant B, Miehle M, Ghandour MS (2001) An immortalized jimpy oligodendrocyte cell line: defects in cell cycle and cAMP pathway. *Glia* 34:241–252.
- French-Constant C, Colognato H, Franklin RJ (2004) Neuroscience. The mysteries of myelin unwrapped. *Science* 304:688–689.
- Fonte C, Grenier J, Trousson A, Chauchereau A, Lahuna O, Baulieu EE, Schumacher M, Massaad C (2005) Involvement of  $\beta$ -catenin and unusual behavior of CBP and p300 in glucocorticosteroid signaling in Schwann cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:14260–14265.
- Gao X, Arlotta P, Macklis JD, Chen J (2007) Conditional knock-out of  $\beta$ -catenin in postnatal-born dentate gyrus granule neurons results in dendritic malformation. *J Neurosci* 27:14317–14325.
- Gess B, Halfter H, Kleffner I, Monje P, Athauda G, Wood PM, Young P, Wanner IB (2008) Inhibition of N-cadherin and beta-catenin function reduces axon-induced Schwann cell proliferation. *J Neurosci Res* 86:797–812.
- Gilmour DT, Maischein HM, Nusslein-Volhard C (2002) Migration and function of a glial subtype in the vertebrate peripheral nervous system. *Neuron* 34:577–588.
- Jessen KR, Mirsky R (2005) The origin and development of glial cells in peripheral nerves. *Nat Rev Neurosci* 6:671–682.
- Kalani MY, Cheshier SH, Cord BJ, Bababegy SR, Vogel H, Weissman IL, Palmer TD, Nusse R (2008) Wnt-mediated self-renewal of neural stem/progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:16970–16975.
- Kazakova N, Li H, Mora A, Jessen KR, Mirsky R, Richardson WD, Smith HK (2006) A screen for mutations in zebrafish that affect myelin gene expression in Schwann cells and oligodendrocytes. *Dev Biol* 297:1–13.
- Kim S, Kim SH, Kim H, Chung AY, Cha YI, Kim CH, Huh TL, Park HC (2008) Frizzled 8a function is required for oligodendrocyte development in the zebrafish spinal cord. *Dev Dyn* 237:3324–3331.
- Kirby BB, Takada N, Latimer AJ, Shin J, Carney TJ, Kelsh RN, Appel B (2006) In vivo time-lapse imaging shows dynamic oligodendrocyte progenitor behavior during zebrafish development. *Nat Neurosci* 9:1506–1511.
- Lai SL, Chien AJ, Moon RT (2009) Wnt/Fz signaling and the cytoskeleton: potential roles in tumorigenesis. *Cell Res* 19:532–545.
- Lee HY, Kleber M, Hari L, Brault V, Suter U, Taketo MM, Kemler R, Sommer L (2004) Instructive role of Wnt/beta-catenin in sensory fate specification in neural crest stem cells. *Science* 303:1020–1023.
- Lewis JL, Bonner J, Modrell M, Ragland JW, Moon RT, Dorsky RI, Raible DW (2004) Reiterated Wnt signaling during zebrafish neural crest development. *Development* 131:1299–1308.
- Lyons DA, Pogoda HM, Voas MG, Woods IG, Diamond B, Nix R, Arana N, Jacobs J, Talbot WS (2005) *erbb3* and *erbb2* are essential for Schwann cell migration and myelination in zebrafish. *Curr Biol* 15:513–524.
- Mallon BS, Shick HE, Kidd GJ, Macklin WB (2002) Proteolipid promoter activity distinguishes two populations of NG2-positive cells throughout neonatal cortical development. *J Neurosci* 22:876–885.
- Massaad C, Garlatti M, Wilson EM, Cadepond F, Barouki R (2000) A natural sequence consisting of overlapping glucocorticoid-responsive elements mediates glucocorticoid, but not androgen, regulation of gene expression. *Biochem J* 350:123–129.
- Megason SG, McMahon AP (2002) A mitogen gradient of dorsal midline Wnts organizes growth in the CNS. *Development* 129:2087–2098.
- Monk KR, Talbot WS (2009) Genetic dissection of myelinated axons in zebrafish. *Curr Opin Neurobiol* 19:486–490.
- Nelson WJ, Nusse R (2004) Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science* 303:1483–1487.
- Nusse R (1999) WNT targets. Repression and activation. *Trends Genet* 15:1–3.
- Park HC, Kim CH, Bae YK, Yeo SY, Kim SH, Hong SK, Shin J, Yoo KW, Hibi M, Hirano T, Miki N, Chitnis AB, Huh TL (2000) Analysis of upstream elements in the HuC promoter leads to the establishment of transgenic zebrafish with fluorescent neurons. *Dev Biol* 227:279–293.
- Salinas PC, Zou Y (2008) Wnt signaling in neural circuit assembly. *Annu Rev Neurosci* 31:339–358.
- Tada M, Smith JC (2000) *Xwnt11* is a target of Xenopus Brachyury: regulation of gastrulation movements via Dishevelled, but not through the canonical Wnt pathway. *Development* 127:2227–2238.

- Tamai K, Semenov M, Kato Y, Spokony R, Liu C, Katsuyama Y, Hess F, Saint-Jeannet JP, He X (2000) LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. *Nature* 407:530–535.
- Toledo EM, Colombres M, Inestrosa NC (2008) Wnt signaling in neuroprotection and stem cell differentiation. *Prog Neurobiol* 86:281–296.
- Trousson A, Bernard S, Petit PX, Liere P, Pianos A, El Hadri K, Lobaccaro JM, Ghandour MS, Raymondjean M, Schumacher M, Massaad C (2009) 25-Hydroxycholesterol provokes oligodendrocyte cell line apoptosis and stimulates the secreted phospholipase A2 type IIA via LXR beta and PXR. *J Neurochem* 109:945–958.
- van Beest M, Dooijes D, van De Wetering M, Kjaerulff S, Bonvin A, Nielsen O, Clevers H (2000) Sequence-specific high mobility group box factors recognize 10–12-base pair minor groove motifs. *J Biol Chem* 275:27266–27273.
- Welters HJ, Kulkarni RN (2008) Wnt signaling: relevance to beta-cell biology and diabetes. *Trends Endocrinol Metab* 19:349–355.
- Woodhoo A, Alonso MB, Droggiti A, Turmaine M, D'Antonio M, Parkinson DB, Wilton DK, Al-Shawi R, Simons P, Shen J, Guillemot F, Radtke F, Meijer D, Feltri ML, Wrabetz L, Mirsky R, Jessen KR (2009) Notch controls embryonic Schwann cell differentiation, postnatal myelination and adult plasticity. *Nat Neurosci* 12:839–847.
- Ye F, Chen Y, Hoang T, Montgomery RL, Zhao XH, Bu H, Hu T, Taketo MM, van Es JH, Clevers H, Hsieh J, Bassel-Duby R, Olson EN, Lu QR (2009) HDAC1 and HDAC2 regulate oligodendrocyte differentiation by disrupting the beta-catenin-TCF interaction. *Nat Neurosci* 12:829–838.

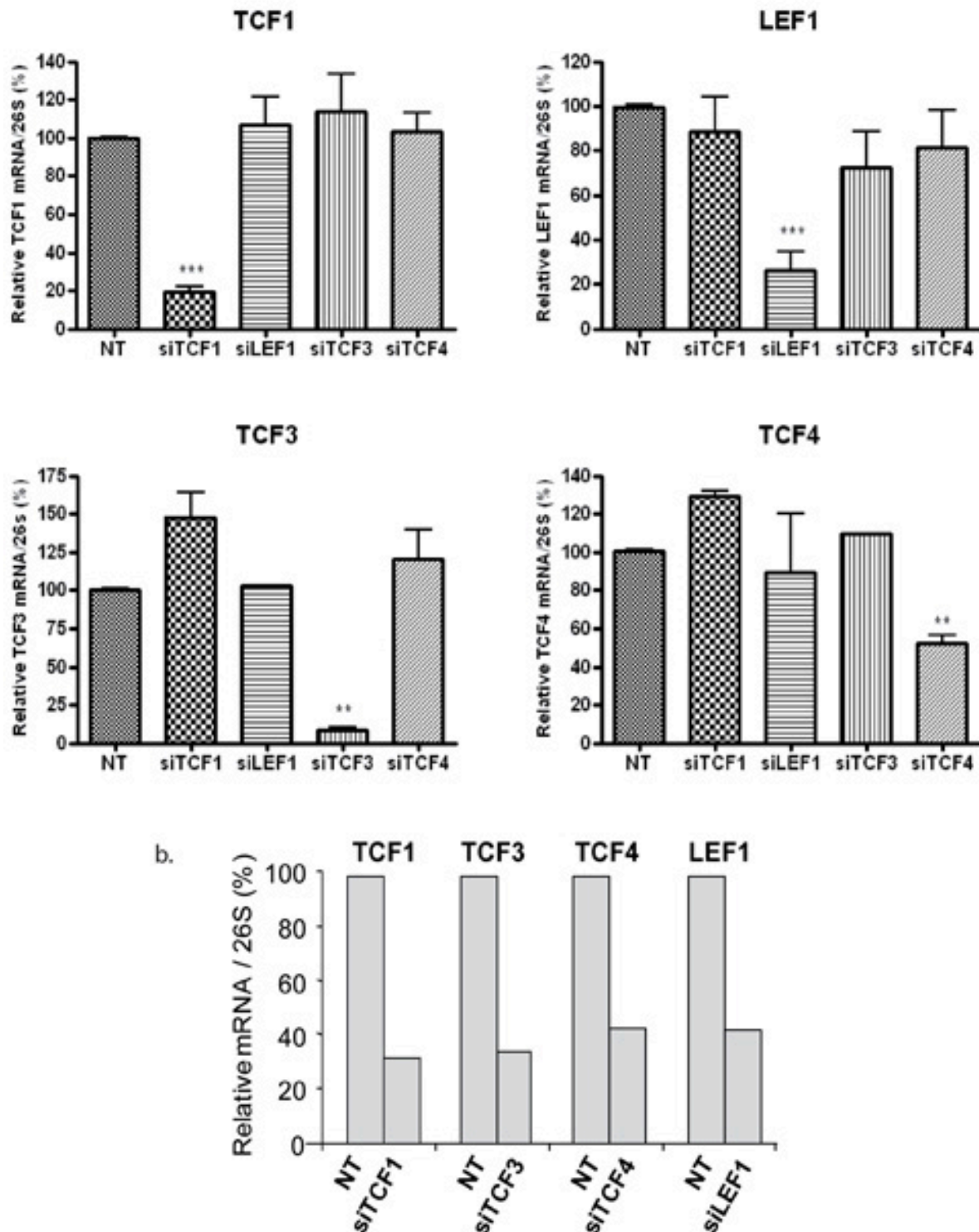


**b.**

	MSC80	Schwann cells	Sciatic nerve	158N	OPC enriched culture	Oligodendrocyte enriched culture	Zebrafish
TCF1	1	1	1	1	1	1	0.96
LEF1	0.016	0.303	0.02	0.07	0.003	0.002	15.8
TCF3	0.59	431.03	7.84	3.78	1.51	0.95	38.79
TCF4	0.027	0.677	0.18	0.86	0.01	0.007	110.05

**Supplementary figure 1: Expression and localization of Wnt components**

(a) The spatial expression pattern of various members of the Wnt signaling pathway in sciatic nerve sections of mice aged 21 days. Myelin sheaths were stained with anti-MBP antibody (in red) and Wnt components were localized with antibodies against Wnt1, LRP6, GSK3 $\beta$  and  $\beta$ -catenin (in green). The slides were analyzed with a confocal microscope. This experiment was repeated twice, and a typical experiment is presented here. The images shown here represent 1 $\mu$ m of confocal Z sectioning. Scale bars = 2  $\mu$ m. (b) Total RNAs from MSC80 cells, primary Schwann cells, mouse adult sciatic nerves, 158N, primary culture enriched in OPC or oligodendrocytes, or from zebrafish were prepared. qRT-PCR experiments were performed with primers recognizing specifically the four TCFs (TCF1, LEF1, TCF3 or TCF4). 26S RNA (mice) and Efl $\alpha$  (zebrafish) were detected by specific primers and used to normalize TCF expression. The results are expressed as fold induction over TCF1.

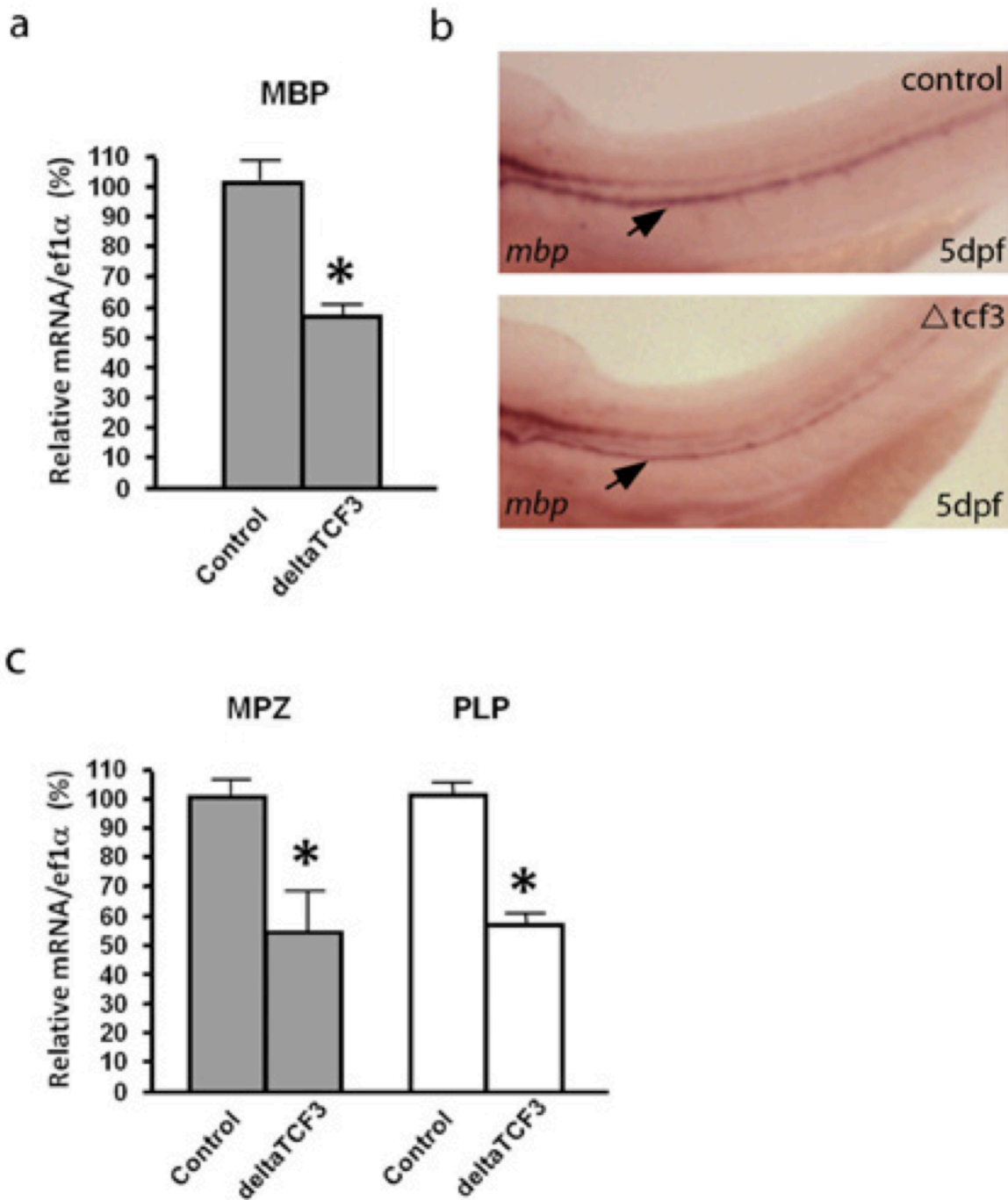


**Supplementary figure 2: Expression of TCF in glial cells and analysis of the efficiency of their invalidation by siRNA.**

(a) MSC80 cells were transfected with siRNA directed against each one of the four TCFs or non-targeting siRNA (NT). Total RNA was prepared and qRT-PCR experiments were performed using primers recognizing specifically the four TCFs (TCF1, LEF1, TCF3 and TCF4). \*\* $p < 0.01$  or \*\*\* $p < 0.001$  by Tukey's post hoc test after one-way ANOVA when compared to control.

(b) Total RNA from 158N oligodendrocytes transiently transfected with siRNA directed against the four TCFs or non-targeting siRNA (NT) was prepared. qRT-PCR experiments were performed using primers recognizing specifically the four TCFs (TCF1, LEF1, TCF3 and TCF4).





**Supplementary figure 3: *mbp*, *mpz* and *plp* mRNA expression in  $\Delta$ TCF3 transgenic zebrafish embryos.**

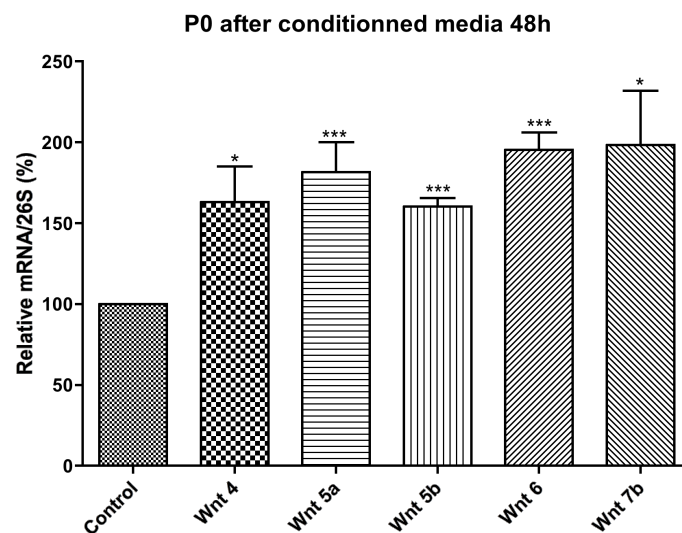
**(a)** qPCR graph showing relative *mbp* expression/Ef1 $\alpha$  (%) in control embryos at 5 dpf and in  $\Delta$ TCF3 embryos at 5dpf heat shocked at 48 hpf. It shows a significant decrease in the relative amount of *mbp* expression between controls and  $\Delta$ TCF3 embryos (average *mbp* mRNA expression of 3 different experiments, for each n = 11). **(b)** Lateral views of control embryos (top) at 5 dpf and of  $\Delta$ TCF3 embryos (bottom) at 5 dpf heat shocked at 3 dpf. Arrows indicate *mbp* expressing cells along the PLLn. *Mbp* mRNA expression in the PLLn is similar between control and  $\Delta$ TCF3 embryos. **(c)** qPCR graph showing relative *mpz* and *plp* expression/EF1 $\alpha$  (%) in control embryos at 5dpf and in  $\Delta$ TCF3 embryos at 5dpf heat shocked at 48hpf. It shows a significant decrease in the relative amount of *mpz* and *plp* expression between controls and  $\Delta$ TCF3 embryos.

## 2. Résultats supplémentaires de l'article 1

Les travaux effectués nous ont permis de montrer l'implication de certains ligands Wnts et en particulier de Wnt1, Wnt3, Wnt3a et Wnt7a dans la régulation de l'expression des gènes de la myéline.

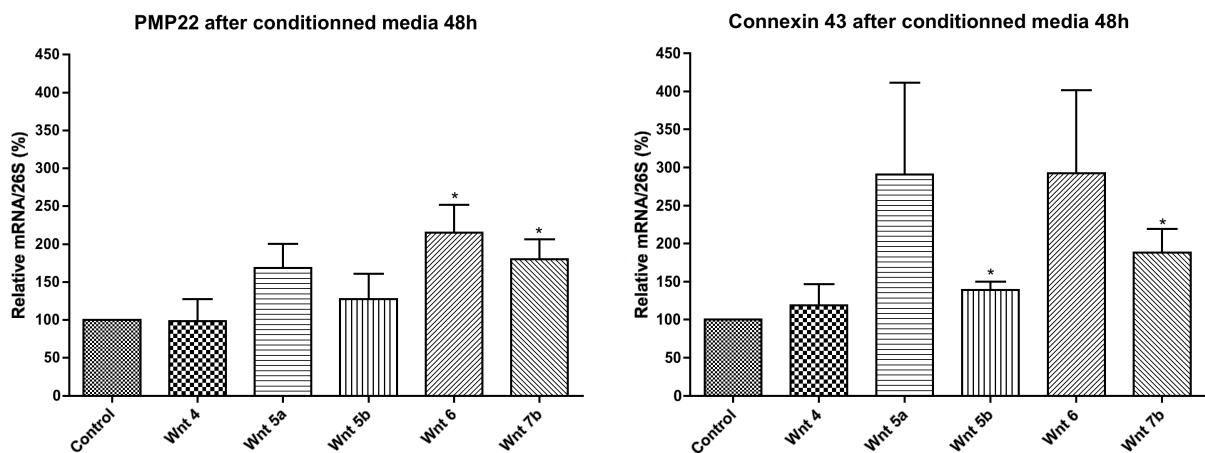
Nous avons choisi de compléter ce travail en étudiant le rôle des protéines Wnt4, Wnt5a, Wnt5b, Wnt6 et Wnt7b sur la régulation de l'expression des gènes de la myéline P0 (Figure 32) et PMP22 (Figure 33) et d'un gène cible de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine, la connexine 43 (Figure 33). Parmi ces protéines, Wnt5b est clairement identifiée comme faisant partie de la famille des Wnts canoniques, Wnt4, 6 et 7b sont des ligands non canoniques strictes et le cas de Wnt5a est à ce jour plus ambigu. Il pourrait activer les deux voies de signalisation [163] mais aussi à la fois activer la non canonique et inhiber la canonique [162].

Pour réaliser ce travail, nous avons utilisé le système des milieux conditionnés que nous avons laissé agir 48h sur les CS et quantifié par qPCR l'expression des gènes P0, PMP22 et connexine 43.



**Figure 32: Effets de différents ligands Wnt sur l'expression de P0 dans les cellules de Schwann.** Les milieux conditionnés sont préparés à partir de MSC80 transfectées avec les vecteurs d'expression codant pour Wnt4, Wnt5a, Wnt5b, Wnt6, et Wnt7b. Deux jours après la transfection, le milieu est transféré sur des cellules fraîches et laissé pendant 48h. L'expression du gène P0 est dosée par qPCR et normalisée par rapport au 26S. \* $p < 0,05$  ; \*\*\* $p < 0,001$  après t-Test;  $n = 3$

Les ligands Wnts synthétisés dans les CS agissent sur ces dernières en induisant l'expression du gène de la myéline P0 (Figure 32). L'induction est de 162,9% pour Wnt4, 181,5% pour Wnt5a, 160,2% pour Wnt5b, 195,4% pour Wnt6 et 198,4% pour Wnt7b. Ces inductions sont significatives pour l'ensemble des Wnts étudiés. Mais seuls les Wnt6 et Wnt7b induisent significativement le gène de PMP22 (Figure 33) avec des inductions respectives de 215,3% et 180%. Enfin, nous avons dosé la connexine 43 qui est l'un des gènes cibles de la voie Wnt canonique. Les Wnts 5b et 7b induisent significativement la connexine 43 (respectivement 139% et 188,2%).



**Figure 33: Effets de différents ligands Wnt sur l'expression de PMP22 et connexine 43 dans les cellules de Schwann.** Les milieux conditionnés sont préparés à partir de MSC80 transfectées avec les vecteurs d'expression codant pour Wnt4, Wnt5a, Wnt5b, Wnt6 et Wnt7b et un plasmide vide (control). Deux jours après la transfection, le milieu est transféré sur des cellules fraîches et laissé pendant 48h. L'expression des gènes PMP22 et connexine 43 est dosée par qPCR et normalisée par rapport au 26S. \* $p < 0,05$  après t-Test;  $n=3$

Ces observations posent la question des mécanismes mis en jeu par la catégorie des Wnts non canoniques pour réguler l'expression des gènes de la myéline. L'une des voies Wnt non canonique permettant de réguler la transcription fait intervenir les facteurs de transcription NFAT. Ce facteur fait notamment partie de la voie Wnt calcique. Il est activé par déphosphorylation suite à une entrée importante de calcium dans la cellule. Enfin, il transloque au noyau pour y réguler ses gènes cibles. De plus, il a été récemment montré que le facteur de transcription NFATc4 régulait l'expression de P0 dans les précurseurs de CS [49]. Cette voie de signalisation pourrait être une bonne candidate

pour expliquer la régulation de l'expression des gènes de la myéline par la voie Wnt non canonique. Nous pourrions pour tester cette hypothèse, vérifier l'induction d'un gène cible de NFAT par qPCR ou utiliser un système de siNFATc4 pour s'assurer de la diminution de l'expression des gènes de la myéline.

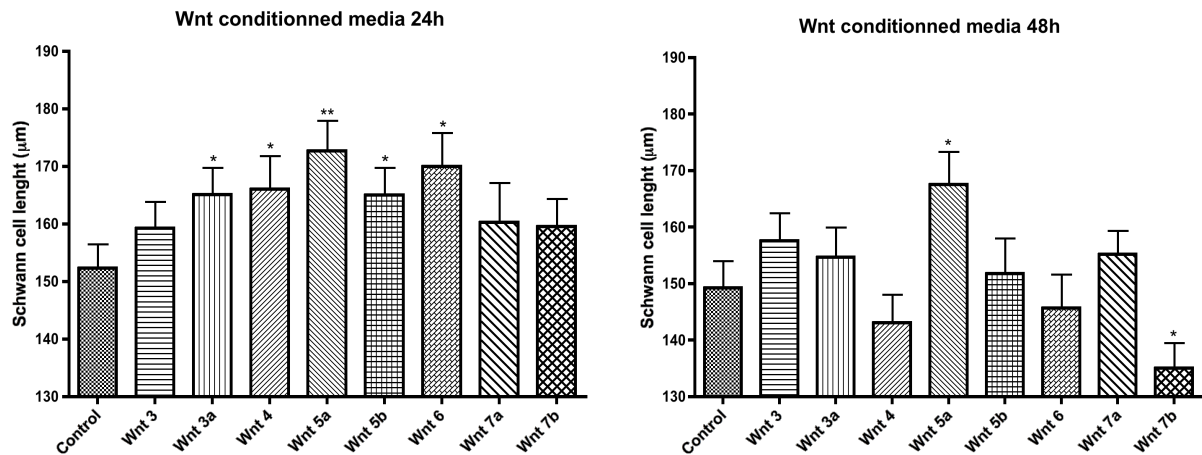
## **II. Régulation du cytosquelette des cellules de Schwann par les différentes voies Wnt**

### **1. Rôles des facteurs Wnts sur le cytosquelette des cellules de Schwann**

Les cellules de Schwann ont pour principale fonction la myélinisation d'un axone. Ce phénomène est finement régulé par nombre de facteurs au cours du développement. Il nécessite par ailleurs une importante synthèse protéique et lipidique pour permettre les multiples enroulements de la gaine autour de l'axone. Ainsi, la membrane plasmique est considérablement étendue tandis que de profondes modifications touchent le cytosquelette cellulaire. C'est ce dernier point que nous avons étudié.

Notre objectif de travail est d'étudier les rôles des protéines Wnts sur l'architecture des CS. Ces Wnts se trouvent être très présents au cœur du dialogue entre les cellules gliales et axonales. Les protéines de la famille Wnt peuvent agir sur le cytosquelette des cellules nerveuses comme nous l'avons décrit dans l'introduction. Dans quelle mesure ces différents ligands peuvent-ils permettre la croissance ou non des microtubules dans les cellules de Schwann? Au cours du processus de polymérisation, existe-t-il une différence entre les Wnts canoniques et non canoniques? Il est important de noter à ce stade que les deux groupes de Wnt sont représentés, avec d'une part les membres de la voie canonique Wnt3, Wnt3a, Wnt5b et Wnt7a et d'autre part Wnt4, Wnt6 et Wnt7b qui activent les différentes voies de signalisation non canoniques (la classification exacte de Wnt5a reste en débat).

Nous avons mesuré les prolongements cellulaires de MSC80 24h et 48h (Figure 34) après la mise en contact avec un milieu conditionné contenant différentes protéines Wnts.



**Figure 34: Mesure des prolongements des cellules de Schwann sous l'effet de différents Wnts.** Les milieux conditionnés sont préparés à partir de MSC80 transfectées avec les vecteurs d'expression codant pour Wnt3, Wnt3a, Wnt4, Wnt5a, Wnt5b, Wnt6, Wnt7a, Wnt7b et un plasmide vide (control). Deux jours après la transfection, le milieu est transféré sur des cellules MSC80 fraîches et laissé pendant 24h ou 48h. Les prolongements cellulaires sont mesurés et rapportés au contrôle. \* $p < 0,05$  ; \*\* $p < 0,01$  après t-Test;  $n \geq 70$

Sur les huit milieux conditionnés qui contiennent des Wnts différents, Wnt3a (165,1µm), Wnt4 (166,1µm), Wnt5a (172,7µm), Wnt5b (165,1µm) et Wnt6 (170µm) induisent un allongement significatif à 24h (contrôle 24h : 159,3µm). Les trois autres proposent une tendance à l'allongement de leurs extensions à 24h avec respectivement 159,3µm pour Wnt3, 160,3µm pour Wnt7a et 159,5µm pour Wnt7b.

Les résultats observés après 48h de culture dans un milieu conditionné Wnt présentent davantage de disparités. La tendance à l'allongement des prolongements est retrouvée chez Wnt3 (157,5µm), Wnt3a (154,7µm), Wnt5a (167,6µm), Wnt5b (157,8µm) et Wnt7a (155,2µm). L'allongement n'est significatif que pour Wnt5a. En revanche, on observe pour les autres Wnts (Wnt4=143,1µm ; Wnt6=145,7µm et Wnt7b=135,1µm) étudiés une légère rétractation des prolongements cytoplasmiques qui n'est significative que pour Wnt7b. Ces trois protéines font partie du groupe non canonique. Ces rétractations sont peut être simplement le signe de l'arrêt de l'effet des Wnts synthétisés à partir des

plasmides. En effet, ils présentent bien des effets significatifs à 24h, qu'ils perdent ensuite à 48h.

Le tableau 3 synthétise les effets des différents ligands Wnts sur le prolongement des CS à 24h et 48h ainsi que sur l'expression des gènes de la myéline à 48h.

	Voie de signalisation	Prolongements de CS à 24h	Prolongements de CS à 48h	Expression de P0 à 48h	Expression de PMP22 à 48h
<b>Wnt3</b>	Canonique	105%	105%	176%	147%
<b>Wnt3a</b>	Canonique	109% *	104%	258%	149%
<b>Wnt4</b>	Non canonique	109% *	96%	163% *	98%
<b>Wnt5a</b>	Non canonique/ Canonique	113% **	112% *	182% ***	169%
<b>Wnt5b</b>	Canonique	108% *	102%	160% ***	128%
<b>Wnt6</b>	Non canonique	112% *	96%	195% ***	215% *
<b>Wnt7a</b>	Canonique	105%	96%	156% ***	343%
<b>Wnt7b</b>	Non canonique	105%	90% *	198% *	180% *

**Tableau 3 : Synthèse des différentes voies activées par les Wnts ainsi que leurs effets sur les prolongements des CS et l'expression des gènes de la myéline (% par rapport au contrôle).** Les différences significatives suite aux tests statistiques sont rappelées par les étoiles. \*p<0,05 ; \*\*p<0,01 ; \*\*\*p<0,001 après t-Test

Par la suite, nous focaliserons nos études sur les cinq Wnts (Wnt3a, 4, 5a, 5b et 6) dont l'action sur les prolongements est significative à 24h.

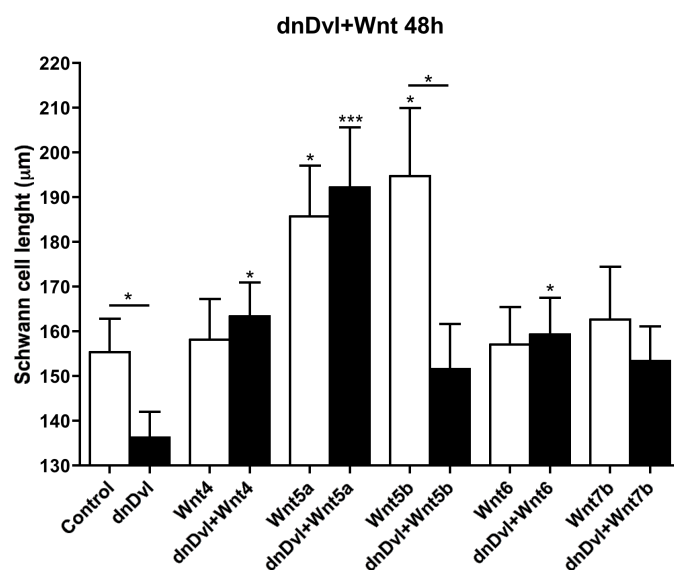
## 2. Implication de Dishevelled dans les effets des ligands Wnts sur le cytosquelette des CS

L'observation des résultats précédents nous amène à nous interroger sur les mécanismes d'action des Wnts canoniques comme des Wnts non canoniques dans la modification morphologique des cellules. La littérature est jusqu'à ce jour assez fournie sur le rôle de Dvl, carrefour des signalisations au cours de la croissance axonale et de la formation du bouton synaptique. Dishevelled agit indirectement sur le cytosquelette en inhibant la GSK3 $\beta$  par phosphorylation. Cette dernière peut phosphoryler des protéines

associées aux microtubules comme APC, MAP1B et CRMP2 et provoquer la déstabilisation des microtubules.

Cependant, le rôle des Wnts canoniques et non canoniques et de Dvl sur le cytosquelette des cellules de Schwann n'est à ce jour que peu connu. Nous avons souhaité étudier l'allongement des prolongements cellulaires suite à la fois au blocage de ce carrefour par un dominant négatif de Dvl (dnDvl) et par la stimulation des voies Wnt à l'aide de milieux conditionnés Wnts pendant 48h (Figure 35). Parmi ces Wnts utilisés, quatre sont connus pour appartenir à la signalisation non canonique (Wnt4, Wnt 5a, Wnt6 et Wnt7b) et un seul à la voie canonique (Wnt5b).

Le blocage par le dnDvl provoque une diminution significative de la longueur des prolongements par rapport au témoin (136,3µm contre 155,4µm). Le dominant négatif permettrait à la GSK3β de phosphoryler les MAPs et de déstabiliser les microtubules. L'incubation des CS en présence de Wnt4, Wnt6 ou Wnt7b ne modifie pas la taille des prolongements cellulaires. L'utilisation préalable du dominant négatif de Dvl augmente légèrement la taille des extensions cellulaires après un traitement par Wnt4 et Wnt6. Ces trois protéines font partie de la signalisation non canonique. Sans effet majeur de leur part, on pourrait alors envisager que ces Wnts non canoniques activent la moins connue des voies Wnt, à savoir la voie d'internalisation nucléaire du récepteur Frizzled (voir Figure 24 e de l'introduction).



**Figure 35: Mesure des prolongements des cellules de Schwann sous l'effet de différents Wnts et d'un dominant négatif de Dvl.** Les milieux conditionnés sont préparés à partir de MSC80 transfectées avec les vecteurs d'expression codant pour Wnt4, Wnt5a, Wnt5b, Wnt6, Wnt7b et un plasmide vide (control). Deux jours après la transfection, le milieu est transféré pendant 48h sur des cellules ayant été transfectées par un plasmide vide ou un dominant négatif dirigé de Dvl pendant 24h. Les prolongements cellulaires sont mesurés et rapportés au contrôle. Ainsi, les tests statistiques proposés se rapportent aux contrôles respectifs, soit au « control » pour les colonnes blanches et à « dnDvl » pour les colonnes noires. Dans le cas contraire (par exemple « control » par rapport à « dnDvl ») une barre horizontale spécifie les deux conditions concernées \* $p < 0,05$  ; \*\*\* $p < 0,001$  après t-Test;  $n \geq 70$

En revanche les cas de Wnt5a et Wnt5b apparaissent différents. Seuls, Wnt5a et Wnt5b induisent une augmentation conséquente et significative de la longueur (de l'ordre de 120% pour Wnt5a et 125% pour Wnt5b). Dans le cas de Wnt5a, la longueur des prolongements reste augmentée malgré l'utilisation du dominant négatif de Dvl. Les données de la littérature au sujet de la classification non canonique ou non de Wnt5a sont nombreuses et contradictoires. Cependant, il ressort de ces nombreuses études, que Wnt5a pourrait activer les deux voies de signalisation. Ainsi, suivant cette hypothèse, le ligand Wnt5a présent au sein du milieu conditionné pourrait stabiliser les microtubules à la fois par l'intermédiaire de JNK et en inhibant la GSK3 $\beta$ . La convergence de ces deux voies provoque l'allongement des prolongements.

L'ajout de Wnt5b à la suite de la transfection par le dnDvl diminue les prolongements cellulaires. Wnt5b active la signalisation canonique, au cours de laquelle il active Dvl permettant ainsi l'inhibition de la GSK3 $\beta$ . Cette dernière ne pourrait ainsi plus phosphoryler les MAPS ce qui aurait pour conséquence de stabiliser le réseau de microtubules. Ainsi l'utilisation du dominant négatif n'est pas contrebalancée par une voie parallèle qui stabilise les microtubules.

Jusqu'à présent, le rôle des Wnts sur le cytosquelette était principalement étudié dans la régulation de la pousse axonale et la formation du bouton synaptique. Ce travail nous permet d'établir les rôles possibles des différents ligands Wnts sur le cytosquelette des CS et plus précisément sur la régulation des extensions cytoplasmiques nécessaire aux nombreux enroulements de la gaine de myéline autour de l'axone.

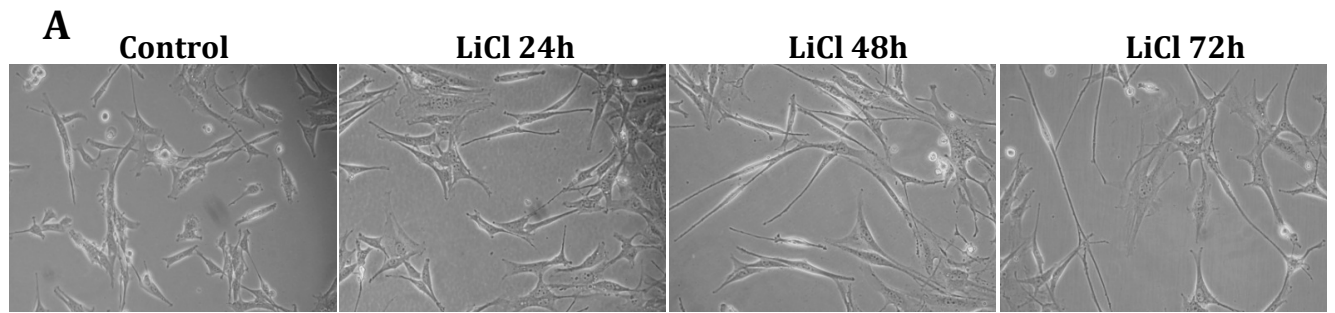


### **3. Rôle de la GSK3 $\beta$ sur le cytosquelette des cellules de Schwann**

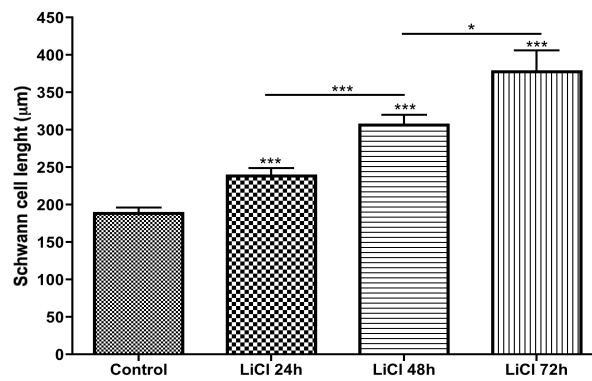
En parallèle de l'étude portant sur les Wnts, nous avons évalué les effets d'un inhibiteur de la GSK3 $\beta$ , le chlorure de lithium, sur les prolongements des cellules de Schwann.

Nous avons mesuré l'allongement des cellules traitées au lithium en microscopie optique classique et observer les modifications plus fines de leur morphologie en utilisant un microscope à force atomique. De plus, nous avons utilisé les marquages immunocytochimiques pour caractériser et déterminer la nature des structures modifiées par cette induction. Enfin, nous avons pu bénéficier de la source synchrotron SOLEIL pour caractériser par microspectroscopie infrarouge les modifications biochimiques au niveau des prolongements de CS.

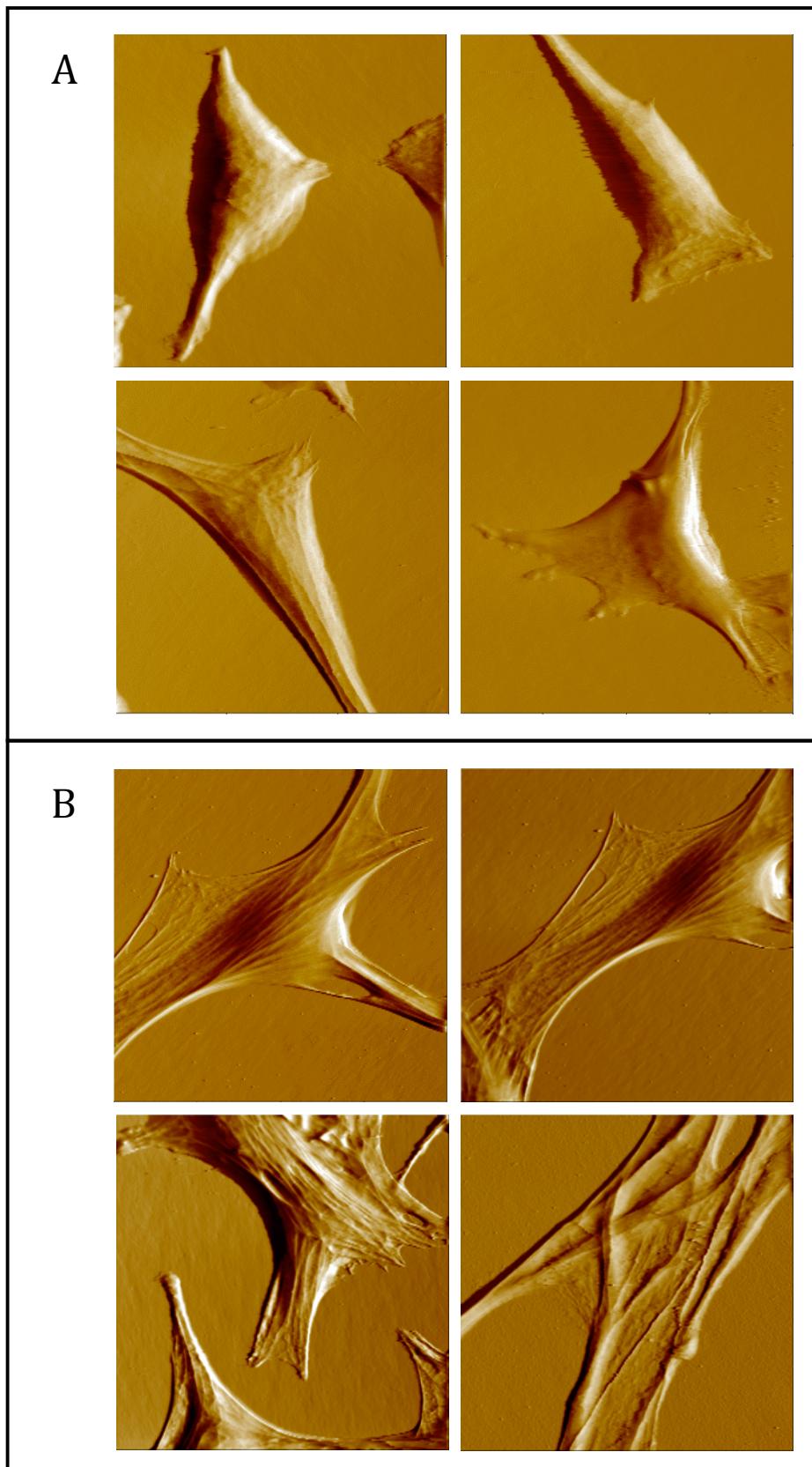
Le chlorure de lithium est un inhibiteur de la GSK3 $\beta$ . En ce sens, il mime l'activation de la voie Wnt canonique sur le plan transcriptionnel (Makoukji *et al.* soumis). L'induction par le LiCl pendant 24h, 48h et 72h provoque un important allongement des prolongements cellulaires. En effet, les prolongements sont augmentés de plus de 25% à 24h, 62% à 48h et sont presque doublés en 72h. En inhibant la GSK3 $\beta$ , le LiCl pourrait provoquer la baisse du taux de phosphorylation des protéines MAP1B, CRMP2 et APC, stabilisant ainsi les microtubules. La forme phosphorylée de la MAP1B étant principalement associée à des microtubules instables tandis que la phosphorylation de CRMP2 et APC est inactivatrice.



**B**

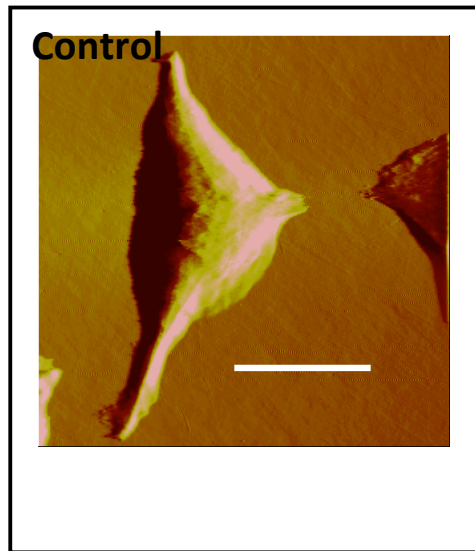


**Figure 36: Effets du LiCl sur la morphologie des cellules de Schwann.** A : Les cellules de Schwann sont photographiées en lumière blanche sur un microscope inversé à 24h, 48h et 72h après induction au LiCl (10mM). B : Les prolongements cellulaires sont mesurés et rapportés au contrôle. \* $p < 0,05$  ; \*\*\* $p < 0,001$  après t-Test;  $n \geq 70$



**Figure 37 : Images de déflexion de MSC80 cultivées dans leur milieu de culture pendant 48h sur une matrice de collagène de type I. (A) Cellules contrôles, (B) 24h après induction au LiCl (10 mM), (100 $\mu$ m x 100 $\mu$ m).**

A



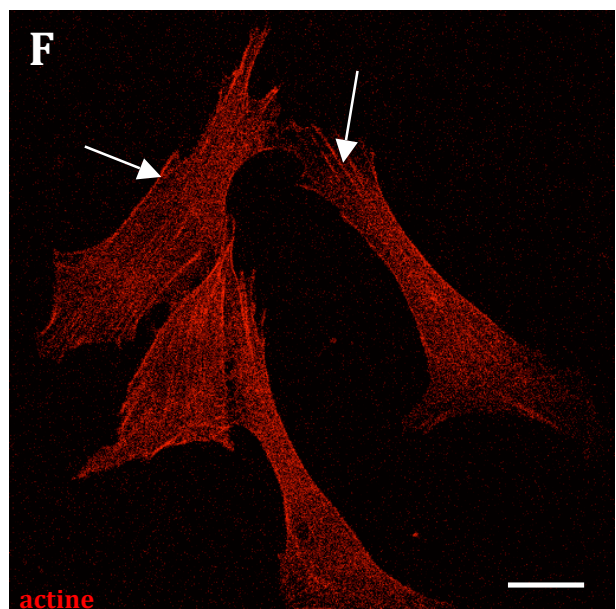
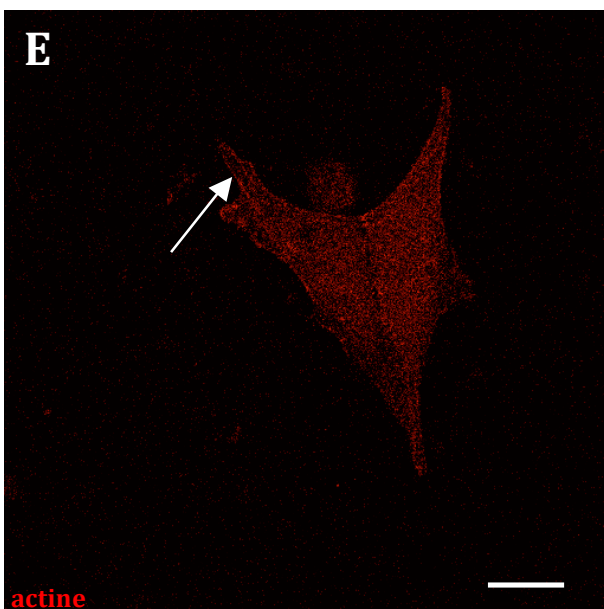
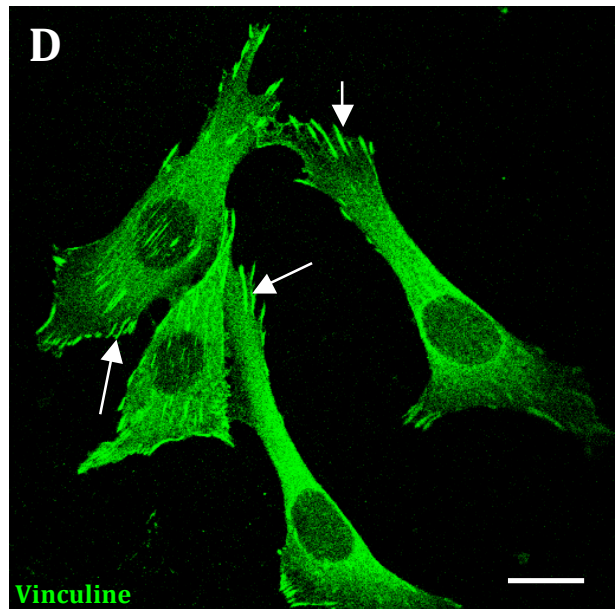
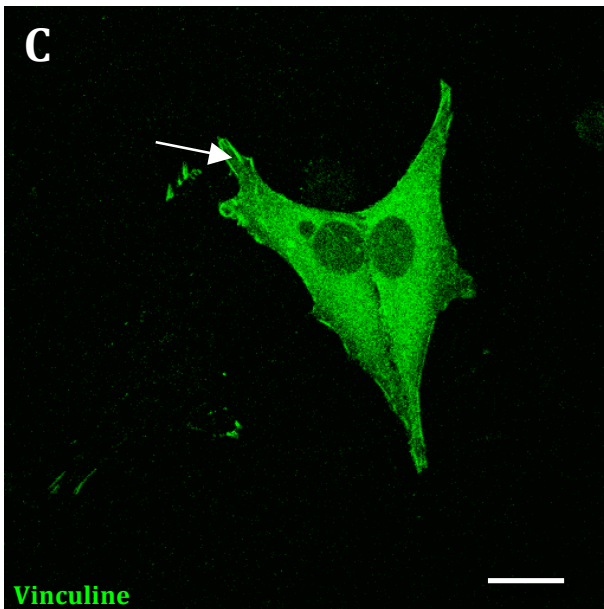
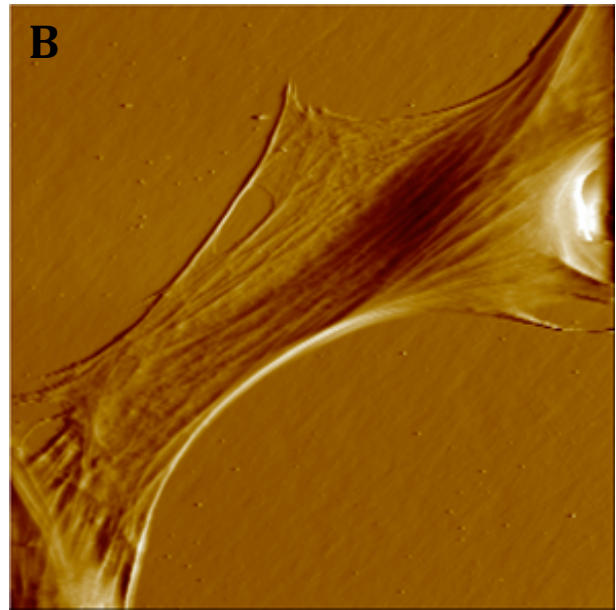
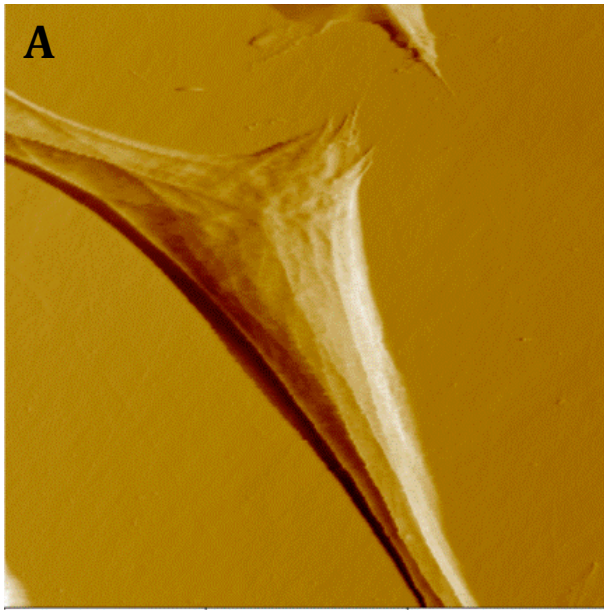
B



**Figure 38: Images prises au microscope à force atomique de déflexion de MSC80 cultivées dans leur milieu de culture pendant 48h sur une matrice de collagène de type I. (A) Cellules contrôle, (B) 24h après induction au LiCl (10 mM), (échelle : 20 $\mu$ m).**

**Contrôle**

**LiCl**

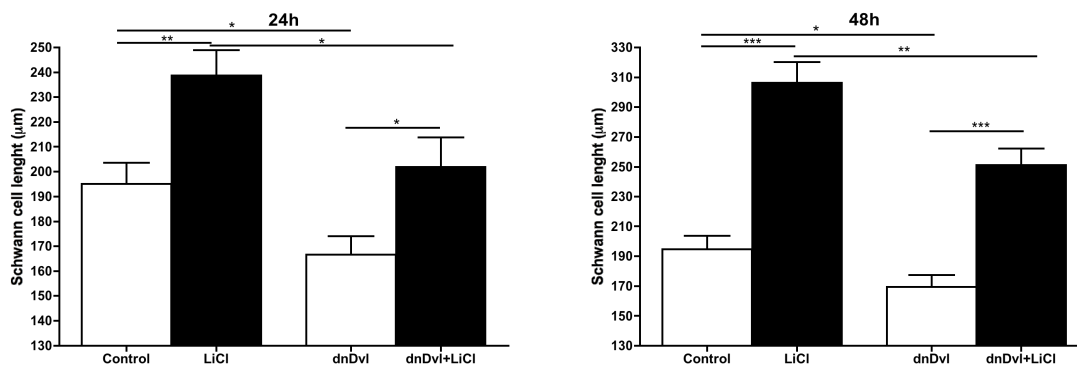


**Figure 39: Images de déflexion de MSC80 cultivées dans leur milieu de culture pendant 48h sur une matrice de collagène I.** Et images de MSC80 en fluorescence prises au microscope confocal, objectif à immersion x63 (A) contrôle, (B) 24h LiCl 10 mM, (C) vinculline contrôle, (D) vinculline 24h LiCl 10 mM, (E) actine contrôle, (F) actine 24h LiCl 10 mM, (échelle : 10µm). Ces images sont représentatives de l'expérience réalisée trois fois.

Les images de microscopie à force atomique nous permettent d'appréhender la finesse des modifications du cytosquelette cellulaire. En effet, dès 24h, les prolongements cellulaires sont fortement augmentés et le réseau sous cortical profondément modifié. Le traitement des CS par du LiCl provoque une nette tension des réseaux sous corticaux. La cellule apparaît davantage étalée sur la matrice, et semble mieux ancrée sur celle-ci.

Nous avons effectué des expériences d'immunofluorescence afin de marquer la vinculline, protéine des complexes d'adhésion focale, l'actine et les microtubules des CS et d'identifier ainsi les composants du cytosquelette impliqués dans les modifications observées par AFM. Ces images obtenues par microscopie confocale sont présentées sur la (figure 39). Sous l'effet du lithium, de larges complexes d'adhésion focale apparaissent ; ils traduisent un ancrage fort des cellules sur la matrice de collagène. Les tensions du cytosquelette sont très clairement attribuées au réseau d'actine ; on voit apparaître des fibres de stress dont les extrémités sont directement liées aux points focaux d'adhésion.

Dans un second temps, nous avons voulu évaluer le rôle du LiCl malgré un blocage de la voie Wnt par l'intermédiaire d'un dominant négatif de Dvl. Le chlorure de lithium seul induit comme précédemment une augmentation importante et significative des prolongements à 24h et 48h. Le dominant négatif de Dvl provoque lui une rétractation des extensions à 24h comme à 48h. Les prolongements sont augmentés de façon significative par l'induction au LiCl après le dnDvl par rapport au traitement du dnDvl seul. L'inhibition de la GSK3β par le lithium semble surpasser l'activation de la kinase par le dnDvl. Les effets apparaissent déjà significatifs à 24h (201,9µm contre 166,6µm) et sont renforcés à 48h (251,1µm contre 169,5µm). Au regard de ces résultats, le LiCl apparaît être un puissant stabilisateur des microtubules.



**Figure 40: Mesure des prolongements des cellules de Schwann sous l'effet d'un dominant négatif de Dvl et du LiCl.** Les cellules ayant été ou non transfectées par un dominant négatif dirigé contre Dvl sont induites pendant 24h et 48h par du LiCl (10mM). Les prolongements cellulaires sont mesurés en épifluorescence. \* $p < 0,05$  ; \*\* $p < 0,01$  ; \*\*\* $p < 0,001$  après t-Test;  $n \geq 70$

### III. Apports de la microspectrométrie infrarouge sur la caractérisation des CS

Enfin la dernière partie de notre étude des effets du LiCl sur les CS porte sur la caractérisation des variations de compositions internes en protéines et lipides d'une cellule isolée et plus particulièrement au niveau de ses extensions. Une telle étude par microspectrométrie infrarouge ne peut être réalisée qu'à l'aide d'une source synchrotron.

Les avantages et intérêts de cette technique sont nombreux. Nous pourrions ainsi suivre toutes les familles de protéines, de lipides, de sucres ou d'acides nucléiques existants dotées d'une signature spectrale spécifique. Par exemple, les propriétés spectrales de protéines glycosylées ou phosphorylées sont différentes. Elles changent également en fonction de leur conformation. Nous pouvons en évaluer les différences entre des cas témoins et traités au LiCl.

Par ailleurs, cette caractérisation est suffisamment fine pour établir des différences de composition en plusieurs points de la cellule. Nous pourrions ainsi nous placer à différents endroits des prolongements (plus ou moins proche du noyau) et étudier les

différences biochimiques en fonction de leur localisation. Ceci nous permettra d'établir une cartographie en différents points de la cellule.

Si, cette technique permet d'étudier les réponses au niveau d'une cellule isolée, à terme, elle permettra également d'établir des cartographies sur des coupes de nerfs lésés traités ou non au LiCl.

### **Analyse des données spectrales IR**

Les analyses classiques, univariées, utilisent les rapports de pics, hauteur, aire, largeur à mi-hauteur, et position des bandes d'absorption. Cependant, les spectres contiennent souvent des bandes qui se chevauchent et dont la comparaison ou l'interprétation ne peut se faire par simple inspection visuelle mais nécessite des approches alternatives. Il est donc essentiel que les mesures spectroscopiques soient couplées à une stratégie d'analyse multivariée [214, 215].

L'analyse statistique multivariée est généralement le moyen le plus efficace pour mettre en évidence de faibles différences entre les spectres. Les données multivariées générées à partir des spectres ou cartes IR ou Raman sont constituées de nombreuses et diverses variables (nombre d'onde et déplacement de nombre d'onde) pour un nombre d'éléments (cellules ou individus contrôles et traités par exemple) qui peut également être important (typiquement  $n=100$ ). Chaque variable va être considérée comme constituant une dimension différente, de sorte que s'il y a  $n$  variables (raies d'absorption IR) chaque objet va être considéré comme résidant à une position unique dans une entité abstraite définie comme l'hyperespace à  $n$  dimensions. Celui-ci est forcément difficile à visualiser et l'objectif de l'analyse multivariée est donc la simplification ou réduction dimensionnelle.

En général, les méthodes non supervisées d'analyse par classification hiérarchique telles que l'**analyse en composantes principales** (ACP) et l'**analyse hiérarchique en cluster** (AHC) sont utilisées pour mettre en évidence ces faibles différences et similitudes spectrales existant entre les constituants biologiques des échantillons analysés. Parmi les logiciels développés pour l'analyse statistique multivariée, nous avons utilisé la dernière version The Unscrambler X® (Camo, Oslo, Norvège).



La figure 41 présente un spectre IR typique enregistré au niveau du noyau d'une cellule de Schwann. Les liaisons chimiques absorbent le rayonnement IR à des longueurs d'ondes spécifiques dépendant de la nature et de leur conformation. Ainsi, tout composé organique possède une signature spectrale qui lui est propre. C'est pourquoi la spectroscopie IR est très souvent utilisée pour caractériser un échantillon.

L'analyse des spectres permet d'extraire :

- des informations *qualitatives* : les liaisons chimiques absorbent à un nombre d'onde caractéristique. Des bases de données IR permettent d'attribuer les absorptions aux différents groupes chimiques en présence et donc d'identifier la ou les molécules présentes.
- des informations *quantitatives* : l'intensité de la bande d'absorption vérifie la loi de Beer-Lambert et rend donc compte de la concentration du groupe chimique caractéristique de cette absorption.

La plupart des biomolécules possèdent donc une signature IR caractéristique. Le spectre IR d'un tissu biologique ou d'une cellule consiste alors en l'addition de nombreuses raies spectrales qui vont se chevaucher et/ou se superposer (figure 41). Dans ce cas, l'analyse des spectres n'est pas simple, d'autant plus que l'environnement des molécules influence aussi les fréquences de vibration. Néanmoins, de nombreuses bandes d'absorption ont pu être attribuées (Tableau 4). La spectroscopie IR est donc une technique intéressante qui permet d'obtenir une image globale et complète d'une cellule dans un état métabolique particulier.

Frequency (cm <sup>-1</sup> )	Chemical function
~3500	O-H stretch of hydroxyl groups
~3200	N-H stretch ( Amide A) of proteins
~3000–3060	C=C stretch
~2955	C-H asymmetric stretch of –CH <sub>3</sub> in fatty acids
~2930	C-H asymmetric stretch of –CH <sub>2</sub>
~2918	C-H asymmetric stretch in fatty acids
~2898	C-H symmetric stretch of C-H in methyl groups
~2870	C-H symmetric stretch of –CH <sub>3</sub>
~2850	C-H symmetric stretch of –CH <sub>2</sub> in fatty acids
~1740	-C=O stretch of esters
~1715	-C=O stretch of carbonic acids
~1680–1710	-C=O in nucleic acids
~1695	Amide I band components of proteins
~1685	Antiparallel pleated sheets
~1675	Resulting from β- turns of proteins
~1655	Amide I of α-helical structures
~1635	Amide I from β-pleated sheet structures
~1575	Asymmetric stretch of COO-
~1550–1520	Amide II
~1515	'Tyrosine' band
~1468	C-H deformation of –CH <sub>2</sub>
~1400	C=O symmetric stretch of COO-
~1310–1240	Amide III band components of proteins
~1250–1220	P=O asymmetric stretch of PO <sub>2</sub> <sup>-</sup> phosphodieters
~1200–900	C-O; C-C; C-O-H; C-O-C deformation of carbohydrates
~1090–1085	P=O symmetric stretch of PO <sub>2</sub> <sup>-</sup>
~720	C-H rocking of –CH <sub>2</sub>
~900–600	"Fingerprint region"

**Tableau 4 : Attributions des principales raies caractéristiques des échantillons biologiques [216].**

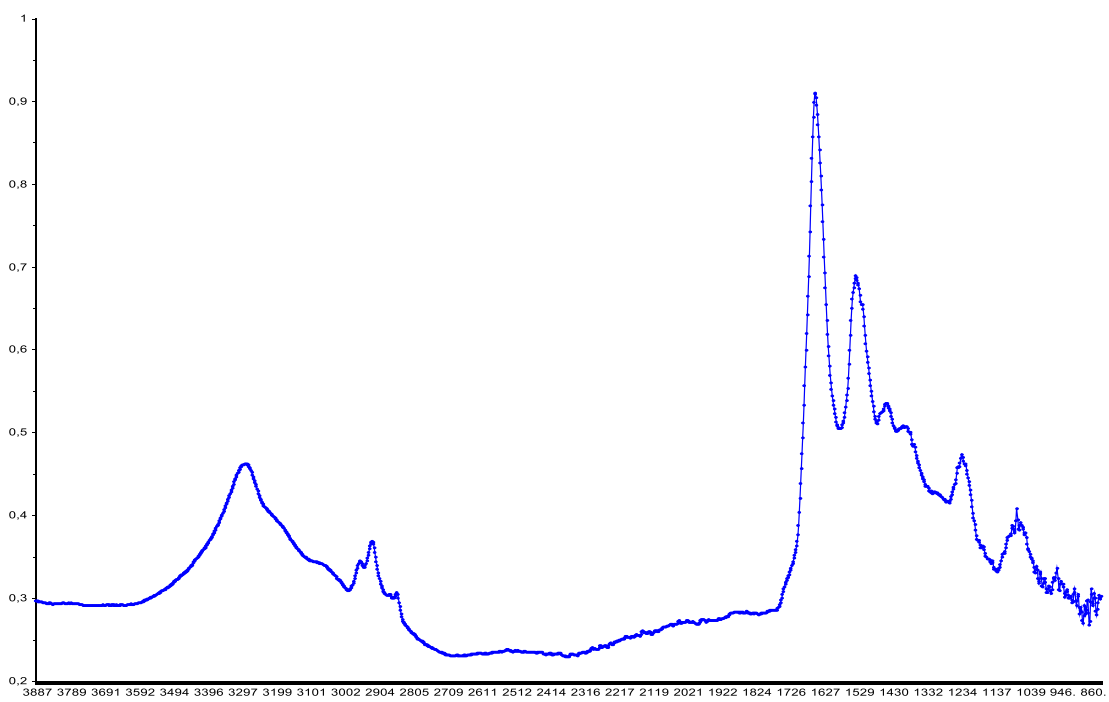
Les spectres IR nécessitent un prétraitement préalable. Nous avons successivement réalisé :

- un lissage de Savitzky-Golay (polynôme d'ordre 3, sur 7 points) qui permet d'éliminer le bruit ;
- une correction de la ligne de base et du phénomène de diffusion couramment observé sur des cellules isolées et afin d'uniformiser les intensités des spectres et s'affranchir de la variabilité d'épaisseur des cellules ;
- une dérivée seconde des spectres avec lissage Savitzky-Golay sur 13 points afin d'augmenter le contraste entre pics voisins tout en éliminant le bruit de mesure amplifié par la dérivée seconde.

La figure 41 présente les effets de tels prétraitements dans deux régions d'intérêt : la région des lipides, de 3000 à 2800 cm<sup>-1</sup> (spectre B1 et sa dérivée seconde C1) et celle des bandes amide I et amide II des protéines, de 1800 à 1400 cm<sup>-1</sup> (spectre B2 et sa dérivée seconde C2).

**A**

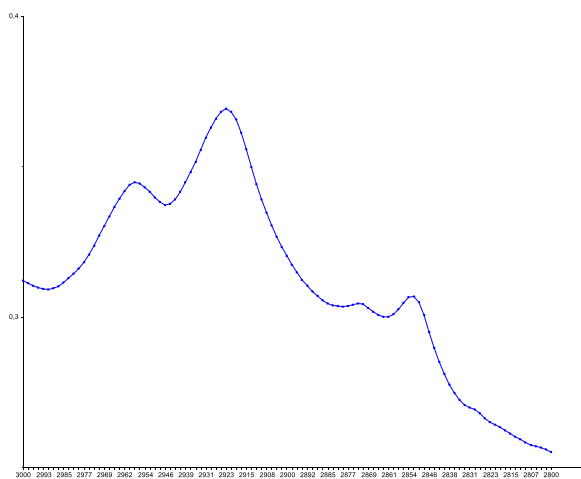
Absorbance



Nombre d'onde (cm<sup>-1</sup>)

**B1**

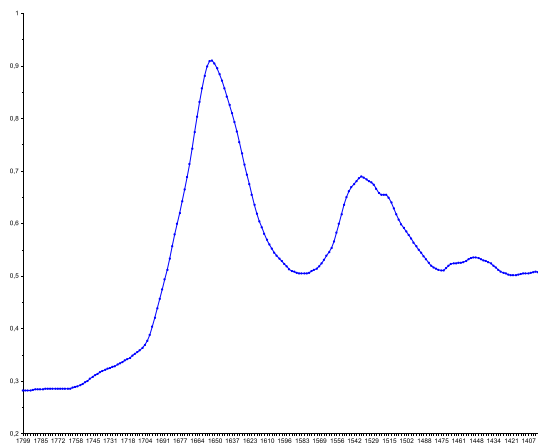
Absorbance



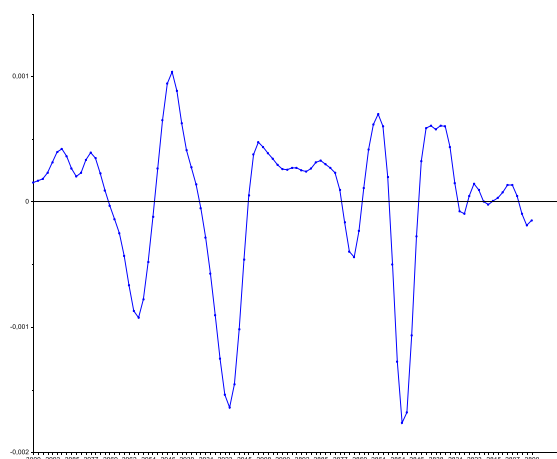
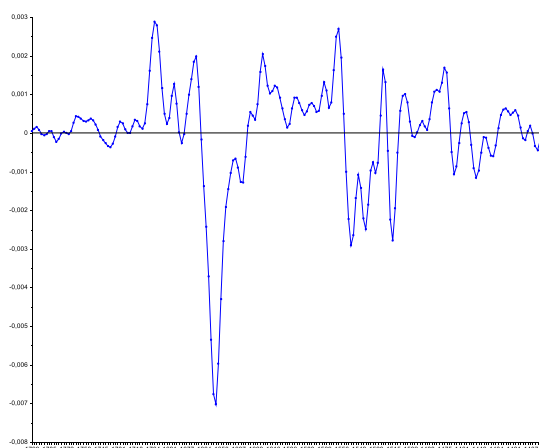
Nombre d'onde (cm<sup>-1</sup>)

**B2**

Absorbance



Nombre d'onde (cm<sup>-1</sup>)

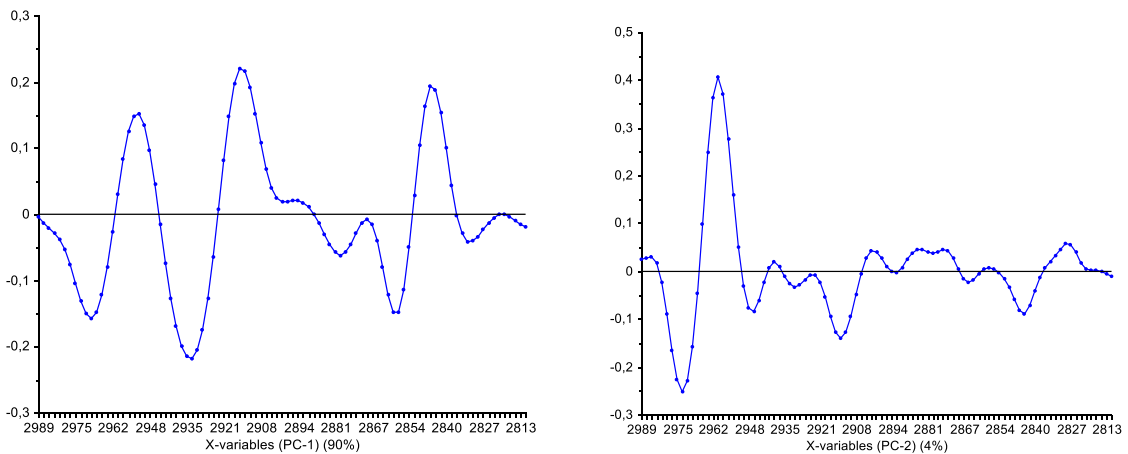
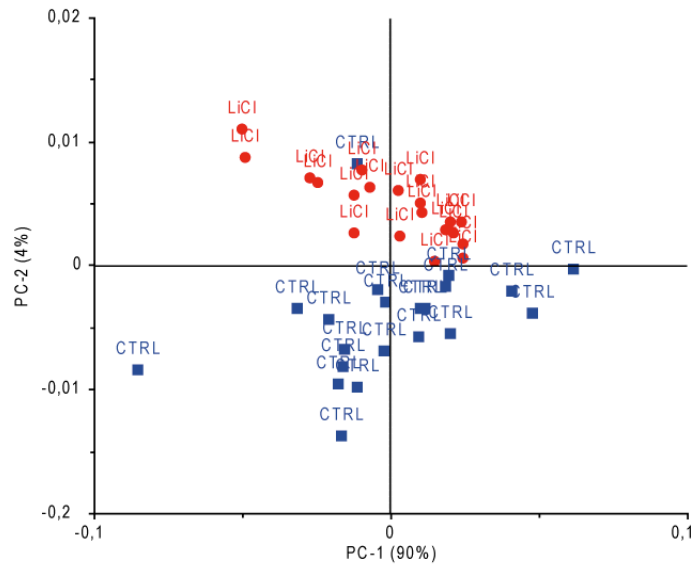
**C1**Nombre d'onde (cm<sup>-1</sup>)**C2**Nombre d'onde (cm<sup>-1</sup>)

**Figure 41: Spectre IR enregistré au niveau du noyau d'une cellule de Schwann isolée.** A. Spectre après lissage et correction de la diffusion : B1 région des lipides (3000 - 2800 cm<sup>-1</sup>) et B2 région des bandes amide I et II (1800 - 1400 cm<sup>-1</sup>). Dérivées secondes des spectres B1 et B2 avec lissage Savitzky-Golay sur 13 points : C1 région des lipides et C2 région des bandes amide I et II.

Les premiers essais d'ACP ont été réalisés à partir des spectres enregistrés dans le compartiment nucléaire et dans le cytosol au niveau d'extension cellulaire, sur des cellules MSC80 contrôles ou traitées pendant 24h au LiCl 10 mM. Les régions choisies pour tester la méthode ACP sont celles attribuées aux lipides et aux protéines. A priori, ces deux régions devraient permettre la séparation des groupes de spectres : noyau vs cytoplasme, contrôle vs lithium. L'ACP a été réalisée sur la région lipidique correspondant aux absorptions des chaînes lipidiques, élongation des CH<sub>3</sub> et CH<sub>2</sub>.

La figure 42 montre la carte vectorielle construite à partir des deux premiers vecteurs propres. Les deux populations de cellules ont une forte homogénéité entre les spectres car les points sont bien regroupés. Le deuxième vecteur propre PC-2 permet de distinguer les deux populations de cellules ; cependant, les coefficients de ce vecteur sont très faibles et la discrimination est donc peu significative. L'interprétation des vecteurs propres est possible comme l'illustrent leurs représentations (figure 42).

Nous avons obtenu un résultat similaire (donc pas significatif) dans la région des protéines.



**Figure 42: Résultats de l'analyse en composantes principales des spectres enregistrés au niveau du cytoplasme des extensions de 40 cellules (20 cellules contrôles et 20 cellules traitées au LiCl pendant 24h). Région des lipides : de 3000 à 2800  $\text{cm}^{-1}$ .**

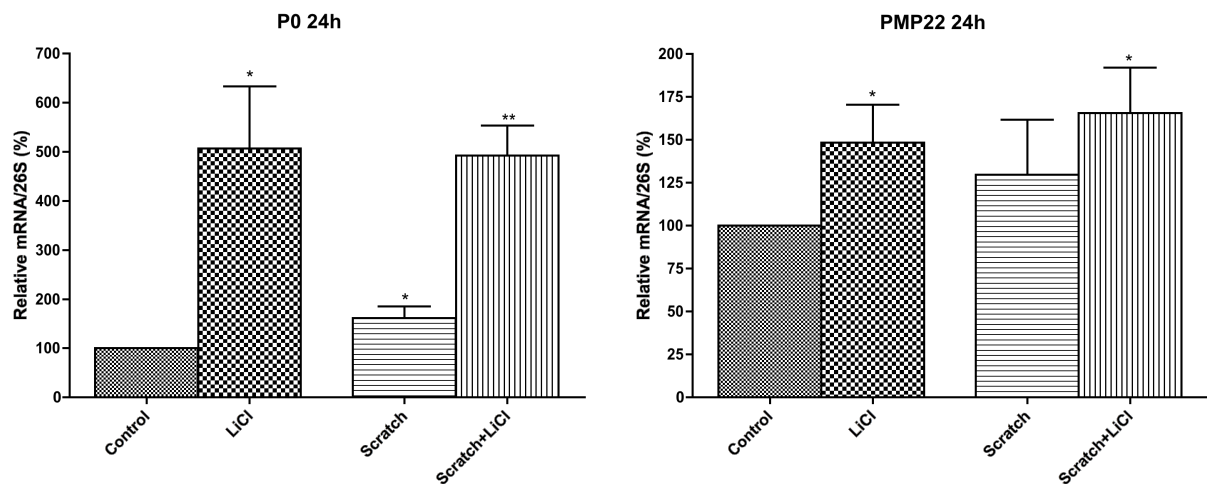
Ces premiers essais encourageants montrent donc quelques différences entre les cellules MSC80 contrôles et traitées durant 24h au LiCl mais ils nécessitent d'être consolidés en augmentant considérablement la taille du groupe d'étude ( $n=100$  semble un minimum pour ce type d'étude) et en augmentant le temps d'incubation des cellules en présence de LiCl. Il est également important de noter que les cellules de Schwann ont montré des difficultés à adhérer et à se développer sur les lames MirrIR. Nous envisageons dorénavant un prétraitement au collagène I des substrats pour retrouver des conditions d'adhésion plus proches de celles obtenues sur plastique.

Une session d'expériences est d'ailleurs prévue à cette fin sur la ligne SMIS durant le mois de novembre 2011.

## IV. Etudes dans un contexte lésionnel

### 1. Etude de la régulation de l'expression des gènes de la myéline dans un contexte lésionnel

Nous avons vu précédemment que la voie Wnt/ $\beta$ -caténine tient un rôle majeur dans la régulation physiologique des gènes de la myéline. Mais qu'en est-il à la suite d'un évènement pathologique ? Dans un premier temps, nous avons tenté de répondre à l'aide d'un modèle *in vitro* de stries cellulaires. Nous nous sommes intéressés à la réponse transcriptionnelle de la lignée de cellules de Schwann de souris à la suite d'une lésion mécanique et au traitement par le LiCl (Figure 43). Un tapis cellulaire de CS est strié à l'aide d'une pointe stérile de 200 $\mu$ l, l'ensemble des cellules de la boîte est utilisé pour doser l'expression des gènes de la myéline par PCR quantitative.



**Figure 43: Effets d'une lésion mécanique sur la régulation des gènes de la myéline.** Les cellules MSC80 confluentes sont striées, le cas échéant induites au LiCl (10mM) pendant 24h et le milieu de culture changé. L'expression des gènes de la myéline est dosée par qPCR et normalisée par rapport au 26S. Chaque test statistique se rapporte au cas « control ». \* $p < 0,05$  ; \*\* $p < 0,01$  après t-Test;  $n = 4$

La stimulation des gènes de la myéline en réponse à une lésion mécanique est significative pour le gène P0 (162% par rapport au témoin). En revanche, l'induction est moindre pour le gène PMP22 (130% par rapport au témoin). Ce résultat soulève la question de la voie de signalisation empruntée pour induire l'expression significative de P0. Nous avons vu précédemment que la voie Wnt canonique régulait directement l'expression des gènes de la myéline P0 et PMP22 dans les CS. La lésion d'une monocouche de cellules suffit-elle à induire l'activation de la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine ?

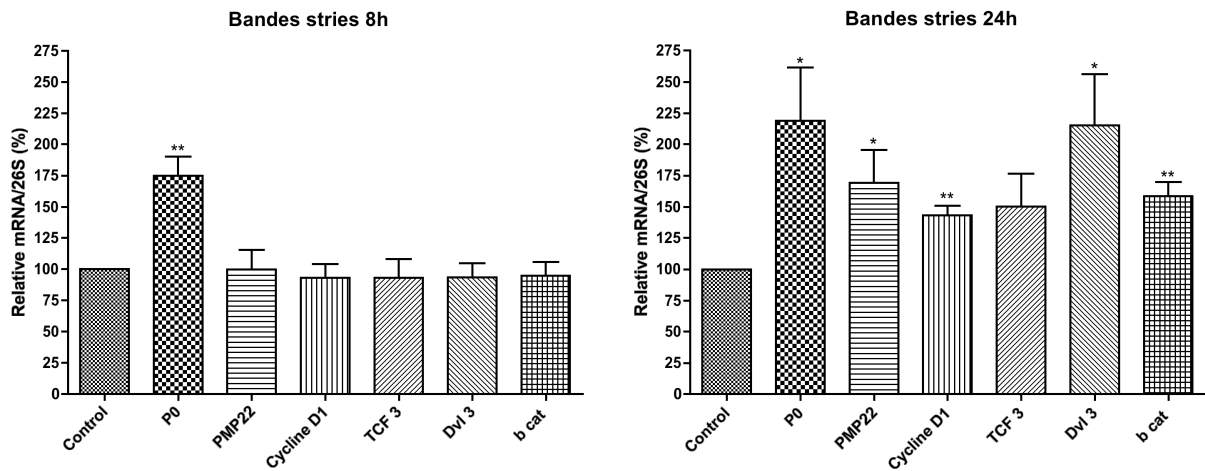
En parallèle, nous avons dosé l'expression de ces mêmes gènes de la myéline en présence ou non de chlorure de lithium (10mM), à la suite ou en l'absence de strie. L'utilisation du LiCl a un effet significatif sur l'induction des gènes P0 et PMP22. Il active de l'ordre de cinq fois l'expression du gène P0 et augmente de 50% celle de PMP22. L'action conjointe de la strie et du lithium induit significativement l'expression des gènes de la myéline P0 et PMP22.

Est-il possible que le chlorure de lithium ait une action synergique de la lésion mécanique ? Les niveaux d'expression en présence de lithium seul ou à la suite de la strie étant équivalents, on peut émettre l'hypothèse que l'action de l'inhibiteur spécifique de la GSK3 $\beta$  est prédominante à ce stade de 24h. Cet effet majeur du LiCl pourrait aussi s'expliquer par le fait que nous dosons la variation d'expression des gènes sur l'ensemble des cellules présentes dans la boîte de culture. La réponse au LiCl et à la lésion comporte donc les cellules lésées et avoisinant la lésion mais aussi des cellules éloignées de la strie qui n'ont subi aucune lésion. Au regard de ces résultats, il apparaît intéressant de déterminer la voie de signalisation activée par la strie ainsi que le niveau d'activité de la GSK3 $\beta$ .

## **2. Effets d'une lésion mécanique sur la voie Wnt**

Dans un deuxième temps de l'étude, nous avons restreint notre analyse aux cellules à proximité immédiate de la strie afin de ne pas diluer la réponse au stress mécanique dans un environnement trop grand. Notre observation s'est portée sur les temps 8h et 24h (Figure 44) après le scratch et nous avons analysé l'expression des gènes de la

myéline P0 et PMP22 ainsi que plusieurs membres de la voie Wnt canonique (Dvl3, TCF3,  $\beta$ -caténine et un des gènes cibles, cycline D1).



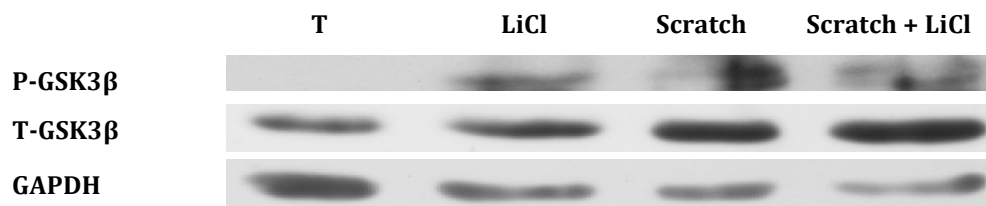
**Figure 44: Régulation de l'expression des gènes de la myéline et de la voie Wnt 8h et 24h après une expérience de strie.** Les cellules MSC80 à confluence sont striées, puis une étroite bande de cellules entourant la strie est prélevée pour doser la variation d'expression des gènes de la myéline P0 et PMP22 ainsi qu'une partie des gènes de la voie Wnt. \*\* $p < 0,01$  après t-Test ;  $n = 4$

Huit heures après la lésion, seule l'expression de P0 est induite (175%), aucun effet n'est observé sur PMP22. La totalité de l'expression des membres de la voie Wnt canonique est inchangée. L'induction du gène codant pour P0 pourrait s'expliquer par le réservoir d'acteurs de la voie Wnt déjà disponibles au sein de la cellule. Cet effet très rapide (8h) ne se traduirait alors pas encore par une transcription augmentée des membres de la voie Wnt.

Nous avons réalisé cette même analyse 24h après la lésion. L'induction de P0 est maintenue et même légèrement augmentée par rapport à 8h (219%). L'expression du deuxième gène de la myéline est elle aussi induite (169%). L'observation de l'expression de quelques membres de la cascade canonique traduit un allumage de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine en réponse à la lésion mécanique. La totalité des gènes de la voie étudiée ont une expression augmentée (150% pour TCF3, 215% pour Dvl3, 158% pour  $\beta$ -caténine et 143% pour la cycline D1) à l'exception du facteur de transcription TCF3. Il se pourrait que les autres membres des TCF/LEF (TCF1, TCF4 ou LEF1) soient augmentés.



Nous avons aussi vérifié l'état de phosphorylation de la GSK3 $\beta$  par Western Blot, 8h et 24h après la strie, à la suite ou non de d'une induction au LiCl. Lorsque la voie Wnt est activée, la GSK3 $\beta$  est phosphorylée par Dvl afin d'être dégradée. Il existe plusieurs sites de phosphorylation. Nous avons étudié la sérine en position 9 qui est particulièrement exposée à l'action de Dvl. L'état de phosphorylation de la GSK3 $\beta$  n'est pas modifié à 8h (non montré) tandis qu'à 24h (Figure 45), on constate une augmentation de la phosphorylation de la GSK3 $\beta$  après traitement par le LiCl. La lésion a aussi augmenté la quantité de GSK3 $\beta$  totale et phosphorylée, alors qu'un traitement par le LiCl après la lésion ne semble pas modifier l'état de phosphorylation de la GSK3 $\beta$ .

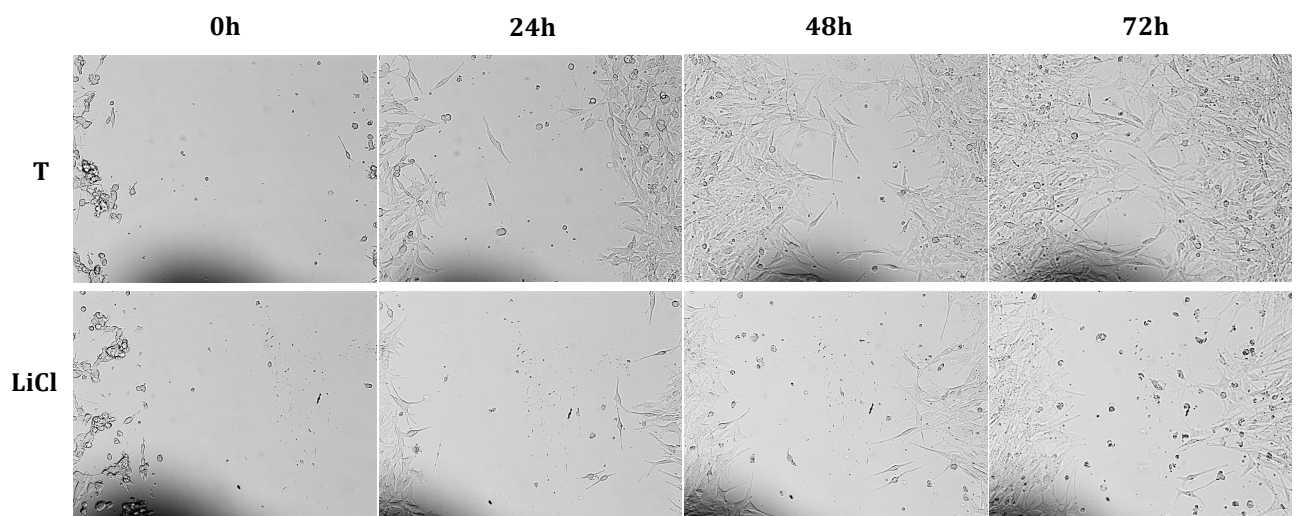


**Figure 45: Variation de la quantité de protéine P-GSK3 $\beta$  24h après une strie.** (P) forme phosphorylée de la GSK3 $\beta$ , (T) Forme totale de la GSK3 $\beta$ . La quantité de GSK3 $\beta$  phosphorylée est augmentée à la suite d'un traitement au LiCl, d'une strie et d'une strie traitée au LiCl. Ce western blot est représentatif de l'expérience réalisée trois fois.

Ces expériences de strie d'un tapis confluent de cellules de Schwann peuvent constituer un bon modèle d'étude *in vitro* du phénomène de lésion. En effet, avec ce modèle nous nous plaçons en dehors du contexte de démyélinisation qui fait intervenir la réponse inflammatoire et l'importance des signaux qui y sont mis en jeu. Au cours de ce phénomène de remyélinisation, on assiste à la ré-activation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine 24h après la lésion mécanique et à l'induction des gènes de la myéline P0 et PMP22.

Le chlorure de lithium que nous avons utilisé à la fois sur une large plage cellulaire et pour une fine bande exerce son action inhibitrice sur la GSK3 $\beta$  pour des résultats différents. Au cours de la première partie de cette étude, la réponse cellulaire à la lésion mécanique (scratch seul) est diluée dans un trop grand environnement. Le lithium agit sur l'ensemble des cellules dont la grande majorité est éloignée de la strie. Dans un second temps, nous avons considérablement restreint notre surface d'étude. La réponse à la lésion, à la remyélinisation (scratch seul), est mieux perçue et plus finement détectée.

Afin de nous assurer que l'augmentation de l'expression du gène de la myéline P0 ne passe pas par un effet prolifératif sur les cellules de Schwann, nous avons réalisé des expériences de comptage cellulaire dans chacune des conditions. Le chlorure de lithium n'induit pas de prolifération cellulaire. Ce dernier point est appuyé par l'observation des photographies (Figure 46) prises à quatre temps différents (0, 24, 48 et 72h) montrant que la zone libre de cellule créée par la strie est comblée plus rapidement sans l'inhibiteur de la GSK3 $\beta$ . Par ailleurs, nous avons pu constater que la viabilité (mesurée par la résistance de la membrane de cellules sous l'effet d'un champ électrique) cellulaire n'était altérée ni par la lésion mécanique ni par l'ajout de l'inhibiteur du LiCl.



**Figure 46: Recouvrement d'une strie de cellules MSC80 en fonction du temps et de l'induction au LiCl.** Des photographies (x10) d'une strie de cellules MSC80 sont prises à 0h, 24h, 48h et 72h en présence ou non de LiCl (10mM).

Ainsi, grâce à ce modèle *in vitro* nous avons pu montrer que la voie Wnt/ $\beta$ -caténine est réactivée 24h après la lésion ce qui a pour conséquence d'induire l'expression des deux gènes de la myéline, P0 et PMP22. Par ailleurs dans ce contexte précis, le chlorure de lithium n'a pas d'action synergique sur la régulation des gènes de la myéline. En revanche, sur une plus grande zone d'étude, il a la capacité d'induire l'expression des gènes de la myéline en inhibant la GSK3 $\beta$ . Ces observations nous poussent à explorer le comportement des CS dans le cadre d'une remyélinisation *in vivo* ainsi que les effets que peut avoir le LiCl chez la souris.

### **3. Effets du Chlorure de lithium sur remyélinisation après lésion *in vivo* (article 2)**

Au cours de ce travail, nous avons voulu évaluer les effets du chlorure de lithium dans plusieurs conditions pathologiques. Dans un premier temps, nous avons utilisé un modèle de souris dont l'un de ses nerfs faciaux est pincé. L'injection de chlorure de lithium accélère la récupération fonctionnelle du battement des vibrisses par rapport au cas témoin. Par ailleurs, le lithium rétablit les structures de la gaine de myéline et induit l'expression des gènes de la myéline P0 et PMP22.

Dans un second temps et en collaboration avec l'équipe du Dr.Sereda (Max Planck Institute of Experimental Medicine, Goettingen, Germany) notre étude s'est portée sur le nerf sciatique de souris. Là encore le LiCl permet la remyélinisation en induisant l'expression des gènes de la myéline et rétablissant les structures de la gaine.

Nous avons également montré *in vitro* dans les CS de souris que le lithium induit l'expression des gènes et des protéines de la myéline mais aussi l'expression de la  $\beta$ -caténine et sa translocation au noyau. Ce mécanisme passe par une augmentation de la fixation de la  $\beta$ -caténine sur les éléments de réponse aux TCF/LEF localisés dans les promoteurs des gènes P0 et PMP22.

## **GSK3 $\beta$ modulation: a novel therapy for remyelination**

**Joelle Makoukji<sup>1\*</sup>, Martin Belle<sup>1\*</sup>, Delphine Meffre<sup>1</sup>, Ruth Strassart<sup>2</sup>, Julien Grenier<sup>1</sup>, Robert Fledrich<sup>2</sup>, Cosima Fonte<sup>3</sup>, Julien Branchu<sup>1</sup>, Marie Goulard<sup>1</sup>, Catherine de Waele<sup>1</sup>, Frédéric Charbonnier<sup>1</sup>, Michael W Sereda<sup>2,4</sup>, Etienne-Emile Baulieu<sup>3</sup>, Michael Schumacher<sup>3</sup>, Sophie Bernard<sup>1</sup>, and Charbel Massaad<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>University Paris Descartes, Cnrs UMR8194, CESeM, 45 rue des Saints-Pères, 75270, Paris Cedex 06, France

<sup>2</sup>Department of Neurogenetics, Max Planck Institute of Experimental Medicine, Hermann-Rein Str. 3, 37075 Goettingen, Germany.

<sup>3</sup>UMR788, Inserm and University Paris-Sud 11, IFR 93, 80 rue du Général Leclerc, 94276 Le Kremlin-Bicêtre Cedex, France

<sup>4</sup>Department of Clinical Neurophysiology, University of Goettingen, Robert-Koch Str. 40, 37075 Goettingen, Germany.

**Address correspondence to:** Charbel MASSAAD, Cnrs UMR8194, CESeM, University Paris Descartes, 45 rue des Saints-Pères, 75270, Paris Cedex 06, France. Fax/Phone: 33 1 42 86 22 73; E-mail address: [charbel.massaad@parisdescartes.fr](mailto:charbel.massaad@parisdescartes.fr)

- **Number of figures: 5**
- **Word count for the Abstract: 183**
- **Character count : 34 047**
- **Running title: Lithium effect on myelination**

This work was funded by Inserm, Cnrs, University Paris Descartes, and the Association Française contre les Myopathies (AFM). JM, MB, JB received PhD fellowships from the french Ministry of Research (MNRT). DM received a post-doctoral fellowship from NeRF (Neuropole de Recherche Francilien). The authors greatly acknowledge Dr Alain Schmitt of the Cochin Imaging Facility.

**Keywords:** Lithium, GSK3 $\beta$ , Schwann cells, peripheral myelin genes, myelination, Wnt/beta-catenin pathway.

## **Abstract**

GSK3 $\beta$  inhibitors, especially the mood stabilizer Lithium Chloride (LiCl), are also used as neuroprotective or anti-inflammatory agents. We studied the influence of LiCl on myelination, and remyelination in the peripheral nerve. We showed that the treatment of adult mice with LiCl after facial nerve crush injury stimulated the expression of myelin genes, restored the myelin structure and also accelerated the recovery of the whisker movements. LiCl treatment was also able to provoke the remyelination of sciatic nerve after crush. We also demonstrated that peripheral myelin genes MPZ and PMP22 promoter activities, transcripts and protein levels are stimulated by GSK3 $\beta$  inhibitors (LiCl and SB216763) in Schwann cells and in sciatic nerve. LiCl exerts its action in Schwann cells by increasing the amount of beta-catenin and provokes its nuclear localization. We showed by ChIP experiments that LiCl treatment drives beta-catenin to bind to TCF/LEF response elements identified in myelin genes. Taken together, our findings open new perspectives in the treatment of nerve demyelination by administering GSK3 $\beta$  inhibitors like lithium.

**Keywords:** Lithium Chloride / Myelin / peripheral myelin genes / Schwann cells / GSK3 $\beta$  / Wnt/beta-catenin signaling pathway

## **Introduction**

Myelin is essential for the rapid conduction of axonal impulses. Myelination, elicited by Schwann cells, is a complex and fine-tuned process. Peripheral myelin gene expression (Myelin Protein Zero (MPZ), Peripheral Myelin Protein 22 (PMP22)) is tightly regulated [217]. Myelin gene expression is stimulated during the myelination process, which occurs in rodents between postnatal days 0 (P0) and 21 (P21) [218]. Afterwards, those genes are expressed at lower levels in order to maintain myelin turnover. They are re-stimulated only after nerve injuries to initiate remyelination [219].

Peripheral nerve injuries are a usual problem in clinical medicine and the functional outcomes are often poorly satisfactory. Demyelination can occur as a result of neuronal or Schwann cell injury and is usually accompanied or followed by axonal degeneration. Acquired neuropathies may be due to aberrant immune responses, local injury, ischemia, metabolic disorders, toxic agents, or viral infections. To date only few therapeutic treatments are available. They are mostly based on anti-inflammatory agents.

Few cellular signals are known to directly regulate the expression of myelin genes. For instance, we have shown that Wnt/beta catenin signaling pathway is a direct driver of myelin genes expression [220]. Wnt activation inhibits glycogen synthase kinase 3b (GSK3 $\beta$ ) enzyme and prevents beta-catenin degradation. The stabilized beta-catenin is translocated into the nucleus, where it regulates gene transcription by interacting with transcription factors called the T-cell factor/lymphoid-enhancer factors (TCF/LEF or TCFs).

Lithium is an enzymatic inhibitor of GSK3 $\beta$ , and thus mimics Wnt/beta catenin signaling pathway. This drug is widely used as a long-term mood stabilizer for the treatment of bipolar and depressive disorders [221]. Growing evidence demonstrates that lithium has neuroprotective [222] and anti-apoptotic [200] properties, thus, it can be used as a treatment in several neurodegenerative diseases (Huntington's disease [223], Alzheimer's disease [224], Parkinson's disease [225], and also in experimental autoimmune encephalomyelitis (an animal model of multiple sclerosis) [198].

In this article, we report several lines of evidence that the inhibitors of GSK3 $\beta$  (LiCl and SB216763) enhance peripheral myelin gene expression *in vitro* and *in vivo* via the binding of beta-catenin to TCF/LEF transcription factors present in the vicinity of PMP22 and MPZ promoters. Most strikingly, LiCl administration to mice after a crush of the facial nerve, that provokes the paralysis of whiskers, elicited a rapid recovery of their movements. This recovery is concomitant with the stimulation of myelin genes expression and the restoration of the myelin sheath structure around the axons. LiCl also provoked the remyelination of axons after nerve crush of the sciatic nerve. Consequently, our findings open new perspectives in the treatment of demyelinating diseases by administrating GSK3 $\beta$  inhibitors like lithium.

## Results

### **LiCl administration accelerates the functional recovery and ameliorates the phenotype of the facial nerve after nerve injury**

Our aim is to assess the outcome of the administration of LiCl, a widely used inhibitor of GSK3 $\beta$  (IC<sub>50</sub>=10 mM), after motor nerve injury. Therefore, we developed in mice, a model of facial nerve-crush that provokes a local demyelination and consequently a complete palsy of the ipsilateral (crushed) whiskers and an absence of ipsilateral blink reflex. The left facial nerve of eight-weeks old mice was crushed while the right one remained intact to serve as a control (Fig. 1A). We then analyzed by means of Whisker Watcher device the angular velocity of the ipsilateral whiskers movements before and after the crush at different post-lesion time-points (Day post-injury 3 (DPI3), DPI8, and DPI14) in two groups of animals: a group of animals treated with LiCl (IP injection, 50mg/kg/day during 4 days after the nerve-crush) and a group of animals treated with PBS during a similar period of time (placebo) (Fig. 1A).

The mean angular velocity of the whiskers was 56.44°/s in normal animals, and it fell to 0.2°/s at DPI3 in nerve-crushed animals, indicating a dramatic alteration of whiskers movements after facial nerve injury (Fig. 1B). The placebo-treated animals recovered slowly: 8 days after the nerve crush, the velocity was 7.96°/s, and at 14 days, the whisker movements did not reach normal levels ((44.99°/s vs (56.44°/s for normal animals)). Interestingly, the *ip* LiCl administration after the facial nerve-crush accelerated the functional recovery during the first eight days post-lesion. The angular velocity was significantly improved after 3 days of treatment with LiCl: 3.48°/s (LiCl) versus 0.2°/s (placebo). At 8 days, we also observed an improvement in the movements of the whiskers that became merely normal (43.08°/s (LiCl) versus 7.96°/s (Placebo). At 14 days, we can consider that the animal recovered completely because we did not have any significant mean angular velocity difference between the stage normal animals (56.44°/s) and LiCl-treated animals (54.78°/s).

Afterwards, we analyzed the structure of facial nerve at DPI8 by electron microscopy. At this time point, the LiCl-treated animals almost recovered while placebo-treated animals failed to recuperate. The crushed-nerves of LiCl-treated mice exhibited a thicker myelin sheath (Fig. 1C) suggesting a nerve remyelination. This assumption is



comforted by the calculation of the g-ratio (axon diameter/myelin sheath diameter). The g-ratio of placebo treated animals (0.84±0.01) was significantly higher than that of LiCl-treated animals (0.75±0.01) (Fig. 1D). Furthermore, the percentage of myelinated axons is doubled after LiCl treatment (23,31 ± 3,05 (Placebo) vs 47.64± 3.69 (LiCl treated animals, p<0.001) (Fig. 1E). We have analyzed by RT-qPCR the expression of myelin genes. The administration of Lithium enhanced by 2-fold the transcripts of MPZ and PMP22 at DPI3 (Fig. 1F). At DPI8, LiCl did not enhance the expression of myelin genes. In conclusion, our results indicate that LiCl accelerates the functional recovery of whiskers movements after facial nerve crush injury and ameliorates the nerve phenotype.

### **LiCl administration enhances remyelination of the sciatic nerve after nerve injury.**

To confirm the remyelinating effect of LiCl on another peripheral nerve, we performed a nerve crush of sciatic nerve of 8-weeks old mice. Two weeks after the nerve crush, we have treated the animals with LiCl (0.2%) in drinking water during 7 days (Fig. 2A). The administration of LiCl in drinking water is a more clinical relevant setting, since patients receive lithium orally. One week later the animals were sacrificed and we have performed real-time PCR to analyze the effect of LiCl on myelin gene expression, and histological study to observe the effect of LiCl administration on nerve shape. As expected LiCl treatment enhanced the mRNA expression of MPZ (3-fold) and PMP22 (6-fold) (Fig 2B) comparing to placebo treated mice. Furthermore, the crushed-nerve of LiCl-treated mice exhibited a thicker myelin sheath (Fig 2C) suggesting a nerve remyelination. This observation was confirmed by the fact that the g ratio of LiCl-treated mice was lower than that of placebo-treated ones (Fig. 2D). LiCl-treated mice did not show any alteration in the axon diameter compared to controls (not shown). Taken together, our observations demonstrate an increase of myelin sheath diameter around the axons of sciatic nerve in LiCl-treated mice vs. placebo ones.

### **The pharmacological inhibition of GSK3 $\beta$ activates myelin gene expression**

To examine if LiCl has a direct impact on Schwann cells and on myelin gene, we incubated Schwann cell line (MSC80) with LiCl (10mM). LiCl did not elicit any significant effect on MPZ or PMP22 transcripts from 1h to 8h of treatment, but this drug stimulated by 3-fold MPZ transcript after 24 hours of incubation (Fig 3A). Interestingly, LiCl stimulation lasted longer. When MSC80 cells were incubated with LiCl for 48h and 72h, we observed a 20-fold and 54-fold stimulation of MPZ transcript, respectively (Fig. 3A). Stimulation of PMP22 transcript (2.5-fold) was also observed but to a lesser extent than MPZ (Fig. 3A).

These results were confirmed at the protein levels. As shown in Figure 3B, MPZ protein level was enhanced after 24h and 48h of LiCl treatment. This observation is in accordance with the increase of MPZ transcript. Nevertheless, MPZ protein stimulation fell down after 72h of treatment with LiCl. Such a discrepancy between MPZ transcript overexpression and protein decrease was already described [226, 227]. The increase in PMP22 protein expression was time-dependent. LiCl slightly enhanced PMP22 protein expression at 24h. A clear induction of PMP22 protein was observed after 48h and 72h of treatment with LiCl.

Similarly, LiCl was able to enhance myelin gene expression in Schwann cell primary cultures. As depicted in Figure 3C, LiCl augmented protein expression of MPZ and PMP22 in primary Schwann.

To confirm the implication of GSK3 $\beta$  in the regulation of myelin genes, we used SB216763, a more potent and selective inhibitor of GSK3 $\beta$ . MSC80 cells were incubated with SB216763 (10 $\mu$ M) during 3h, 6h or 24h. The expression of MPZ and PMP22 proteins was enhanced after 3h of SB216763 treatment and lasted up to 24h (Fig 3D).

### **LiCl enhances the expression and nuclear localization of beta-catenin without affecting Akt signaling**

LiCl is an inhibitor of GSK3 $\beta$ , which is at the crossroads of several signaling pathways including Wnt/beta-catenin and Akt pathways. For that reason, we investigated which signaling pathway is affected in Schwann cell line after their incubation with LiCl. LiCl treatment did not alter the phosphorylation status of Akt in MSC80 cells, ruling out the intervention of Akt (Fig. 4A). But LiCl stimulated beta-catenin protein expression in MSC80 cells (from 24h until 72h of treatment) (Fig. 4B), and in

primary Schwann cells (24h) (Fig. 4C). SB216763 also increased the expression of beta-catenin after 3h of treatment until 24h (Fig 4D). The mimicking of Wnt/beta-catenin pathway by LiCl was also confirmed by the 15-fold stimulation of a TOP-FLASH-luciferase construct by LiCl (Fig. 4E). This promoter contains several binding sites for TCF/LEF transcription factors that are downstream Wnt/beta-catenin signaling pathway. LiCl also enhances the expression of Cyclin D1 and Connexin 43 genes, which are Wnt/beta-catenin target genes (not shown)

Confocal microscopy analysis revealed that in control MSC80, the majority of beta-catenin was localized in the plasma membrane as well as in the cytoplasm. Only a small fraction was nuclear (Fig 4F). When the cells were treated with LiCl during 24h, a part of beta-catenin was transferred into the nucleus. After 48h and 72h of LiCl treatment, beta-catenin was localized in the cytoplasm, cell membrane and the nucleus. Thus, the incubation of MSC80 cells with LiCl triggers the relocalisation of a fraction of beta-catenin into the nucleus.

Taken together, these results demonstrate that in Schwann cells, LiCl is able to mimic Wnt/beta-catenin signaling pathway [228], without affecting Akt phosphorylation.

### **LiCl promotes beta-catenin recruitment on TCF/LEF binding sites on myelin gene promoters**

We investigated the incidence of LiCl treatment on the regulation of myelin gene promoters by transfecting MSC80 cells with MPZ-luc or PMP22-luc constructs and incubating them with LiCl (10mM) during 24h. As shown in Figure 5A, LiCl enhanced by 4-fold and by 3-fold the transactivation of MPZ-luc and PMP22-luc constructs, respectively.

We also performed ChIP experiments to identify the molecular targets of LiCl on the level of MPZ and PMP22 promoters. We have already shown that MPZ and PMP22 promoters contain active TCF/LEF-binding sites (Fig. 5B and C) [220]. ChIP analysis demonstrated that beta-catenin recruitment by TCF/LEF binding domain (localized -8487/-8471bp on the level of the MPZ promoter) was enhanced by 15-fold after 1h of LiCl treatment. Concerning the PMP22 promoter, we identified a potential binding site of TCF/LEF in position +107/+124. ChIP assays showed that beta-catenin recruitment increased by 30-fold after one hour of incubation with LiCl.

## Discussion

Glycogen synthase kinase 3 (GSK3 $\beta$ ) is emerging as a prominent drug target in the central nervous system [229], in anticancer therapy [230] and also in diabetes. Lithium, a well-known inhibitor of GSK3 $\beta$ , is commonly used in the treatment of bipolar disease as a mood stabilizer [197, 231]. Recent *in vitro* and *in vivo* studies have demonstrated that lithium can be used in the treatment of acute brain injuries (ischemia, brain trauma) and in neurodegenerative diseases (Parkinson's disease, Alzheimer's disease, multiple sclerosis and Huntington's disease) [198, 199]. Therefore, lithium has a neuroprotective effect by preventing neuronal death and stimulating neurogenesis [200]. For example, in primary neuronal cultures, lithium protected neurons from apoptosis induced by excessive glutamate [202]. Low doses of lithium were also shown to decrease striatal lesion induced by a NMDA receptor agonist, in a rat excitotoxic model of Huntington's disease [223] and to reduce *tau* hyper-phosphorylation which is a pathological hallmark of Alzheimer's disease [224], through inhibiting GSK3 $\beta$ , Akt [183], protein kinases A [232] and C pathway [233]. Neuronal death induced by Parkinson's disease toxins is also blocked by lithium treatment *in vivo* and *in vitro* [225]. Lithium is not only known to decrease brain damages, but also to promote survival, proliferation and neuronal differentiation of neural progenitor cells *in vitro* and after transplantation for treating spinal cord injury [234]. Lithium treatment enhances the expression of cell survival genes like Bcl-2, Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF), Hsp70, beta-catenin and CREB [201-203]. This drug also attenuates the expression or activity of pro-apoptotic genes like Bax, caspase, cytochrome c and  $\beta$ -amyloid peptide. Lithium has also an anti-inflammatory potential in the brain [235]. Lithium reduces microglia activation, and leukocyte infiltration in the spinal cord in EAE, suggesting its possible use in MS [198]. Nevertheless, the effect of LiCl or GSK3 $\beta$  inhibitors on myelination or remyelination of the peripheral nervous system is still unexplored. This issue is of high importance in order to use this drug to enhance remyelination after nerve injury.

Therefore, we performed nerve-crush of the facial and sciatic nerves to study the effect of LiCl on remyelination after myelin injuries. In the model of facial nerve crush, LiCl administration accelerated the recovery of the movements of the whiskers of injured animals. Eight days after the crush, lithium treated animals practically totally recovered, while placebo treated ones still had a palsy of the whiskers. LiCl greatly

ameliorated the phenotype of the lesioned nerve: it enhanced the expression of myelin genes, and increased the thickness of the myelin sheaths as indicated by the decrease of the g ratio. Consequently, after LiCl administration, the number of myelinated axons is doubled. We obtained comparable results in another peripheral nerve, the sciatic nerve. LiCl administration in drinking water ameliorates sciatic nerve phenotype, increased myelin sheaths thickness and enhanced myelin gene expression. These encouraging results demonstrate that the administration of lithium either by injection or orally (like in the case of patients) have beneficial effects in the treatment of myelin injuries.

But does LiCl exert its positive effects on Schwann cells? To address this question, we performed *in vitro* experiments in primary cultures of Schwann cells and in MSC80 cell line. After 24h, LiCl stimulated MPZ and PMP22 promoters, transcripts and proteins. Interestingly, in MSC80 cells, LiCl enhanced myelin gene expression after 48h and 72h of treatment. We obtained a robust stimulation of MPZ mRNA (20-fold at 48h and 50-fold at 72h). This stimulation was of a lesser extent at the level of the PMP22 protein, probably due to post-transcriptional regulation of PMP22 mRNA. The kinetic of stimulation of MPZ and PMP22 by two diverse GSK3 $\beta$  inhibitors (SB216763 and LiCl) was different. While SB216763 rapidly stimulated MPZ (i.e. after one hour of treatment), LiCl activated MPZ expression only after 24h. This discrepancy may be due to the fact that these drugs have different potency in inhibiting GSK3 $\beta$ . Actually, LiCl has an IC<sub>50</sub>=10 mM, while SB216763 is a more potent and selective inhibitor (IC<sub>50</sub>=34 nM). The treatment of cells with LiCl did not trigger any modification in the phosphorylation state of Akt, but enhanced the expression and nuclear localization of beta-catenin and stimulated a TCF/LEF containing promoter (TOP-FLASH). Therefore, the stimulation of MPZ and PMP22 is not due to the activation of the Akt pathway but via the beta-catenin/TCF signaling. The nuclear stabilized beta-catenin binds to TCF/LEF transcription factors present in the vicinity of PMP22 and MPZ promoters as suggested by CHIP assays. Those observations are in accordance with our previous results showing that Wnt/beta-catenin pathway is essential for myelin gene expression [220].

In conclusion, Lithium is known to exert several beneficial effects on axonal regeneration and our data demonstrate that it also has remyelinating effects. Therefore, this molecule could constitute a potential treatment for nerve injuries where axonal lesions and demyelination coexist. Our results provide new evidence that the GSK3 $\beta$

could be considered as an important actor in the expression of myelin genes, and they open novel perspectives in the treatment of nerve injuries by using inhibitors of GSK3 $\beta$  like lithium.

## **Materials and Methods**

### **Cell culture**

The mouse Schwann cell line (MSC80) was maintained in Dulbecco's minimal essential medium (DMEM) supplemented with 10% decompemented fetal calf serum (Hyclone-Perbio), 100U/mL penicillin, 100mL/mL streptomycin (Gibco) and 0.5µg/mL fungizone (Gibco). All cultures were grown at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. Primary Schwann cells were isolated from the sciatic nerves as described by Tawk et al [220].

### **Plasmids and chemicals**

MPZ-luc was graciously provided by Dr G Lemke (San Diego, USA), PMP22-luc by Dr P Patel (Houston, USA) and TOP-FLASH-luc plasmid by Dr RT Moon (Washington, USA). LiCl and SB216763 were purchased from Sigma-Aldrich (France).

### **Transient transfections**

MSC80 cells were transiently transfected using Effecten reagent (QIAGEN) as described by Makoukji et al [227]. Sixteen hours after transfection, the medium was replaced by DMEM containing or not LiCl or SB216763.

### **Quantitative and semi quantitative RT-PCR experiments**

Total RNA from cultured cells or nerve was obtained using Trizol® reagent (Invitrogen, France). One µg was reverse transcribed with random primers from Promega (Charbonnières, France) and reverse transcriptase M-MLV-RT from Invitrogen (Cergy Pontoise, France).

Quantitative real time PCR was performed with standard protocols using SYBR®Green ROX Mix (ABgene, France) as a fluorescent detection dye in **ABI PRISM®** 7000 as described by [227]. The primer sequences used in real time PCR are listed below:

MPZ F 5'GTCAAGTCCCCAGTAGAA3'

MPZ R 5'AGGAGCAAGAGGAAAGCAC3'

PMP22 F 5'AATGGACACACGACTGATC3'

PMP22 R 5'CCTTTGGTGAGAGTGAAGAG3'

26S F 5'AGGAGAAACAACGGTCGTGCCAAAA3'

26S R 5'GCGCAAGCAGGTCTGAATCGTG3'

Connexin 43 F 5'TCCTACTCTCGCCTATGTCT3'

Connexin 43 R 5'GTAGTTCGCCCAGTTTTGC3'

LEF4320 F 5'TCTCTGGACAGAAAATGGAC3'

LEF4320 R 5'TTAACTCCTGGCAATCCTG3'

LEF1318 F 5'GGTCCTGAGTTCAAATCCC3'

LEF1318 R 5'GAACCTTCATCTGTTGTTGG3'

### **Western Blot**

Western Blots were performed as described in Tawk et al [220]. Primary antibody against beta-catenin (mouse monoclonal) was purchased from Millipore. Primary antibodies against MPZ (rabbit polyclonal) and PMP22 (rabbit polyclonal), were purchased from Abcam,  $\beta$ -catenin (mouse monoclonal) from BD Biosciences. Secondary antibodies used for western blotting were: HRP-conjugated goat anti-mouse IgG and HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG (Upstate). Secondary antibodies used for immunofluorescence were Alexa 488 goat anti-mouse purchased from Molecular Probes.

### **Immunocytochemistry**

MSC80 cells were grown at the density of  $0.4 \times 10^5$  cells in two-well glass slides (Lab-Tek Brand, Nalge Nunc International, Naperville, IL). Eighteen hours later, the cells were incubated with LiCl (10 mM) for 24, 48 and 72 hours. Cells were then fixed with paraformaldehyde (4%) for 20 minutes. After three washes with PBS (1X), cells were permeabilized with Triton X100 (1%) for 30 minutes. Then, cells were incubated with



primary antibodies against beta-catenin (dilution 1:250) overnight at 4°C, and then labelled with conjugated antibodies (dilution 1:500) for 1 hour in the dark at room temperature. The slides were imaged using a confocal microscope LSM510 (Carl Zeiss Inc.) with a 20x or 40x (NA:1.2) lens and sequential excitation was performed with laser lines 488 nm (Ar.Ion laser) and 633 nm (HeNe laser). The DNA dye TO-PRO-3 (red) was used to identify the nuclei.

## **Chromatin immunoprecipitation**

MSC80 cells, treated with LiCl for 1h, were fixed with 1% formaldehyde added to the medium for 10 min, scraped, and collected by centrifugation. ChIP experiments were performed using beta catenin antibody as described in Tawk et al [220].

## **Facial nerve crush**

### **A. Animals and drug treatment**

These experiments were performed on eight-weeks old male adult C57bl6 pigmented mice (30-35 g) obtained from R. Janvier (Le Genest-St-Isle, France). The experiments were done in accordance with the requirements of the French “Ministère de l’Agriculture et de la Pêche” Décret no. 87-848, and to the European 7 Communities Council Directive of November 24, 1986 (86/609/EEC). Each experiment was made to minimize both the number and suffering of animals.

### **B. Facial nerve crush**

Mice were anesthetized using a mixture of ketamine (0.5 ml), and Xylazine (1ml), and the left facial nerve near its exit from the stylomastoid foramen was exposed and crushed by applying a pressure of 5 seconds using a forceps on the trunk of the facial nerve up to its division in superior and inferior branches. After surgery, the wound site was closed and animals were allowed to recover. Non-operated mice were used as controls. All the crushes were made by the same surgeon to minimize the variation of

the crush in between the different animals. Following injury, the animals displayed a unilateral facial palsy with return of some movements of eyelids and whisker movements after 14 days.

### **C. Behavioral study**

Mice received a treatment after the nerve lesion: a 50mg/kg/day injection i.p. of LiCl (n=6 per group) during four days. The control or placebo (n=6) received an injection of PBS 0,1M. The movements of the whiskers were quantified at the four recovery times (DPI3, DPI8, and DPI14).

#### *Procedures used with the whisker watcher*

The beginning of the quantification of the whiskers movements was performed one day after the facial nerve crush. For that purpose, a device was fixed under general anesthesia (ketamine-xylazine) to the mice's skull using dental cement (SuperBond, Sun Medical). This device allowed us to directly attach the head of the mice and to restrain head movements.

The animals were then anesthetized by isoflurane and attached to the stand to block head movements to avoid recordings of parasite movements. The stand is composed of a cylinder in which the mouse is placed and of a rod enabling the fixation of the animal. A silver adhesive foil was then placed on vibrissae of the third rank of the left side. A sensitive camera placed above the vibrissae allowed the detection of all vibrissae movements (Whisker-watcher, Arrington Research, Inc.). The mice were stimulated either with food or air breeze in the eyes. Every mouse was recorded at least 6 times for each day by the Whisker Watcher software. The data collected corresponded to the position Y and position X (providing the two-dimensional coordinates of the marker in mm), the angle variation of the vibrissae (degree) and the angular velocity (degree/second).

### **Sciatic Nerve Crush Injury**

Mice were housed in a temperature-controlled room with a 12 hrs light/dark cycle. All experiments were performed on age-matched male mice. All aspects of animal care and surgical procedures were approved by the Regional Ethic Committee (authorization CE2-04) and followed the National Institutes of Health guidelines for care and use of laboratory animals at Washington University. Adult 8-weeks old male mice were anesthetized, and the right sciatic nerve was crushed by using fine forceps (needle holder 13cm smooth (FST, Germany) for 40 sec just distal to the sciatic notch. As a control, the contralateral side was exposed but remained uninjured. Following the specified length of time, the mice were killed for the immediate collection of tissues for histology or RNA isolation.

### **Methylene blue/Azur II staining and transmission electron microscopy**

Mice were deeply anesthetized by intraperitoneal injection of 40 mg/kg ketamine and 30 mg/kg xylazine and then intracardially perfused with 4% paraformaldehyde, 2,5% glutaraldehyde, and 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4. Tissues were dissected and immersed in the same fixative solution at 4°C overnight, washed in phosphate buffer, postfixed in 2% osmium tetroxide, dehydrated in graded ethanol series, and embedded in epoxy resin. Semithin sections were cut with a glass knife at (0,5-1µm) and stained with methylene blue/azur II. For electron microscopy, ultrathin sections (50–90 nm) were cut on an ultramicrotome (8800 Ultratome III, LKB Bromma) and collected on 300-mesh nickel grids. Staining was performed on drops of 4% aqueous uranyl acetate, followed by Reynolds's lead citrate. Ultrastructural analyses were performed in a JEOL jem-1011 electron microscope and digitalized with DigitalMicrograph software. Electron microscope. Image acquisition was performed on the Cochin Institute Imaging Facility. Electron microscopy images were used for calculating the g-ratio and axon perimeter using NIH ImageJ software. At least 100 randomly selected axons were analyzed per animal. At least three animals were used per genotype. Healthy axons were defined on the basis of the presence of intact membranes and the normal complement of organelles.

## **Statistical analysis**

Unless otherwise specified, means of treatment groups were compared with one-way variance analysis (ANOVA). When the ANOVA showed that there were significant differences between the groups, Tukey's test was used to identify the sources of these differences. A p value  $\leq 0.05$  was considered statistically significant. The variations of the angular speed were submitted to a statistical analysis by the Kruskal-Wallis test. The results are significant if  $p < 0.05$ .

## Legends

### **Figure 1: Effect of LiCl administration on functional recovery of the whiskers and on the phenotype of the facial nerve after the nerve-crush.**

(A) Nerve crush of the left facial nerve was performed in wild type mice at the age of eight weeks via a forceps applying a standardized pressure for 5 seconds. One group received directly after the nerve-crush an *ip* injection of LiCl (50mg/Kg/day for four days) (LiCl). The other group received PBS injection as a placebo (PI). Normal animals (Control) were not nerve-crushed.

(B) The mean angular velocity of the whiskers movements of all animals was analyzed by means of WhiskerWatcher software. Results are expressed in degree/second ( $^{\circ}$ /s). They are the mean of 6 animals per group; the angular velocity of the whiskers of each animal was analysed three times. \*\*\* $p < 0.005$  using Kruskal-Wallis test.

(C) Eight days after the facial nerve crush, the facial nerve was isolated. Ultra-thin (50-90 nm) cross-sections were prepared from epon-embedded adult facial nerves and stained for myelin.

(1 and 2) low magnification electron micrographs of section of facial nerve from placebo- compared to lithium-injected nerve-crushed animals : scale bar = 2 $\mu$ m.

(3 and 4) High magnification electron micrographs of a representative axon from placebo- compared to lithium-injected nerve-crushed animals. Scale bar = 1 $\mu$ m.

(5 and 6) High magnification electron micrographs of myelin layers from placebo- compared to lithium-injected nerve-crushed animals. Scale bar = 100 nm.

(D) Myelin thickness was estimated by g-ratio (axonal perimeter/outer perimeter) determination using electronic microscopy pictures obtained from facial nerves (12 images per animal, 3 animals per condition). Data are given as means  $\pm$  SEM.

(E) The percentage of myelinated axons per  $\mu\text{m}^2$  was calculated using electronic microscopy pictures. Three animals per condition were used. Data are given as means  $\pm$  SEM.

(F) Facial nerves were dissected three days after the crush. Total RNA was extracted and quantitative real time PCR experiments were performed using primers recognizing PMP22, MPZ genes. The RT-qPCR was normalized using

26S and GAPDH RNA. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  by Mann-Whitney's test when compared to control.

**Figure 2: Effect of LiCl on the remyelination of sciatic nerve after nerve crush.**

(A) Nerve crush of the right sciatic nerve was performed in mice at the age of eight weeks via a forceps applying a standardized pressure for 40 seconds. One group received 2 weeks after nerve crush 0,2% Lithium Chloride (LiCl) for seven days. All animals were sacrificed four weeks after the nerve crush and the sciatic nerves were analyzed.

(B) Sciatic nerves distal to crush were dissected. Total RNA was extracted and RT-qPCR experiments were performed using primers recognizing MPZ and PMP22. The RT-qPCR was normalized using 26S RNA. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  by Mann-Whitney's test when compared to control.

(C) Electron micrographs of sciatic nerves 4 weeks post crush from placebo (Pl) and LiCl treated mice.

(1 and 2) low magnification electron micrographs of section of sciatic nerve from placebo- compared to lithium-treated nerve-crushed animals : scale bar = 2.5 $\mu$ m.

(3 and 4) High magnification electron micrographs of a representative axon from placebo- compared to lithium-treated nerve-crushed animals. Scale bar = 1 $\mu$ m.

(D) G-ratio analysis of sciatic nerves from placebo (n=8) and LiCl (n=8) treated animals 4 weeks post crush. At least 100 axons per animal were quantified on EM level.

**Figure 3: Effect of LiCl on the expression of MPZ and PMP22 in MSC80 cells and in primary Schwann cells**

MSC80 cells were incubated with LiCl (10 mM) from 1 to 72 hours. (A) Total RNA was extracted and quantitative real time PCR experiments were performed using primers recognizing MPZ or PMP22. The RT-PCR was normalized using 26S RNA and they represent the mean +/- SEM of 4 independent experiments. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  by Mann-Whitney's test when compared to control. (B) Proteins were extracted and Western

blots were performed using either anti-MPZ, or anti-PMP22 antibodies in order to analyze their expression in these cells.  $\beta$ -actin was used to normalize the Western blots. (C) Primary Schwann cells were treated with LiCl (10 mM) for 24 hours. Proteins were extracted and Western blots were performed using either anti-MPZ, or anti-PMP22 antibodies in order to analyze their expression in these cells.  $\beta$ -actin was used to normalize the Western blots. (D) MSC80 cells were treated either with SB216763 (10  $\mu$ M) for 3, 6 or 24 hours. Proteins were extracted and Western blots were performed using either anti-MPZ, or anti-PMP22 antibodies in order to analyze their expression in these cells.  $\beta$ -actin was used to normalize the Western blots. Results were reproduced at least in three independent experiments. These figures are the representation of a typical experiment.

**Figure 4: Effect of LiCl and SB 216763 on Akt and canonical Wnt pathways in MSC-80 cells and in primary Schwann cells.**

(A) MSC80 cells were treated with LiCl (10 mM) during 24h, 48h and 72 hours. Western blots were performed using anti-AktP or anti-Akt total antibodies in order to analyze its expression in these cells.  $\beta$ -actin was used to normalize the Western blots. These results were reproduced in three independent experiments.

(B) MSC80 cells were treated with LiCl (10 mM) during 0, 24h, 48h and 72 hours. Western blots were performed using anti-beta-catenin antibody in order to analyze its expression in these cells.  $\beta$ -actin was used to normalize the Western blots.

(C) Primary Schwann Cells were treated with LiCl (10mM) for 24 hours. Western blots were performed using anti-beta-catenin antibody in order to analyze its expression in these cells.  $\beta$ -actin was used to normalize the Western blots.

(D) MSC80 cells were treated with SB216763 (10  $\mu$ M) for 3, 6 or 24 hours.

The Western blots were reproduced at least in three independent experiments. These figures are the representation of a typical experiment.

(E) MSC80 cells were transiently transfected with TOP-FLASH-Luc plasmid. Sixteen hours after transfection, cells were incubated with LiCl (10 mM) for 24h, and then beta-galactosidase and luciferase activities were analyzed. Results are expressed as the induction over the basal activity, they represent the mean +/- SEM of at least 11 independent assays performed in duplicate. \*\*\* $p < 0.001$  by Mann-Whitney's test when compared to control.

(F) MSC80 cells were incubated in the absence (control) or in the presence of LiCl (10 mM) during 24h, 48h and/or 72h and then monitored by confocal microscopy to localize beta-catenin (Alexa 488: green) or nuclei (Tropo3, red). This experiment was repeated three times, and a typical experiment is presented here. Upper panels : low magnification (x40), bar scale: 20  $\mu$ m. Lower panels : high magnification (x63), bar scale : 10 $\mu$ m.

**Figure 5: Effect of LiCl on MPZ and PMP22 promoters.**

(A) MSC80 cells were transiently transfected with MPZ-Luc or PMP22-Luc plasmids. Sixteen hours after transfection, cells were incubated with LiCl (10 mM) for 24h, and then luciferase and beta-galactosidase activities were analyzed. Results are expressed as the induction over the basal activity, they represent the mean +/- SEM of at least 11 independent assays performed in duplicate. \*\*\* $p < 0.001$  by Mann-Whitney's test when compared to control.

Recruitment of beta catenin on the levels of MPZ (B) and PMP22 (C) promoters. LEF/TCF binding sites were localized in MPZ and PMP22 promoters [220]. Cells were treated with LiCl (10 mM) for 1h and then subjected to ChIP analysis using control or anti-beta-catenin antibody. Quantitative real time PCR was performed to detect MPZ and PMP22 promoter regions including LEF/TCF binding elements.

\*\*\* $p < 0.001$  by Tukey's post hoc test after one-way ANOVA when compared to control.



## References

1. Niemann A, Berger P, & Suter U (2006) *Neuromolecular Med* **8**, 217-242.
2. Garbay B, Heape AM, Sargueil F, & Cassagne C (2000) *Prog Neurobiol* **61**, 267-304.
3. Slutsky SG, Kamaraju AK, Levy AM, Chebath J, & Revel M (2003) *J Biol Chem* **278**, 8960-8968.
4. Tawk M, Makoukji J, Belle M, Fonte C, Trousson A, Hawkins T, Li H, Ghandour S, Schumacher M, & Massaad C (2011) *J Neurosci* **31**, 3729-3742.
5. Phiel CJ & Klein PS (2001) *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **41**, 789-813.
6. Zhong J, Yang X, Yao W, & Lee W (2006) *Biochem Biophys Res Commun* **350**, 905-910.
7. Chuang DM (2005) *Ann N Y Acad Sci* **1053**, 195-204.
8. Wei H, Qin ZH, Senatorov VV, Wei W, Wang Y, Qian Y, & Chuang DM (2001) *Neuroscience* **106**, 603-612.
9. Noble W, Planel E, Zehr C, Olm V, Meyerson J, Suleman F, Gaynor K, Wang L, LaFrancois J, Feinstein B, *et al.* (2005) *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 6990-6995.
10. Youdim MB & Arraf Z (2004) *Neuropharmacology* **46**, 1130-1140.
11. De Sarno P, Axtell RC, Raman C, Roth KA, Alessi DR, & Jope RS (2008) *J Immunol* **181**, 338-345.
12. Wrabetz L, Feltri ML, Quattrini A, Imperiale D, Previtali S, D'Antonio M, Martini R, Yin X, Trapp BD, Zhou L, *et al.* (2000) *J Cell Biol* **148**, 1021-1034.
13. Makoukji J, Shackelford G, Meffre D, Grenier J, Liere P, Lobaccaro J, Schumacher M, & Massaad C (2011) *Journal of Neuroscience*, in press.
14. Hedgepeth CM, Conrad LJ, Zhang J, Huang HC, Lee VM, & Klein PS (1997) *Dev Biol* **185**, 82-91.
15. Bhat RV, Budd Haerberlein SL, & Avila J (2004) *J Neurochem* **89**, 1313-1317.
16. Takahashi-Yanaga F & Sasaguri T (2009) *J Pharmacol Sci* **109**, 179-183.
17. Gould TD, Chen G, & Manji HK (2004) *Neuropsychopharmacology* **29**, 32-38.
18. Pies R (2002) *Ann Clin Psychiatry* **14**, 223-232.
19. Zhong J & Lee WH (2007) *Expert Opin Drug Saf* **6**, 375-383.
20. Chuang DM (2004) *Crit Rev Neurobiol* **16**, 83-90.
21. Klein PS & Melton DA (1996) *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 8455-8459.
22. Mori S, Zanardi R, Popoli M, Smeraldi E, Racagni G, & Perez J (1996) *Life Sci* **59**, PL99-104.
23. Einat H, Yuan P, Szabo ST, Dogra S, & Manji HK (2007) *Neuropsychobiology* **55**, 123-131.
24. Su H, Chu TH, & Wu W (2007) *Exp Neurol* **206**, 296-307.
25. Adams JM & Cory S (1998) *Science* **281**, 1322-1326.
26. Sadoul R (1998) *Cell Death Differ* **5**, 805-815.
27. Basselin M, Villacreses NE, Lee HJ, Bell JM, & Rapoport SI (2007) *J Neurochem* **102**, 761-772.

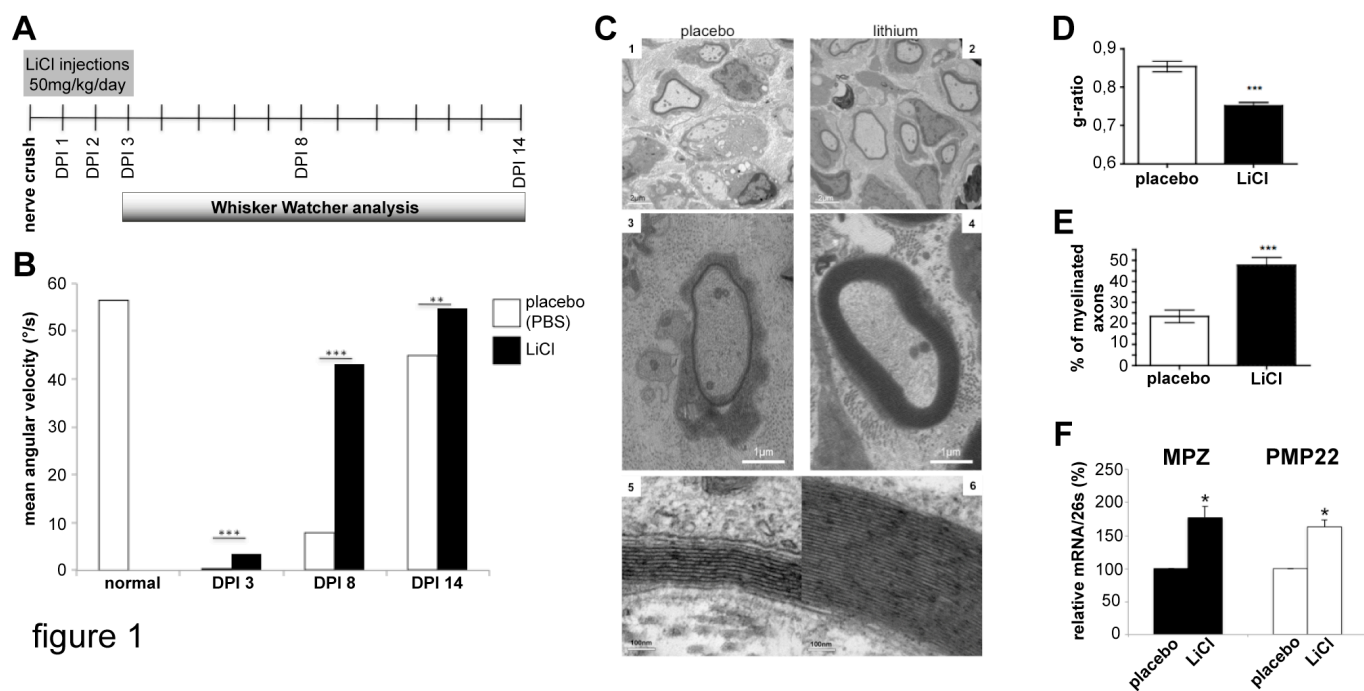


figure 1

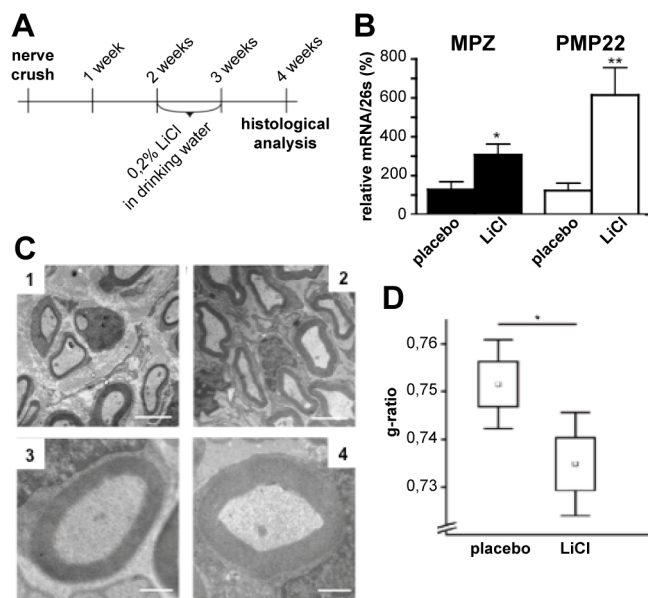


figure 2

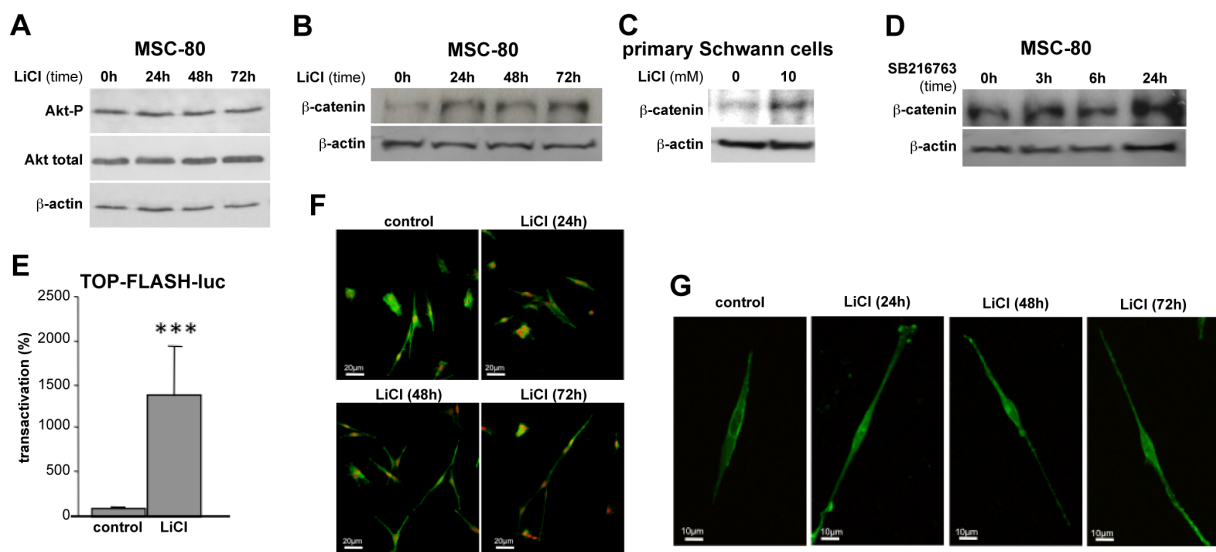
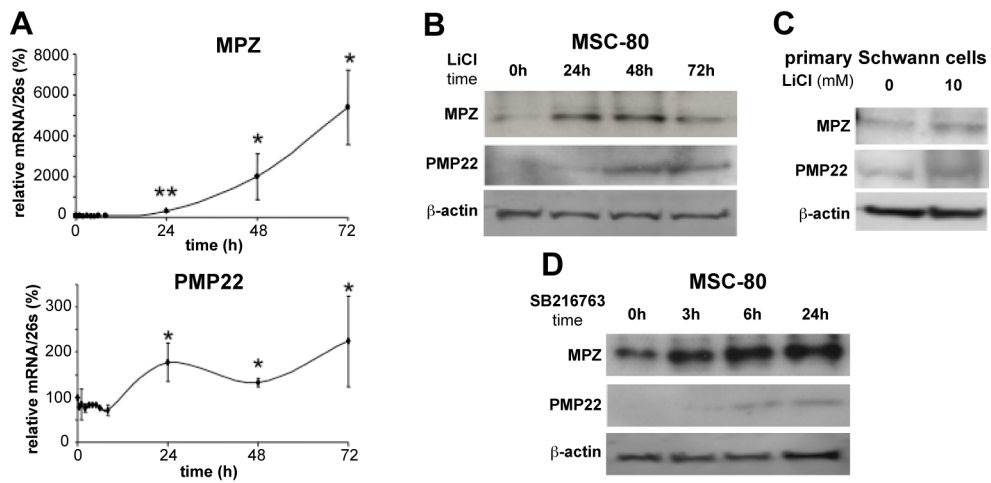


figure 4

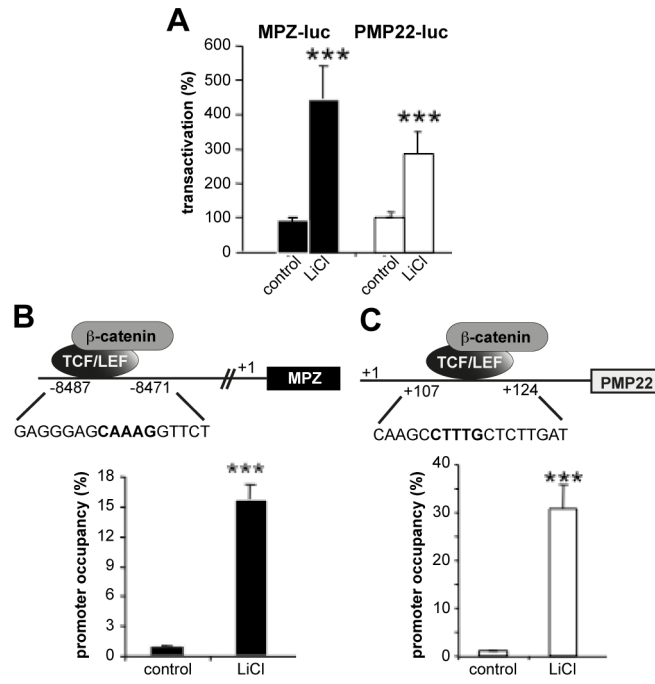


figure 5



# **DISCUSSION ET PERSPECTIVES**



La myélinisation est un processus complexe et finement régulé tout au long du développement. La progression des cellules dans le lignage schwannien est sous le contrôle de plusieurs voies de signalisation, dont l'équilibre entre les effets stimulateurs et répresseurs est essentiel. De plus, les interactions avec l'environnement et en particulier les cellules nerveuses et leurs prolongements axonaux sont déterminantes pour l'établissement et le maintien de la gaine de myéline. Enfin, le dérèglement de l'expression des gènes de la myéline conduit à des pathologies invalidantes comme la maladie de Charcot-Marie-Tooth de type 1. La surexpression de 20% du gène PMP22 est à l'origine de la destruction de la gaine de myéline périphérique.

Ainsi, notre travail s'est porté sur plusieurs questions. D'une part, il apparaît donc important d'identifier les voies de signalisation mises en jeu pour réguler l'expression des gènes de la myéline aussi bien dans un contexte physiologique que dans des situations pathologiques. D'autre part, notre travail s'est porté sur le cytosquelette des cellules de Schwann qui doivent subir d'importantes modifications du cytosquelette pour synthétiser la gaine de myéline.

## **1. La voie Wnt/ $\beta$ -caténine régule l'expression des gènes de la myéline**

Nous avons dans un premier temps, établi la présence des acteurs majeurs de la signalisation Wnt canonique au sein des cellules de Schwann. Ceci, des récepteurs membranaires (LRP6), au carrefour de signalisation (Dvl) jusqu'aux facteurs de transcription terminaux (TCF/LEF et  $\beta$ -caténine). Nous avons démontré que l'induction de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine entraînait l'augmentation du recrutement de la  $\beta$ -caténine aux niveaux des éléments de réponse aux TCF/LEF provoquant l'induction des gènes P0 et PMP22 dans les cellules de Schwann. Par la suite, nous avons évalué la variation d'expression des gènes de la myéline ainsi que des composants de la voie canonique au cours du développement du nerf sciatique de souris. Dans le modèle *in vivo* de poissons zèbres mutés pour LRP6 et TCF3 mis au point par le Dr. Tawk (INSERM, U788, Le Kremlin-Bicêtre) nous avons pu démontrer l'implication directe de la voie Wnt canonique d'une part dans la régulation de la myélinisation du SNP comme du SNC et d'autre part dans le processus de myélinisation.



Récemment, une étude a démontré que la voie Wnt serait dommageable pour la myélinisation car elle retarde la différenciation des oligodendrocytes [191]. Ce travail semble contredire nos observations, toutefois plusieurs points méritent d'être éclaircis :

Tout d'abord, nous avons travaillé avec des cellules de Schwann, cellules myélinisantes du SNP. A l'inverse, les auteurs de cette étude ont utilisé des oligodendrocytes cellules myélinisantes du SNC. Nous pourrions envisager que la voie Wnt ait des effets opposés dans le CNS et le PNS. Cependant, nous démontrons par plusieurs approches à la fois *in vitro* et *in vivo* que les gènes de la myéline centrale sont aussi activés par la voie Wnt.

De plus, les approches sont différentes, nous avons réalisé des invalidations après que les oligodendrocytes et les cellules de Schwann deviennent matures (48h après l'éclosion) alors que Ye *et al* invalident des composants de la voie Wnt dès le début du développement avant la multiplication, spécification et différenciation des oligodendrocytes [191]. Ainsi, la voie Wnt pourrait être un régulateur négatif de la différenciation des oligodendrocytes mais aussi par la suite un stimulateur des gènes de la myéline. Ceci n'est pas surprenant, car il est rare qu'une voie unique participe de la même façon à toutes les étapes du développement. En effet, les voies de signalisation ont des effets pléiotropiques comme la voie Notch qui régule différenciellement toutes les étapes du développement de la lignée schwannienne. Par exemple, au stade embryonnaire, la voie Notch accélère la différenciation des précurseurs des CS en CS, tout en contrôlant leur prolifération. Après la naissance, la voie Notch régule négativement la myélinisation [90]. Ainsi, si jamais la voie Wnt s'avèrerait favorable à la multiplication, spécification, différenciation puis expression des gènes de la myéline ceci aurait un effet très délétère car les axones seraient myélinisés avant la naissance ce qui empêcherait le remodelage des synapses et figerait les axones dès la naissance.

L'étude menée par Fancy *et al* soulève plusieurs points de discussion. Les auteurs ciblent plusieurs protéines différentes ( $\beta$ -caténine, Tcf4, APC...) [3]. Certes, ces protéines interviennent dans la voie Wnt mais sont aussi susceptibles d'agir dans d'autres voies (PDGFRa, PI3K/Akt...). D'ailleurs les auteurs eux-mêmes font cette remarque dans la discussion de leur article. Nous avons choisi d'invalider *in vivo* LRP6 (composant essentiel et particulier à la voie Wnt/ $\beta$ -caténine) ainsi que l'interaction  $\beta$ -

caténine/TCF3. De plus, les principaux composants de la voie Wnt (LRP6, Dsh,  $\beta$ -caténine et TCFs) sont invalidés *in vitro*. Nos résultats montrent donc, d'une manière inéquivoque, que la voie Wnt est essentielle pour l'initiation de l'expression basale des gènes de la myéline.

## **2. Les ligands Wnts modulent l'expression des gènes de la myéline dans la CS**

En parallèle de notre travail sur la régulation endogène de l'expression des gènes de la myéline par la voie Wnt/ $\beta$ -caténine, nous avons cherché à connaître les effets de l'ajout de ligands Wnts canoniques et non canoniques sur l'induction des gènes de la myéline. Nous avons pour cela employé une approche basée sur l'utilisation de milieux conditionnés enrichis en ligands Wnts (Wnt4, Wnt5a, Wnt5b, Wnt6 et Wnt7b). L'expression du gène P0 est augmentée par une partie des protéines Wnts testées, qu'elles soient ou non canoniques. Bien qu'elle ne soit pas significative, l'expression de PMP22 semble tendre vers une augmentation. Ces résultats constituent une première caractérisation des effets d'une partie des ligands de la famille Wnt non canoniques (Wnt4, 5a, 6 et 7b) sur la régulation de l'expression des gènes de la myéline.

Une des hypothèses de travail pour tenter d'expliquer la signalisation impliquée dans la voie Wnt non canonique pourrait être les facteurs de transcription NFAT. Ces derniers ont été récemment démontrés comme impliqués dans la régulation du gène de la myéline P0 dans les précurseurs de CS [49]. En particulier l'isoforme NFATc4 est activée suite à l'activation de la signalisation NRG1/calcineurine. Or, les facteurs de transcription NFAT constituent l'aboutissement de la voie Wnt calcique. Sous l'effet de ligands Wnts non canoniques, la concentration intracellulaire en calcium pourrait être augmentée et activant par l'intermédiaire de CAMKII les facteurs de transcription NFAT qui réguleraient l'expression d'un ou des gènes de la myéline. Nous venons à ce titre d'initier un travail portant sur le rôle de l'invalidation par siRNA des 4 NFAT sur l'expression des gènes de la myéline.

### **3. Les voies Wnts modifient le cytosquelette des CS**

#### **a. Effets des ligands Wnts**

Le processus de myélinisation nécessite à la fois une régulation fine de l'expression des gènes de la myéline mais également d'importantes modifications physiques afin de permettre le processus d'enroulement et de compaction autour du partenaire axonal. Au cours de la formation du manchon de myéline grâce à une importante activation de la machinerie transcriptionnelle et protéique, la gaine s'allonge en vue des multiples enroulements. Ce sont ces derniers que nous avons souhaité étudier, en utilisant l'approche de milieux conditionnés exprimant différentes protéines Wnts, et en mesurant l'extension des prolongements cellulaires. De nombreux Wnts utilisés (cinq sur huit), qu'ils soient canoniques (Wnt3a et 5b) ou non (Wnt4, 5a et 6) induisent un allongement significatif des extensions cytoplasmique, et ce dès 24h.

Dans le cas d'une signalisation canonique, on peut émettre l'hypothèse que l'inhibition de la GSK3 $\beta$  permet de diminuer le taux de MAP1B phosphorylée et ainsi de stabiliser les microtubules. La stabilisation des microtubules est nécessaire pour éviter les phénomènes de catastrophes au cours desquelles la dépolymérisation est rapide et provoque la rétractation des microtubules. Dans le cas d'une signalisation non canonique, l'activation de la kinase JNK permettrait la phosphorylation stabilisatrice de MAP2 et ainsi de stabiliser les microtubules. Afin de vérifier cette hypothèse, il nous apparaît maintenant nécessaire de confirmer par marquage immunologique l'état de phosphorylation de protéines telles MAP1B ou APC.

Par ailleurs, Wnt pourrait se fixer à un récepteur Ryk (récepteur transmembranaire à activité tyrosine kinase) et par l'intermédiaire de la signalisation RhoA/Rho kinase limiter la pousse des microtubules. En effet, il a été récemment montré que cette signalisation était impliquée dans l'inhibition de la pousse axonale après une lésion du SNC [236, 237].

Plus globalement, il apparaît essentiel d'étudier les signaux communs aux cellules nerveuses et aux CS. Dans le cadre de relations réciproques aussi importantes, les facteurs impliqués peuvent agir sur le devenir des différents types cellulaires présents. Par exemple, nous avons vu que la signalisation NRG1/ERB2/3 était essentielle pour la myélinisation des précurseurs des CS. Une étude récente relate que cette même

signalisation est impliquée dans les phénomènes de migration des CS [238]. A la lumière de ces découvertes, nous pourrions envisager la signalisation Wnt comme un régulateur multiple des fonctions des CS. Elle agirait selon les conditions comme un régulateur de l'expression des gènes de la myéline ou un modulateur de la stabilité du réseau de microtubules et d'actine.

### **b. Effets de Dishevelled sur le cytosquelette des CS**

La protéine Dvl constitue un véritable carrefour des signalisations Wnt. Nous avons cherché à connaître son impact sur le cytosquelette en réponse à l'induction des voies canoniques et non canoniques par différents ligands Wnts. Pour se faire, nous avons utilisé le système de dominant négatif de Dvl et mesuré les extensions cellulaires. L'utilisation du dnDvl conduit à une rétractation significative des prolongements cellulaires. Ce mécanisme pourrait passer par une plus grande disponibilité de la GSK3 $\beta$  pour phosphoryler les protéines associées au cytosquelette et ainsi entraîner les microtubules dans un cycle de déstabilisation. Les résultats observés suite à l'utilisation conjointe du dnDvl et des ligands Wnts sont dépendants de la catégorie de Wnt utilisée. Pour les cas des trois ligands Wnts strictement non canonique (Wnt4, 6 et 7b), la conservation de la longueur des prolongements pourrait s'expliquer par un équilibre strict entre les effets positifs des Wnts via JNK et négatif en bloquant Dvl. Le ligand strictement canonique Wnt5b pourrait fortement inhiber la GSK3 $\beta$  et ainsi stabiliser les microtubules. Le dnDvl agit sur la même voie de signalisation ce qui pourrait expliquer la rétractation observée. Bien que considéré comme appartenant à la signalisation non canonique, Wnt5a semble pouvoir activer ou inhiber la signalisation canonique selon le contexte des récepteurs présents à la surface des cellules [163]. L'augmentation de la longueur des extensions cellulaires pourrait s'expliquer par l'activation conjointe de la voie non canonique qui agirait sur JNK et de la voie canonique qui inhiberait la GSK3 $\beta$ . Les deux signalisations permettraient ainsi la stabilisation des microtubules. Il faudrait dans le cas précis de ce ligand Wnt5a vérifier la présence de son récepteur Frizzled 4 à la surface des CS pour s'assurer de la possibilité d'activer à la fois les signalisations canoniques et non canoniques.

Les travaux de l'équipe du Dr. Nothias impliquent la protéine MAP1B dans la régulation de la stabilité du réseau d'actine et de microtubules des CS comme des neurones [239]. Par ailleurs, MAP1B apparaît essentiel pour la migration des CS comme des neurones. Ces observations vont dans le sens d'un environnement moléculaire commun aux CS et aux neurones sous-jacents. Les inductions de voies de signalisation dont les voies Wnt font partie pourraient être à l'origine de réponses morphologiques similaires dans les deux types cellulaires. Ainsi, à la suite d'une lésion du SNP, la protéine MAP1B pourrait induire une plus grande migration des CS et des neurones ainsi que la stabilisation du réseau de microtubules. Cependant à ce jour, la voie de signalisation qui régule l'état de phosphorylation de MAP1B dans les CS n'est pas connue. Nous apportons avec ces travaux les premières hypothèses de l'implication de la voie Wnt canonique dans la régulation du cytosquelette des CS.

### **c. Effets du lithium sur le cytosquelette des cellules de Schwann**

Le LiCl modifie profondément l'architecture de la CS. En effet, il provoque un important allongement des prolongements au cours du temps qui s'accompagne de tensions fortes du réseau d'actine et de microtubule que nous avons pu observer à l'aide d'un microscope à force atomique. L'allongement des prolongements cellulaires pourrait constituer l'étape initiatrice du processus d'enroulements multiples de la gaine de myéline autour de l'axone sous-jacent.

De plus, nous avons cherché à évaluer les effets du LiCl tout en interrompant la signalisation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine en utilisant un dominant négatif de la protéine Dvl. Dans ce contexte, l'inhibiteur de la GSK3 $\beta$  impose son effet et permet la croissance importante des prolongements cellulaires. On peut supposer que cet effet passe par la signalisation canonique divergente. Cela pourrait avoir pour conséquences une diminution de la phosphorylation des protéines MAP1B, APC ou CRMP2 ce qui stabiliserait les microtubules.

#### 4. La voie Wnt/ $\beta$ -caténine est réactivée en cas de lésion cellulaire

A la suite de l'étude de la régulation physiologique de l'expression des gènes de la myéline, nous nous sommes posé la question de l'implication de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine à la suite d'un événement lésionnel. Celui-ci peut être un pincement de nerfs périphériques comme le nerf facial ou le nerf sciatique ou bien encore *in vitro*, la strie d'un tapis cellulaire confluent.

Dans un premier temps, notre regard s'est porté sur l'ensemble des cellules qu'elles soient proches de la strie ou non. Dans ce contexte, après 24h, l'expression de P0 est induite mais pas celle de PMP22. De plus, le chlorure de lithium a un effet inducteur important sur l'expression des deux gènes de la myéline que ce soit dans un contexte lésionnel ou non. Nous nous sommes par la suite focalisés sur une étroite bande de cellules qui étaient à proximité de la lésion. Ceci afin d'observer au plus près et sans effet de dilution du signal à travers la boîte de culture, la réponse cellulaire induite par la blessure. Dès 8h après la strie, l'expression de P0 est fortement induite sans toutefois que les transcrits de la voie Wnt ne soient modifiés.

Cette induction peut être le résultat de l'activation restreinte de la voie au cours de laquelle la  $\beta$ -caténine résiduelle dans la cellule serait recrutée préférentiellement sur le promoteur P0 pour induire une induction rapide. Elle peut aussi être le résultat de l'allumage d'une autre voie de signalisation que nous n'avons pas encore identifiée comme par exemple passant par les facteurs de transcriptions NFAT. Il a été montré récemment qu'ils régulaient l'expression de P0 dans les cellules de Schwann à la suite d'un influx de calcium. La lésion pourrait provoquer un rapide influx de calcium, activer la signalisation calmoduline et ainsi induire l'expression de P0. Pour valider cette hypothèse, il nous faudrait mesurer les flux de calcium immédiatement après la strie et vérifier la fixation de NFATc4 sur le promoteur de P0.

A 24h, la voie Wnt/  $\beta$ -caténine est clairement réactivée comme l'atteste l'augmentation de l'expression de Dvl3, de la  $\beta$ -caténine ou de l'un de ses gènes cibles, la cycline D1. De plus, la phosphorylation de la GSK3 $\beta$  est augmentée ce qui indique qu'elle tend à être inhibée par Dvl sous l'effet de l'activation de la voie Wnt canonique.

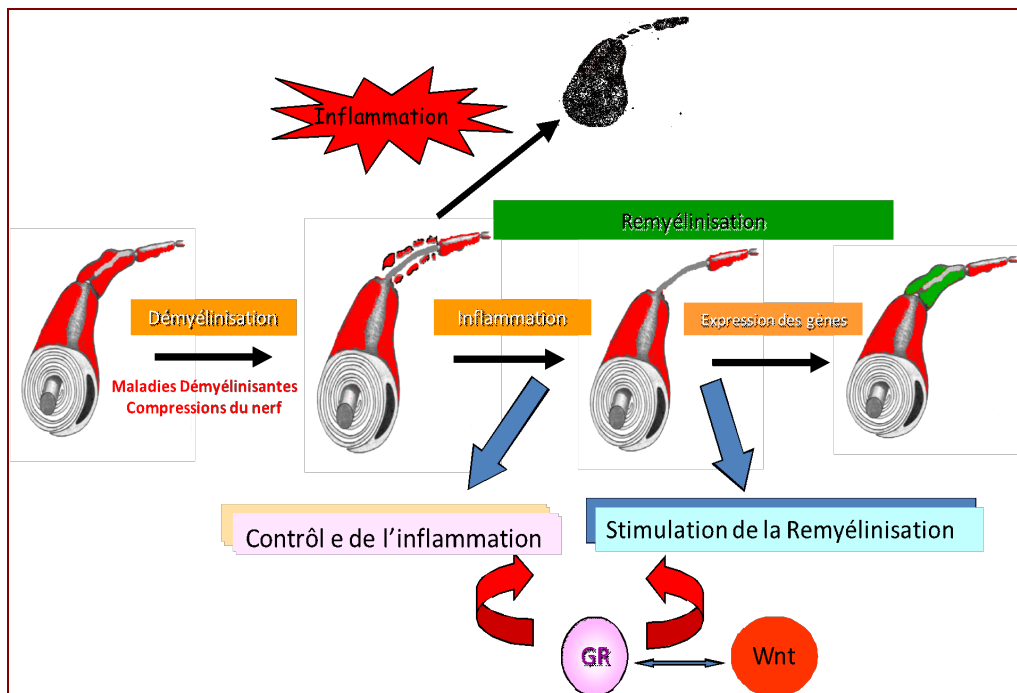
## 5. Effets remyélinisants du lithium après lésion des nerfs périphériques

Comme le lithium a activé les gènes de la myéline, nous avons mené une étude en collaboration avec l'équipe du Dr. De Waele sur les effets du LiCl sur la récupération fonctionnelle du battement des vibrisses de souris ayant subi le pincement de l'un de ses nerfs faciaux. L'injection de l'inhibiteur spécifique de la GSK3 $\beta$  provoque une accélération de la récupération fonctionnelle du battement. En seulement 8 jours, la souris traitée récupère presque intégralement ses mouvements de moustaches contre 14 jours pour la souris non traitée. Cette récupération fonctionnelle est assortie d'un épaissement de la gaine de myéline et d'une forte induction de l'expression des gènes P0 et PMP22. De même, au cours de l'étude du nerf sciatique de souris après pincement, l'administration de LiCl induit la réexpression des gènes de la myéline et augmente l'épaisseur de la gaine. Ces résultats sont confirmés *in vitro* où le LiCl induit là encore l'expression des transcrits et des protéines P0 et PMP22. Cette signalisation passe par la voie Wnt/ $\beta$ -caténine comme le confirment les expériences de transactivation et de co-immuno précipitation de la chromatine.

Le lithium mime l'activation de la voie Wnt canonique en inhibant la GSK3 $\beta$  provoquant ainsi l'induction des gènes de la myéline ainsi qu'une accélération de la récupération fonctionnelle du mouvement des moustaches après pincement du nerf facial chez la souris.

Lors de lésions du nerf (pincement ou section totale) la gaine de myéline est altérée. La première étape nécessaire en vue d'une remyélinisation correcte est une réaction inflammatoire pour nettoyer les débris cellulaires et les restes de gaines de myéline. Cependant, l'intensité et la durée de l'inflammation doivent être soigneusement régulées pour éviter un effet délétère sur la gaine de myéline. Dans un second temps, les gènes de la myéline sont réexprimés afin d'amorcer la remyélinisation. Le succès d'une thérapie passe donc à la fois par le contrôle de l'inflammation et la stimulation de la remyélinisation. Sur le plan thérapeutique, les glucocorticoïdes sont connus pour leur potentiel anti-inflammatoire, et donc proposés comme traitement pour de la paralysie faciale a frigore (paralysie de Bell). Ils agissent à plusieurs niveaux afin de diminuer l'inflammation, soit en bloquant la cascade des cytokines, en inhibant l'activation des cellules-T ou en diminuant l'extravasation des cellules immunitaires. L'activation simultanée de la voie Wnt/  $\beta$ -caténine et celle des glucocorticoïdes constitueraient des

paramètres de potentialisation supplémentaire dans le processus de remyélinisation en réactivant l'expression des gènes de la myéline (Figure 47).



**Figure 47 : Rôle de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine et des glucocorticoïdes dans la réparation des maladies démyélinisantes.**

Dans cette optique, nous avons débuté l'administration simultanée de chlorure de lithium et de dexaméthasone (un glucocorticoïde de synthèse) à des souris dont le nerf facial a été pincé. Ceci en vue de traiter à la fois la diminution de l'expression des gènes de la myéline par le LiCl et l'inflammation qui se produit par les effets anti-inflammatoires connus des glucocorticoïdes. Il serait à ce titre intéressant d'étudier le rôle des voies Wnts sur les cellules anti-inflammatoires. En effet, il a été récemment montré que la voie Wnt/ $\beta$ -caténine pouvait avoir des effets pro-inflammatoires dans la microglie [240].

En conclusion, notre travail permet de comprendre la régulation fine des gènes de la myéline par la voie Wnt/ $\beta$ -caténine. Il permet de développer de nouvelles thérapies basées sur l'administration des modulateurs de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine, comme le LiCl, dans le traitement des maladies liées au déficit de la myéline et dans les lésions du nerf.



Sur le plan développemental, la voie Wnt pourrait être un acteur tardif de la régulation du fonctionnement des CS intervenant au cours du processus de myélinisation. Enfin, les voies Wnts pourraient constituer un acteur majeur lors d'événements pathologiques, régulant la remyélinisation, l'architecture des cellules de Schwann et de leurs partenaires neuronaux et influençant la réaction inflammatoire.





# BIBLIOGRAPHIE

1. Salinas PC, Zou Y: **Wnt signaling in neural circuit assembly.** *Annu Rev Neurosci* 2008, **31**:339-358.
2. Toledo EM, Colombres M, Inestrosa NC: **Wnt signaling in neuroprotection and stem cell differentiation.** *Prog Neurobiol* 2008, **86**(3):281-296.
3. Fancy SP, Baranzini SE, Zhao C, Yuk DI, Irvine KA, Kaing S, Sanai N, Franklin RJ, Rowitch DH: **Dysregulation of the Wnt pathway inhibits timely myelination and remyelination in the mammalian CNS.** *Genes Dev* 2009, **23**(13):1571-1585.
4. Marieb E: **Anatomie et physiologie humaines.** Québec: Éditions du Renouveau Pédagogique 1993.
5. Nave KA: **Myelination and the trophic support of long axons.** *Nat Rev Neurosci* 2010, **11**(4):275-283.
6. Saher G, Brugger B, Lappe-Siefke C, Mobius W, Tozawa R, Wehr MC, Wieland F, Ishibashi S, Nave KA: **High cholesterol level is essential for myelin membrane growth.** *Nat Neurosci* 2005, **8**(4):468-475.
7. Hemmer B, Archelos JJ, Hartung HP: **New concepts in the immunopathogenesis of multiple sclerosis.** *Nat Rev Neurosci* 2002, **3**(4):291-301.
8. Stecca B, Southwood CM, Gragerov A, Kelley KA, Friedrich VL, Jr., Gow A: **The evolution of lipophilin genes from invertebrates to tetrapods: DM-20 cannot replace proteolipid protein in CNS myelin.** *J Neurosci* 2000, **20**(11):4002-4010.
9. Sporkel O, Uschkureit T, Bussow H, Stoffel W: **Oligodendrocytes expressing exclusively the DM20 isoform of the proteolipid protein gene: myelination and development.** *Glia* 2002, **37**(1):19-30.
10. Bizzozero OA, McGarry JF, Lees MB: **Autoacylation of myelin proteolipid protein with acyl coenzyme A.** *J Biol Chem* 1987, **262**(28):13550-13557.
11. Knapp PE: **Proteolipid protein: is it more than just a structural component of myelin?** *Dev Neurosci* 1996, **18**(4):297-308.
12. Yamada M, Ivanova A, Yamaguchi Y, Lees MB, Ikenaka K: **Proteolipid protein gene product can be secreted and exhibit biological activity during early development.** *J Neurosci* 1999, **19**(6):2143-2151.
13. Boison D, Bussow H, D'Urso D, Muller HW, Stoffel W: **Adhesive properties of proteolipid protein are responsible for the compaction of CNS myelin sheaths.** *J Neurosci* 1995, **15**(8):5502-5513.
14. Klugmann M, Schwab MH, Puhlhofer A, Schneider A, Zimmermann F, Griffiths IR, Nave KA: **Assembly of CNS myelin in the absence of proteolipid protein.** *Neuron* 1997, **18**(1):59-70.
15. Gudz TI, Schneider TE, Haas TA, Macklin WB: **Myelin proteolipid protein forms a complex with integrins and may participate in integrin receptor signaling in oligodendrocytes.** *J Neurosci* 2002, **22**(17):7398-7407.
16. Garbern JY: **Pelizaeus-Merzbacher disease: Genetic and cellular pathogenesis.** *Cell Mol Life Sci* 2007, **64**(1):50-65.

17. Readhead C, Takasashi N, Shine HD, Saavedra R, Sidman R, Hood L: **Role of myelin basic protein in the formation of central nervous system myelin.** *Ann N Y Acad Sci* 1990, **605**:280-285.
18. Carre JL, Goetz BD, O'Connor LT, Bremer Q, Duncan ID: **Mutations in the rat myelin basic protein gene are associated with specific alterations in other myelin gene expression.** *Neurosci Lett* 2002, **330**(1):17-20.
19. Martini R, Schachner M: **Molecular bases of myelin formation as revealed by investigations on mice deficient in glial cell surface molecules.** *Glia* 1997, **19**(4):298-310.
20. Hayasaka K, Himoro M, Wang Y, Takata M, Minoshima S, Shimizu N, Miura M, Uyemura K, Takada G: **Structure and chromosomal localization of the gene encoding the human myelin protein zero (MPZ).** *Genomics* 1993, **17**(3):755-758.
21. Uyemura K, Asou H, Takeda Y: **Structure and function of peripheral nerve myelin proteins.** *Prog Brain Res* 1995, **105**:311-318.
22. Lemke G, Axel R: **Isolation and sequence of a cDNA encoding the major structural protein of peripheral myelin.** *Cell* 1985, **40**(3):501-508.
23. Giese KP, Martini R, Lemke G, Soriano P, Schachner M: **Mouse P0 gene disruption leads to hypomyelination, abnormal expression of recognition molecules, and degeneration of myelin and axons.** *Cell* 1992, **71**(4):565-576.
24. Filbin MT, Walsh FS, Trapp BD, Pizzey JA, Tennekoon GI: **Role of myelin P0 protein as a homophilic adhesion molecule.** *Nature* 1990, **344**(6269):871-872.
25. Filbin MT, Zhang K, Li W, Gao Y: **Characterization of the effect on adhesion of different mutations in myelin P0 protein.** *Ann N Y Acad Sci* 1999, **883**:160-167.
26. Warner LE, Hilz MJ, Appel SH, Killian JM, Kolodry EH, Karpati G, Carpenter S, Watters GV, Wheeler C, Witt D *et al*: **Clinical phenotypes of different MPZ (P0) mutations may include Charcot-Marie-Tooth type 1B, Dejerine-Sottas, and congenital hypomyelination.** *Neuron* 1996, **17**(3):451-460.
27. Trapp BD, Quarles RH: **Presence of the myelin-associated glycoprotein correlates with alterations in the periodicity of peripheral myelin.** *J Cell Biol* 1982, **92**(3):877-882.
28. Xu W, Shy M, Kamholz J, Elferink L, Xu G, Lilien J, Balsamo J: **Mutations in the cytoplasmic domain of P0 reveal a role for PKC-mediated phosphorylation in adhesion and myelination.** *J Cell Biol* 2001, **155**(3):439-446.
29. Martini R, Mohajeri MH, Kasper S, Giese KP, Schachner M: **Mice doubly deficient in the genes for P0 and myelin basic protein show that both proteins contribute to the formation of the major dense line in peripheral nerve myelin.** *J Neurosci* 1995, **15**(6):4488-4495.
30. D'Urso D, Brophy PJ, Staugaitis SM, Gillespie CS, Frey AB, Stempak JG, Colman DR: **Protein zero of peripheral nerve myelin: biosynthesis, membrane insertion, and evidence for homotypic interaction.** *Neuron* 1990, **4**(3):449-460.
31. Kirschner DA, Ganser AL: **Compact myelin exists in the absence of basic protein in the shiverer mutant mouse.** *Nature* 1980, **283**(5743):207-210.

32. Berger P, Young P, Suter U: **Molecular cell biology of Charcot-Marie-Tooth disease.** *Neurogenetics* 2002, **4**(1):1-15.
33. Jetten AM, Suter U: **The peripheral myelin protein 22 and epithelial membrane protein family.** *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 2000, **64**:97-129.
34. Perea J, Robertson A, Tolmachova T, Muddle J, King RH, Ponsford S, Thomas PK, Huxley C: **Induced myelination and demyelination in a conditional mouse model of Charcot-Marie-Tooth disease type 1A.** *Hum Mol Genet* 2001, **10**(10):1007-1018.
35. Sereda M, Griffiths I, Puhlhofer A, Stewart H, Rossner MJ, Zimmerman F, Magyar JP, Schneider A, Hund E, Meinck HM *et al*: **A transgenic rat model of Charcot-Marie-Tooth disease.** *Neuron* 1996, **16**(5):1049-1060.
36. Adlkofer K, Martini R, Aguzzi A, Zielasek J, Toyka KV, Suter U: **Hypermyelination and demyelinating peripheral neuropathy in Pmp22-deficient mice.** *Nat Genet* 1995, **11**(3):274-280.
37. Jessen KR, Mirsky R: **The origin and development of glial cells in peripheral nerves.** *Nat Rev Neurosci* 2005, **6**(9):671-682.
38. Sherman DL, Brophy PJ: **Mechanisms of axon ensheathment and myelin growth.** *Nat Rev Neurosci* 2005, **6**(9):683-690.
39. Li J, Habbes HW, Eiberger J, Willecke K, Dermietzel R, Meier C: **Analysis of connexin expression during mouse Schwann cell development identifies connexin29 as a novel marker for the transition of neural crest to precursor cells.** *Glia* 2007, **55**(1):93-103.
40. Mirsky R, Woodhoo A, Parkinson DB, Arthur-Farraj P, Bhaskaran A, Jessen KR: **Novel signals controlling embryonic Schwann cell development, myelination and dedifferentiation.** *J Peripher Nerv Syst* 2008, **13**(2):122-135.
41. Bhatheja K, Field J: **Schwann cells: origins and role in axonal maintenance and regeneration.** *Int J Biochem Cell Biol* 2006, **38**(12):1995-1999.
42. Britsch S, Goerich DE, Riethmacher D, Peirano RI, Rossner M, Nave KA, Birchmeier C, Wegner M: **The transcription factor Sox10 is a key regulator of peripheral glial development.** *Genes Dev* 2001, **15**(1):66-78.
43. Paratore C, Goerich DE, Suter U, Wegner M, Sommer L: **Survival and glial fate acquisition of neural crest cells are regulated by an interplay between the transcription factor Sox10 and extrinsic combinatorial signaling.** *Development* 2001, **128**(20):3949-3961.
44. Leimeroth R, Lobsiger C, Lussi A, Taylor V, Suter U, Sommer L: **Membrane-bound neuregulin1 type III actively promotes Schwann cell differentiation of multipotent Progenitor cells.** *Dev Biol* 2002, **246**(2):245-258.
45. Riethmacher D, Sonnenberg-Riethmacher E, Brinkmann V, Yamaai T, Lewin GR, Birchmeier C: **Severe neuropathies in mice with targeted mutations in the ErbB3 receptor.** *Nature* 1997, **389**(6652):725-730.
46. Wolpowitz D, Mason TB, Dietrich P, Mendelsohn M, Talmage DA, Role LW: **Cysteine-rich domain isoforms of the neuregulin-1 gene are required for maintenance of peripheral synapses.** *Neuron* 2000, **25**(1):79-91.

47. La Marca R, Cerri F, Horiuchi K, Bachi A, Feltri ML, Wrabetz L, Blobel CP, Quattrini A, Salzer JL, Taveggia C: **TACE (ADAM17) inhibits Schwann cell myelination.** *Nat Neurosci* 2011, **14**(7):857-865.
48. Fricker FR, Lago N, Balarajah S, Tsantoulas C, Tanna S, Zhu N, Fageiry SK, Jenkins M, Garratt AN, Birchmeier C *et al*: **Axonally derived neuregulin-1 is required for remyelination and regeneration after nerve injury in adulthood.** *J Neurosci* 2011, **31**(9):3225-3233.
49. Kao SC, Wu H, Xie J, Chang CP, Ranish JA, Graef IA, Crabtree GR: **Calcineurin/NFAT signaling is required for neuregulin-regulated Schwann cell differentiation.** *Science* 2009, **323**(5914):651-654.
50. Wakamatsu Y, Maynard TM, Weston JA: **Fate determination of neural crest cells by NOTCH-mediated lateral inhibition and asymmetrical cell division during gangliogenesis.** *Development* 2000, **127**(13):2811-2821.
51. Shah NM, Groves AK, Anderson DJ: **Alternative neural crest cell fates are instructively promoted by TGFbeta superfamily members.** *Cell* 1996, **85**(3):331-343.
52. Brennan A, Dean CH, Zhang AL, Cass DT, Mirsky R, Jessen KR: **Endothelins control the timing of Schwann cell generation in vitro and in vivo.** *Dev Biol* 2000, **227**(2):545-557.
53. Jessen KR, Brennan A, Morgan L, Mirsky R, Kent A, Hashimoto Y, Gavrilovic J: **The Schwann cell precursor and its fate: a study of cell death and differentiation during gliogenesis in rat embryonic nerves.** *Neuron* 1994, **12**(3):509-527.
54. Dowsing BJ, Morrison WA, Nicola NA, Starkey GP, Bucci T, Kilpatrick TJ: **Leukemia inhibitory factor is an autocrine survival factor for Schwann cells.** *J Neurochem* 1999, **73**(1):96-104.
55. Meier C, Parmantier E, Brennan A, Mirsky R, Jessen KR: **Developing Schwann cells acquire the ability to survive without axons by establishing an autocrine circuit involving insulin-like growth factor, neurotrophin-3, and platelet-derived growth factor-BB.** *J Neurosci* 1999, **19**(10):3847-3859.
56. Grinspan JB, Marchionni MA, Reeves M, Coulaloglou M, Scherer SS: **Axonal interactions regulate Schwann cell apoptosis in developing peripheral nerve: neuregulin receptors and the role of neuregulins.** *J Neurosci* 1996, **16**(19):6107-6118.
57. Syroid DE, Maycox PJ, Soilu-Hanninen M, Petratos S, Bucci T, Burrola P, Murray S, Cheema S, Lee KF, Lemke G *et al*: **Induction of postnatal schwann cell death by the low-affinity neurotrophin receptor in vitro and after axotomy.** *J Neurosci* 2000, **20**(15):5741-5747.
58. Trachtenberg JT, Thompson WJ: **Schwann cell apoptosis at developing neuromuscular junctions is regulated by glial growth factor.** *Nature* 1996, **379**(6561):174-177.
59. Darbas A, Jaegle M, Walbeehm E, van den Burg H, Driegen S, Broos L, Uyl M, Visser P, Grosveld F, Meijer D: **Cell autonomy of the mouse claw paw mutation.** *Dev Biol* 2004, **272**(2):470-482.
60. Feltri ML, Graus Porta D, Previtali SC, Nodari A, Migliavacca B, Cassetti A, Littlewood-Evans A, Reichardt LF, Messing A, Quattrini A *et al*: **Conditional**

- disruption of beta 1 integrin in Schwann cells impedes interactions with axons.** *J Cell Biol* 2002, **156**(1):199-209.
61. Koszowski AG, Owens GC, Levinson SR: **The effect of the mouse mutation claw paw on myelination and nodal frequency in sciatic nerves.** *J Neurosci* 1998, **18**(15):5859-5868.
  62. Yu WM, Feltri ML, Wrabetz L, Strickland S, Chen ZL: **Schwann cell-specific ablation of laminin gamma1 causes apoptosis and prevents proliferation.** *J Neurosci* 2005, **25**(18):4463-4472.
  63. Parkinson DB, Dong Z, Bunting H, Whitfield J, Meier C, Marie H, Mirsky R, Jessen KR: **Transforming growth factor beta (TGFbeta) mediates Schwann cell death in vitro and in vivo: examination of c-Jun activation, interactions with survival signals, and the relationship of TGFbeta-mediated death to Schwann cell differentiation.** *J Neurosci* 2001, **21**(21):8572-8585.
  64. Taniuchi M, Clark HB, Johnson EM, Jr.: **Induction of nerve growth factor receptor in Schwann cells after axotomy.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986, **83**(11):4094-4098.
  65. Rabizadeh S, Oh J, Zhong LT, Yang J, Bitler CM, Butcher LL, Bredesen DE: **Induction of apoptosis by the low-affinity NGF receptor.** *Science* 1993, **261**(5119):345-348.
  66. Barrett GL, Bartlett PF: **The p75 nerve growth factor receptor mediates survival or death depending on the stage of sensory neuron development.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, **91**(14):6501-6505.
  67. Cheng HL, Steinway M, Delaney CL, Franke TF, Feldman EL: **IGF-I promotes Schwann cell motility and survival via activation of Akt.** *Mol Cell Endocrinol* 2000, **170**(1-2):211-215.
  68. Yamauchi J, Chan JR, Shooter EM: **Neurotrophins regulate Schwann cell migration by activating divergent signaling pathways dependent on Rho GTPases.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, **101**(23):8774-8779.
  69. Fragoso G, Robertson J, Athlan E, Tam E, Almazan G, Mushynski WE: **Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase interferes with cell shape changes and gene expression associated with Schwann cell myelination.** *Exp Neurol* 2003, **183**(1):34-46.
  70. Salzer JL, Bunge RP: **Studies of Schwann cell proliferation. I. An analysis in tissue culture of proliferation during development, Wallerian degeneration, and direct injury.** *J Cell Biol* 1980, **84**(3):739-752.
  71. Morrissey TK, Levi AD, Nuijens A, Sliwkowski MX, Bunge RP: **Axon-induced mitogenesis of human Schwann cells involves heregulin and p185erbB2.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995, **92**(5):1431-1435.
  72. Fields RD, Stevens B: **ATP: an extracellular signaling molecule between neurons and glia.** *Trends Neurosci* 2000, **23**(12):625-633.
  73. Topilko P, Schneider-Maunoury S, Levi G, Baron-Van Evercooren A, Chennoufi AB, Seitanidou T, Babinet C, Charnay P: **Krox-20 controls myelination in the peripheral nervous system.** *Nature* 1994, **371**(6500):796-799.
  74. Decker L, Desmarquet-Trin-Dinh C, Taillebourg E, Ghislain J, Vallat JM, Charnay P: **Peripheral myelin maintenance is a dynamic process requiring constant Krox20 expression.** *J Neurosci* 2006, **26**(38):9771-9779.



75. Parkinson DB, Bhaskaran A, Droggiti A, Dickinson S, D'Antonio M, Mirsky R, Jessen KR: **Krox-20 inhibits Jun-NH2-terminal kinase/c-Jun to control Schwann cell proliferation and death.** *J Cell Biol* 2004, **164**(3):385-394.
76. Michailov GV, Sereda MW, Brinkmann BG, Fischer TM, Haug B, Birchmeier C, Role L, Lai C, Schwab MH, Nave KA: **Axonal neuregulin-1 regulates myelin sheath thickness.** *Science* 2004, **304**(5671):700-703.
77. Jaegle M, Ghazvini M, Mandemakers W, Piirsoo M, Driegen S, Levavasseur F, Raghoenath S, Grosveld F, Meijer D: **The POU proteins Brn-2 and Oct-6 share important functions in Schwann cell development.** *Genes Dev* 2003, **17**(11):1380-1391.
78. Mirsky R, Parkinson DB, Dong Z, Meier C, Calle E, Brennan A, Topilko P, Harris BS, Stewart HJ, Jessen KR: **Regulation of genes involved in Schwann cell development and differentiation.** *Prog Brain Res* 2001, **132**:3-11.
79. Atanasoski S, Notterpek L, Lee HY, Castagner F, Young P, Ehrenguber MU, Meijer D, Sommer L, Stavnezer E, Colmenares C *et al*: **The protooncogene Ski controls Schwann cell proliferation and myelination.** *Neuron* 2004, **43**(4):499-511.
80. Maurel P, Salzer JL: **Axonal regulation of Schwann cell proliferation and survival and the initial events of myelination requires PI 3-kinase activity.** *J Neurosci* 2000, **20**(12):4635-4645.
81. Jessen KR, Mirsky R: **Negative regulation of myelination: relevance for development, injury, and demyelinating disease.** *Glia* 2008, **56**(14):1552-1565.
82. Fu SY, Gordon T: **The cellular and molecular basis of peripheral nerve regeneration.** *Mol Neurobiol* 1997, **14**(1-2):67-116.
83. Fernandez-Valle C, Gorman D, Gomez AM, Bunge MB: **Actin plays a role in both changes in cell shape and gene-expression associated with Schwann cell myelination.** *J Neurosci* 1997, **17**(1):241-250.
84. Jung J, Cai W, Lee HK, Pellegatta M, Shin YK, Jang SY, Suh DJ, Wrabetz L, Feltri ML, Park HT: **Actin polymerization is essential for myelin sheath fragmentation during Wallerian degeneration.** *J Neurosci* 2011, **31**(6):2009-2015.
85. Tortora G: **Principes d'anatomie et de physiologie.** Québec: De Boeck Université; 1994.
86. Hoke A, Ho T, Crawford TO, LeBel C, Hilt D, Griffin JW: **Glial cell line-derived neurotrophic factor alters axon schwann cell units and promotes myelination in unmyelinated nerve fibers.** *J Neurosci* 2003, **23**(2):561-567.
87. Koenig HL, Schumacher M, Ferzaz B, Thi AN, Ressouches A, Guennoun R, Jung-Testas I, Robel P, Akwa Y, Baulieu EE: **Progesterone synthesis and myelin formation by Schwann cells.** *Science* 1995, **268**(5216):1500-1503.
88. Stewart HJ, Bradke F, Taberner A, Morrell D, Jessen KR, Mirsky R: **Regulation of rat Schwann cell Po expression and DNA synthesis by insulin-like growth factors in vitro.** *Eur J Neurosci* 1996, **8**(3):553-564.
89. Parkinson DB, Bhaskaran A, Arthur-Farraj P, Noon LA, Woodhoo A, Lloyd AC, Feltri ML, Wrabetz L, Behrens A, Mirsky R *et al*: **c-Jun is a negative regulator of myelination.** *J Cell Biol* 2008, **181**(4):625-637.

90. Woodhoo A, Alonso MB, Droggiti A, Turmaine M, D'Antonio M, Parkinson DB, Wilton DK, Al-Shawi R, Simons P, Shen J *et al*: **Notch controls embryonic Schwann cell differentiation, postnatal myelination and adult plasticity.** *Nat Neurosci* 2009, **12**(7):839-847.
91. Chan JR, Cosgaya JM, Wu YJ, Shooter EM: **Neurotrophins are key mediators of the myelination program in the peripheral nervous system.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, **98**(25):14661-14668.
92. Einheber S, Hannocks MJ, Metz CN, Rifkin DB, Salzer JL: **Transforming growth factor-beta 1 regulates axon/Schwann cell interactions.** *J Cell Biol* 1995, **129**(2):443-458.
93. Aldskogius H: **Repairing CNS myelin--astrocytes have to do their jobs.** *Exp Neurol* 2005, **192**(1):7-10.
94. Talbott JF, Loy DN, Liu Y, Qiu MS, Bunge MB, Rao MS, Whittemore SR: **Endogenous Nkx2.2+/Olig2+ oligodendrocyte precursor cells fail to remyelinate the demyelinated adult rat spinal cord in the absence of astrocytes.** *Exp Neurol* 2005, **192**(1):11-24.
95. Sandvig A, Berry M, Barrett LB, Butt A, Logan A: **Myelin-, reactive glia-, and scar-derived CNS axon growth inhibitors: expression, receptor signaling, and correlation with axon regeneration.** *Glia* 2004, **46**(3):225-251.
96. Liberto CM, Albrecht PJ, Herx LM, Yong VW, Levison SW: **Pro-regenerative properties of cytokine-activated astrocytes.** *J Neurochem* 2004, **89**(5):1092-1100.
97. Reilly MM, Murphy SM, Laura M: **Charcot-Marie-Tooth disease.** *J Peripher Nerv Syst* 2011, **16**(1):1-14.
98. Lupski JR, de Oca-Luna RM, Slaugenhaupt S, Pentao L, Guzzetta V, Trask BJ, Saucedo-Cardenas O, Barker DF, Killian JM, Garcia CA *et al*: **DNA duplication associated with Charcot-Marie-Tooth disease type 1A.** *Cell* 1991, **66**(2):219-232.
99. Gabreels-Festen AA, Bolhuis PA, Hoogendijk JE, Valentijn LJ, Eshuis EJ, Gabreels FJ: **Charcot-Marie-Tooth disease type 1A: morphological phenotype of the 17p duplication versus PMP22 point mutations.** *Acta Neuropathol* 1995, **90**(6):645-649.
100. Grandis M, Leandri M, Vigo T, Cilli M, Sereda MW, Gherardi G, Benedetti L, Mancardi G, Abbruzzese M, Nave KA *et al*: **Early abnormalities in sciatic nerve function and structure in a rat model of Charcot-Marie-Tooth type 1A disease.** *Exp Neurol* 2004, **190**(1):213-223.
101. Pareyson D, Marchesi C: **Diagnosis, natural history, and management of Charcot-Marie-Tooth disease.** *Lancet Neurol* 2009, **8**(7):654-667.
102. Meyer zu Horste G, Prukop T, Liebetanz D, Mobius W, Nave KA, Sereda MW: **Antiprogestone therapy uncouples axonal loss from demyelination in a transgenic rat model of CMT1A neuropathy.** *Ann Neurol* 2007, **61**(1):61-72.
103. Passage E, Norreel JC, Noack-Fraissignes P, Sanguedolce V, Pizant J, Thirion X, Robaglia-Schlupp A, Pellissier JF, Fontes M: **Ascorbic acid treatment corrects the phenotype of a mouse model of Charcot-Marie-Tooth disease.** *Nat Med* 2004, **10**(4):396-401.

104. Micallef J, Attarian S, Dubourg O, Gonnaud PM, Hogrel JY, Stojkovic T, Bernard R, Jouve E, Pitel S, Vacherot F *et al*: **Effect of ascorbic acid in patients with Charcot-Marie-Tooth disease type 1A: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled trial.** *Lancet Neurol* 2009, **8**(12):1103-1110.
105. Burns J, Ouvrier RA, Yiu EM, Joseph PD, Kornberg AJ, Fahey MC, Ryan MM: **Ascorbic acid for Charcot-Marie-Tooth disease type 1A in children: a randomised, double-blind, placebo-controlled, safety and efficacy trial.** *Lancet Neurol* 2009, **8**(6):537-544.
106. Verhamme C, van Schaik IN, Koelman JH, de Haan RJ, de Visser M: **The natural history of Charcot-Marie-Tooth type 1A in adults: a 5-year follow-up study.** *Brain* 2009, **132**(Pt 12):3252-3262.
107. Nakagawa M: **[Hereditary neuropathy: recent advance].** *Rinsho Shinkeigaku* 2008, **48**(11):1019-1022.
108. Sahenk Z, Nagaraja HN, McCracken BS, King WM, Freimer ML, Cedarbaum JM, Mendell JR: **NT-3 promotes nerve regeneration and sensory improvement in CMT1A mouse models and in patients.** *Neurology* 2005, **65**(5):681-689.
109. Sahenk Z, Galloway G, Edwards C, Malik V, Kaspar BK, Eagle A, Yetter B, Forgie A, Tsao D, Lin JC: **TrkB and TrkC agonist antibodies improve function, electrophysiologic and pathologic features in Trembler J mice.** *Exp Neurol* 2010, **224**(2):495-506.
110. Chance PF: **Inherited focal, episodic neuropathies: hereditary neuropathy with liability to pressure palsies and hereditary neuralgic amyotrophy.** *Neuromolecular Med* 2006, **8**(1-2):159-174.
111. Chance PF, Alderson MK, Leppig KA, Lensch MW, Matsunami N, Smith B, Swanson PD, Odelberg SJ, Distèche CM, Bird TD: **DNA deletion associated with hereditary neuropathy with liability to pressure palsies.** *Cell* 1993, **72**(1):143-151.
112. Tyson J, Malcolm S, Thomas PK, Harding AE: **Deletions of chromosome 17p11.2 in multifocal neuropathies.** *Ann Neurol* 1996, **39**(2):180-186.
113. Madrid RE, Jaros E, Cullen MJ, Bradley WG: **Genetically determined defect of Schwann cell basement membrane in dystrophic mouse.** *Nature* 1975, **257**(5524):319-321.
114. Etienne-Manneville S: **Actin and microtubules in cell motility: which one is in control?** *Traffic* 2004, **5**(7):470-477.
115. Khaitlina SY: **Functional specificity of actin isoforms.** *Int Rev Cytol* 2001, **202**:35-98.
116. Steinmetz MO, Stoffler D, Hoenger A, Bremer A, Aebi U: **Actin: from cell biology to atomic detail.** *J Struct Biol* 1997, **119**(3):295-320.
117. Revenu C, Athman R, Robine S, Louvard D: **The co-workers of actin filaments: from cell structures to signals.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004, **5**(8):635-646.
118. Wegner A: **Head to tail polymerization of actin.** *J Mol Biol* 1976, **108**(1):139-150.
119. Wadsworth P: **Regional regulation of microtubule dynamics in polarized, motile cells.** *Cell Motil Cytoskeleton* 1999, **42**(1):48-59.

120. Waterman-Storer CM, Salmon E: **Positive feedback interactions between microtubule and actin dynamics during cell motility.** *Curr Opin Cell Biol* 1999, **11**(1):61-67.
121. Job D, Valiron O, Oakley B: **Microtubule nucleation.** *Curr Opin Cell Biol* 2003, **15**(1):111-117.
122. Akhmanova A, Steinmetz MO: **Tracking the ends: a dynamic protein network controls the fate of microtubule tips.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008, **9**(4):309-322.
123. Holy TE, Leibler S: **Dynamic instability of microtubules as an efficient way to search in space.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, **91**(12):5682-5685.
124. Desai A, Mitchison TJ: **Microtubule polymerization dynamics.** *Annu Rev Cell Dev Biol* 1997, **13**:83-117.
125. Akhmanova A, Hoogenraad CC: **Microtubule plus-end-tracking proteins: mechanisms and functions.** *Curr Opin Cell Biol* 2005, **17**(1):47-54.
126. Gundersen GG: **Evolutionary conservation of microtubule-capture mechanisms.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002, **3**(4):296-304.
127. Komarova YA, Vorobjev IA, Borisy GG: **Life cycle of MTs: persistent growth in the cell interior, asymmetric transition frequencies and effects of the cell boundary.** *J Cell Sci* 2002, **115**(Pt 17):3527-3539.
128. Cook TA, Nagasaki T, Gundersen GG: **Rho guanosine triphosphatase mediates the selective stabilization of microtubules induced by lysophosphatidic acid.** *J Cell Biol* 1998, **141**(1):175-185.
129. Palazzo AF, Cook TA, Alberts AS, Gundersen GG: **mDia mediates Rho-regulated formation and orientation of stable microtubules.** *Nat Cell Biol* 2001, **3**(8):723-729.
130. Palazzo AF, Eng CH, Schlaepfer DD, Marcantonio EE, Gundersen GG: **Localized stabilization of microtubules by integrin- and FAK-facilitated Rho signaling.** *Science* 2004, **303**(5659):836-839.
131. Bulinski JC, Gundersen GG: **Stabilization of post-translational modification of microtubules during cellular morphogenesis.** *Bioessays* 1991, **13**(6):285-293.
132. Gundersen GG, Cook TA: **Microtubules and signal transduction.** *Curr Opin Cell Biol* 1999, **11**(1):81-94.
133. Westermann S, Weber K: **Post-translational modifications regulate microtubule function.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003, **4**(12):938-947.
134. Bornens M: **Centrosome composition and microtubule anchoring mechanisms.** *Curr Opin Cell Biol* 2002, **14**(1):25-34.
135. Omelchenko T, Vasiliev JM, Gelfand IM, Feder HH, Bonder EM: **Mechanisms of polarization of the shape of fibroblasts and epitheliocytes: Separation of the roles of microtubules and Rho-dependent actin-myosin contractility.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, **99**(16):10452-10457.
136. Hirokawa N: **Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport.** *Science* 1998, **279**(5350):519-526.
137. Mallik R, Gross SP: **Molecular motors: strategies to get along.** *Curr Biol* 2004, **14**(22):R971-982.
138. Goldstein LS, Yang Z: **Microtubule-based transport systems in neurons: the roles of kinesins and dyneins.** *Annu Rev Neurosci* 2000, **23**:39-71.

139. Court FA, Sherman DL, Pratt T, Garry EM, Ribchester RR, Cottrell DF, Fleetwood-Walker SM, Brophy PJ: **Restricted growth of Schwann cells lacking Cajal bands slows conduction in myelinated nerves.** *Nature* 2004, **431**(7005):191-195.
140. Hirokawa N, Sato-Yoshitake R, Kobayashi N, Pfister KK, Bloom GS, Brady ST: **Kinesin associates with anterogradely transported membranous organelles in vivo.** *J Cell Biol* 1991, **114**(2):295-302.
141. Hirokawa N, Sato-Yoshitake R, Yoshida T, Kawashima T: **Brain dynein (MAP1C) localizes on both anterogradely and retrogradely transported membranous organelles in vivo.** *J Cell Biol* 1990, **111**(3):1027-1037.
142. Hafezparast M, Klocke R, Ruhrberg C, Marquardt A, Ahmad-Annuar A, Bowen S, Lalli G, Witherden AS, Hummerich H, Nicholson S *et al*: **Mutations in dynein link motor neuron degeneration to defects in retrograde transport.** *Science* 2003, **300**(5620):808-812.
143. Zhao C, Takita J, Tanaka Y, Setou M, Nakagawa T, Takeda S, Yang HW, Terada S, Nakata T, Takei Y *et al*: **Charcot-Marie-Tooth disease type 2A caused by mutation in a microtubule motor KIF1Bbeta.** *Cell* 2001, **105**(5):587-597.
144. Rodriguez OC, Schaefer AW, Mandato CA, Forscher P, Bement WM, Waterman-Storer CM: **Conserved microtubule-actin interactions in cell movement and morphogenesis.** *Nat Cell Biol* 2003, **5**(7):599-609.
145. Dikovskaya D, Zumbunn J, Penman GA, Nathke IS: **The adenomatous polyposis coli protein: in the limelight out at the edge.** *Trends Cell Biol* 2001, **11**(9):378-384.
146. Munemitsu S, Souza B, Muller O, Albert I, Rubinfeld B, Polakis P: **The APC gene product associates with microtubules in vivo and promotes their assembly in vitro.** *Cancer Res* 1994, **54**(14):3676-3681.
147. Mimori-Kiyosue Y, Shiina N, Tsukita S: **Adenomatous polyposis coli (APC) protein moves along microtubules and concentrates at their growing ends in epithelial cells.** *J Cell Biol* 2000, **148**(3):505-518.
148. Mimori-Kiyosue Y, Shiina N, Tsukita S: **The dynamic behavior of the APC-binding protein EB1 on the distal ends of microtubules.** *Curr Biol* 2000, **10**(14):865-868.
149. Mogensen MM, Tucker JB, Mackie JB, Prescott AR, Nathke IS: **The adenomatous polyposis coli protein unambiguously localizes to microtubule plus ends and is involved in establishing parallel arrays of microtubule bundles in highly polarized epithelial cells.** *J Cell Biol* 2002, **157**(6):1041-1048.
150. Nakamura M, Zhou XZ, Lu KP: **Critical role for the EB1 and APC interaction in the regulation of microtubule polymerization.** *Curr Biol* 2001, **11**(13):1062-1067.
151. Zumbunn J, Kinoshita K, Hyman AA, Nathke IS: **Binding of the adenomatous polyposis coli protein to microtubules increases microtubule stability and is regulated by GSK3 beta phosphorylation.** *Curr Biol* 2001, **11**(1):44-49.
152. Brakeman JS, Gu SH, Wang XB, Dolin G, Baraban JM: **Neuronal localization of the Adenomatous polyposis coli tumor suppressor protein.** *Neuroscience* 1999, **91**(2):661-672.

153. Morrison EE, Askham JM, Clissold P, Markham AF, Meredith DM: **The cellular distribution of the adenomatous polyposis coli tumour suppressor protein in neuroblastoma cells is regulated by microtubule dynamics.** *Neuroscience* 1997, **81**(2):553-563.
154. Morrison EE, Askham J, Clissold P, Markham AF, Meredith DM: **Expression of beta-catenin and the adenomatous polyposis coli tumour suppressor protein in mouse neocortical cells in vitro.** *Neurosci Lett* 1997, **235**(3):129-132.
155. Erturk A, Hellal F, Enes J, Bradke F: **Disorganized microtubules underlie the formation of retraction bulbs and the failure of axonal regeneration.** *J Neurosci* 2007, **27**(34):9169-9180.
156. Speese SD, Budnik V: **Wnts: up-and-coming at the synapse.** *Trends Neurosci* 2007, **30**(6):268-275.
157. Korkut C, Budnik V: **WNTs tune up the neuromuscular junction.** *Nat Rev Neurosci* 2009, **10**(9):627-634.
158. Lyu J, Yamamoto V, Lu W: **Cleavage of the Wnt receptor Ryk regulates neuronal differentiation during cortical neurogenesis.** *Dev Cell* 2008, **15**(5):773-780.
159. Torres MA, Yang-Snyder JA, Purcell SM, DeMarais AA, McGrew LL, Moon RT: **Activities of the Wnt-1 class of secreted signaling factors are antagonized by the Wnt-5A class and by a dominant negative cadherin in early Xenopus development.** *J Cell Biol* 1996, **133**(5):1123-1137.
160. Ishitani T, Kishida S, Hyodo-Miura J, Ueno N, Yasuda J, Waterman M, Shibuya H, Moon RT, Ninomiya-Tsuji J, Matsumoto K: **The TAK1-NLK mitogen-activated protein kinase cascade functions in the Wnt-5a/Ca(2+) pathway to antagonize Wnt/beta-catenin signaling.** *Mol Cell Biol* 2003, **23**(1):131-139.
161. Huang T, Xie Z, Wang J, Li M, Jing N, Li L: **NFAT proteins repress canonical Wnt signaling via its interaction with Dvl and participate in regulating neural progenitor cell proliferation and differentiation.** *J Biol Chem* 2011.
162. Topol L, Jiang X, Choi H, Garrett-Beal L, Carolan PJ, Yang Y: **Wnt-5a inhibits the canonical Wnt pathway by promoting GSK-3-independent beta-catenin degradation.** *J Cell Biol* 2003, **162**(5):899-908.
163. Mikels AJ, Nusse R: **Purified Wnt5a protein activates or inhibits beta-catenin-TCF signaling depending on receptor context.** *PLoS Biol* 2006, **4**(4):e115.
164. Henriquez JP, Webb A, Bence M, Bildsoe H, Sahores M, Hughes SM, Salinas PC: **Wnt signaling promotes AChR aggregation at the neuromuscular synapse in collaboration with agrin.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, **105**(48):18812-18817.
165. Wang J, Ruan NJ, Qian L, Lei WL, Chen F, Luo ZG: **Wnt/beta-catenin signaling suppresses Rapsyn expression and inhibits acetylcholine receptor clustering at the neuromuscular junction.** *J Biol Chem* 2008, **283**(31):21668-21675.
166. Castelo-Branco G, Sousa KM, Bryja V, Pinto L, Wagner J, Arenas E: **Ventral midbrain glia express region-specific transcription factors and regulate**

- dopaminergic neurogenesis through Wnt-5a secretion.** *Mol Cell Neurosci* 2006, **31**(2):251-262.
167. Krylova O, Messenger MJ, Salinas PC: **Dishevelled-1 regulates microtubule stability: a new function mediated by glycogen synthase kinase-3beta.** *J Cell Biol* 2000, **151**(1):83-94.
168. Hur EM, Zhou FQ: **GSK3 signalling in neural development.** *Nat Rev Neurosci* 2010, **11**(8):539-551.
169. Lucas FR, Goold RG, Gordon-Weeks PR, Salinas PC: **Inhibition of GSK-3beta leading to the loss of phosphorylated MAP-1B is an early event in axonal remodelling induced by WNT-7a or lithium.** *J Cell Sci* 1998, **111** (Pt 10):1351-1361.
170. Conde C, Caceres A: **Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites.** *Nat Rev Neurosci* 2009, **10**(5):319-332.
171. Walston TD, Hardin J: **Wnt-dependent spindle polarization in the early *C. elegans* embryo.** *Semin Cell Dev Biol* 2006, **17**(2):204-213.
172. Lu B, Roegiers F, Jan LY, Jan YN: **Adherens junctions inhibit asymmetric division in the *Drosophila* epithelium.** *Nature* 2001, **409**(6819):522-525.
173. McCartney BM, McEwen DG, Grevengoed E, Maddox P, Bejsovec A, Peifer M: ***Drosophila* APC2 and Armadillo participate in tethering mitotic spindles to cortical actin.** *Nat Cell Biol* 2001, **3**(10):933-938.
174. Nobes CD, Hall A: **Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement.** *J Cell Biol* 1999, **144**(6):1235-1244.
175. Etienne-Manneville S, Hall A: **Cdc42 regulates GSK-3beta and adenomatous polyposis coli to control cell polarity.** *Nature* 2003, **421**(6924):753-756.
176. Schlessinger K, McManus EJ, Hall A: **Cdc42 and noncanonical Wnt signal transduction pathways cooperate to promote cell polarity.** *J Cell Biol* 2007, **178**(3):355-361.
177. Chang L, Jones Y, Ellisman MH, Goldstein LS, Karin M: **JNK1 is required for maintenance of neuronal microtubules and controls phosphorylation of microtubule-associated proteins.** *Dev Cell* 2003, **4**(4):521-533.
178. Cadigan KM, Nusse R: **Wnt signaling: a common theme in animal development.** *Genes Dev* 1997, **11**(24):3286-3305.
179. Packard M, Koo ES, Gorczyca M, Sharpe J, Cumberledge S, Budnik V: **The *Drosophila* Wnt, wingless, provides an essential signal for pre- and postsynaptic differentiation.** *Cell* 2002, **111**(3):319-330.
180. Logan CY, Nusse R: **The Wnt signaling pathway in development and disease.** *Annu Rev Cell Dev Biol* 2004, **20**:781-810.
181. Coyle-Rink J, Del Valle L, Sweet T, Khalili K, Amini S: **Developmental expression of Wnt signaling factors in mouse brain.** *Cancer Biol Ther* 2002, **1**(6):640-645.
182. Ciani L, Salinas PC: **WNTs in the vertebrate nervous system: from patterning to neuronal connectivity.** *Nat Rev Neurosci* 2005, **6**(5):351-362.
183. Klein PS, Melton DA: **A molecular mechanism for the effect of lithium on development.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, **93**(16):8455-8459.
184. Zhou J, Qu J, Yi XP, Graber K, Huber L, Wang X, Gerdes AM, Li F: **Upregulation of gamma-catenin compensates for the loss of beta-**

- catenin in adult cardiomyocytes.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007, **292**(1):H270-276.
185. Lee SM, Tole S, Grove E, McMahon AP: **A local Wnt-3a signal is required for development of the mammalian hippocampus.** *Development* 2000, **127**(3):457-467.
186. Brault V, Moore R, Kutsch S, Ishibashi M, Rowitch DH, McMahon AP, Sommer L, Boussadia O, Kemler R: **Inactivation of the beta-catenin gene by Wnt1-Cre-mediated deletion results in dramatic brain malformation and failure of craniofacial development.** *Development* 2001, **128**(8):1253-1264.
187. McMahon AP, Bradley A: **The Wnt-1 (int-1) proto-oncogene is required for development of a large region of the mouse brain.** *Cell* 1990, **62**(6):1073-1085.
188. Zechner D, Fujita Y, Hulsken J, Muller T, Walther I, Taketo MM, Crenshaw EB, 3rd, Birchmeier W, Birchmeier C: **beta-Catenin signals regulate cell growth and the balance between progenitor cell expansion and differentiation in the nervous system.** *Dev Biol* 2003, **258**(2):406-418.
189. Feigenson K, Reid M, See J, Crenshaw EB, 3rd, Grinspan JB: **Wnt signaling is sufficient to perturb oligodendrocyte maturation.** *Mol Cell Neurosci* 2009, **42**(3):255-265.
190. Yashiro-Ohtani Y, He Y, Ohtani T, Jones ME, Shestova O, Xu L, Fang TC, Chiang MY, Intlekofer AM, Blacklow SC *et al*: **Pre-TCR signaling inactivates Notch1 transcription by antagonizing E2A.** *Genes Dev* 2009, **23**(14):1665-1676.
191. Ye F, Chen Y, Hoang T, Montgomery RL, Zhao XH, Bu H, Hu T, Taketo MM, van Es JH, Clevers H *et al*: **HDAC1 and HDAC2 regulate oligodendrocyte differentiation by disrupting the beta-catenin-TCF interaction.** *Nat Neurosci* 2009, **12**(7):829-838.
192. Moon RT, Kohn AD, De Ferrari GV, Kaykas A: **WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies.** *Nat Rev Genet* 2004, **5**(9):691-701.
193. Sperber BR, Leight S, Goedert M, Lee VM: **Glycogen synthase kinase-3 beta phosphorylates tau protein at multiple sites in intact cells.** *Neurosci Lett* 1995, **197**(2):149-153.
194. Chen Y, Bodles AM: **Amyloid precursor protein modulates beta-catenin degradation.** *J Neuroinflammation* 2007, **4**:29.
195. O'Brien WT, Harper AD, Jove F, Woodgett JR, Maretto S, Piccolo S, Klein PS: **Glycogen synthase kinase-3beta haploinsufficiency mimics the behavioral and molecular effects of lithium.** *J Neurosci* 2004, **24**(30):6791-6798.
196. Gould TD, Zarate CA, Manji HK: **Glycogen synthase kinase-3: a target for novel bipolar disorder treatments.** *J Clin Psychiatry* 2004, **65**(1):10-21.
197. Pies R: **Combining lithium and anticonvulsants in bipolar disorder: a review.** *Ann Clin Psychiatry* 2002, **14**(4):223-232.
198. De Sarno P, Axtell RC, Raman C, Roth KA, Alessi DR, Jope RS: **Lithium prevents and ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis.** *J Immunol* 2008, **181**(1):338-345.
199. Zhong J, Lee WH: **Lithium: a novel treatment for Alzheimer's disease?** *Expert Opin Drug Saf* 2007, **6**(4):375-383.



200. Chuang DM: **The antiapoptotic actions of mood stabilizers: molecular mechanisms and therapeutic potentials.** *Ann N Y Acad Sci* 2005, **1053**:195-204.
201. Adams JM, Cory S: **The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival.** *Science* 1998, **281**(5381):1322-1326.
202. Chuang DM: **Neuroprotective and neurotrophic actions of the mood stabilizer lithium: can it be used to treat neurodegenerative diseases?** *Crit Rev Neurobiol* 2004, **16**(1-2):83-90.
203. Sadoul R: **Bcl-2 family members in the development and degenerative pathologies of the nervous system.** *Cell Death Differ* 1998, **5**(10):805-815.
204. Niemann S, Zhao C, Pascu F, Stahl U, Aulepp U, Niswander L, Weber JL, Muller U: **Homozygous WNT3 mutation causes tetra-amelia in a large consanguineous family.** *Am J Hum Genet* 2004, **74**(3):558-563.
205. Fancy SP, Harrington EP, Yuen TJ, Silbereis JC, Zhao C, Baranzini SE, Bruce CC, Otero JJ, Huang EJ, Nusse R *et al*: **Axin2 as regulatory and therapeutic target in newborn brain injury and remyelination.** *Nat Neurosci* 2011, **14**(8):1009-1016.
206. Liang CC, Park AY, Guan JL: **In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro.** *Nat Protoc* 2007, **2**(2):329-333.
207. Miller LM, Dumas P: **Chemical imaging of biological tissue with synchrotron infrared light.** *Biochim Biophys Acta* 2006, **1758**(7):846-857.
208. Chio-Srichan S, Refregiers M, Jamme F, Kascakova S, Rouam V, Dumas P: **Photosensitizer effects on cancerous cells: a combined study using synchrotron infrared and fluorescence microscopies.** *Biochim Biophys Acta* 2008, **1780**(5):854-860.
209. Dumas P, Sockalingum GD, Sule-Suso J: **Adding synchrotron radiation to infrared microspectroscopy: what's new in biomedical applications?** *Trends Biotechnol* 2007, **25**(1):40-44.
210. Pijanka J, Sockalingum GD, Kohler A, Yang Y, Draux F, Parkes G, Lam KP, Collins D, Dumas P, Sandt C *et al*: **Synchrotron-based FTIR spectra of stained single cells. Towards a clinical application in pathology.** *Lab Invest* 2010, **90**(5):797-807.
211. Pijanka JK, Kohler A, Yang Y, Dumas P, Chio-Srichan S, Manfait M, Sockalingum GD, Sule-Suso J: **Spectroscopic signatures of single, isolated cancer cell nuclei using synchrotron infrared microscopy.** *Analyst* 2009, **134**(6):1176-1181.
212. Hastings G, Wang R, Krug P, Katz D, Hilliard J: **Infrared microscopy for the study of biological cell monolayers. I. Spectral effects of acetone and formalin fixation.** *Biopolymers* 2008, **89**(11):921-930.
213. Mariani MM, Lampen P, Popp J, Wood BR, Deckert V: **Impact of fixation on in vitro cell culture lines monitored with Raman spectroscopy.** *Analyst* 2009, **134**(6):1154-1161.
214. Handl J, Knowles J, Kell DB: **Computational cluster validation in post-genomic data analysis.** *Bioinformatics* 2005, **21**(15):3201-3212.
215. Jarvis RM, Goodacre R: **Genetic algorithm optimization for pre-processing and variable selection of spectroscopic data.** *Bioinformatics* 2005, **21**(7):860-868.

216. Le Naour F, Bralet MP, Debois D, Sandt C, Guettier C, Dumas P, Brunelle A, Laprevote O: **Chemical imaging on liver steatosis using synchrotron infrared and ToF-SIMS microspectroscopies.** *PLoS One* 2009, **4**(10):e7408.
217. Niemann A, Berger P, Suter U: **Pathomechanisms of mutant proteins in Charcot-Marie-Tooth disease.** *Neuromolecular Med* 2006, **8**(1-2):217-242.
218. Garbay B, Heape AM, Sargueil F, Cassagne C: **Myelin synthesis in the peripheral nervous system.** *Prog Neurobiol* 2000, **61**(3):267-304.
219. Slutsky SG, Kamaraju AK, Levy AM, Chebath J, Revel M: **Activation of myelin genes during transdifferentiation from melanoma to glial cell phenotype.** *J Biol Chem* 2003, **278**(11):8960-8968.
220. Tawk M, Makoukji J, Belle M, Fonte C, Trousson A, Hawkins T, Li H, Ghandour S, Schumacher M, Massaad C: **Wnt/beta-catenin signaling is an essential and direct driver of myelin gene expression and myelinogenesis.** *J Neurosci* 2011, **31**(10):3729-3742.
221. Phiel CJ, Klein PS: **Molecular targets of lithium action.** *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001, **41**:789-813.
222. Zhong J, Yang X, Yao W, Lee W: **Lithium protects ethanol-induced neuronal apoptosis.** *Biochem Biophys Res Commun* 2006, **350**(4):905-910.
223. Wei H, Qin ZH, Senatorov VV, Wei W, Wang Y, Qian Y, Chuang DM: **Lithium suppresses excitotoxicity-induced striatal lesions in a rat model of Huntington's disease.** *Neuroscience* 2001, **106**(3):603-612.
224. Noble W, Planel E, Zehr C, Olm V, Meyerson J, Suleman F, Gaynor K, Wang L, LaFrancois J, Feinstein B *et al*: **Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by lithium correlates with reduced tauopathy and degeneration in vivo.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, **102**(19):6990-6995.
225. Youdim MB, Arraf Z: **Prevention of MPTP (N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) dopaminergic neurotoxicity in mice by chronic lithium: involvements of Bcl-2 and Bax.** *Neuropharmacology* 2004, **46**(8):1130-1140.
226. Wrabetz L, Feltri ML, Quattrini A, Imperiale D, Previtali S, D'Antonio M, Martini R, Yin X, Trapp BD, Zhou L *et al*: **P(0) glycoprotein overexpression causes congenital hypomyelination of peripheral nerves.** *J Cell Biol* 2000, **148**(5):1021-1034.
227. Makoukji J, Shackelford G, Meffre D, Grenier J, Liere P, Lobaccaro J, Schumacher M, Massaad C: **Interplay between LXR and Wnt/beta-catenin signalling in the negative regulation of peripheral myelin genes by oxysterols.** *Journal of Neuroscience* 2011:in press.
228. Hedgepeth CM, Conrad LJ, Zhang J, Huang HC, Lee VM, Klein PS: **Activation of the Wnt signaling pathway: a molecular mechanism for lithium action.** *Dev Biol* 1997, **185**(1):82-91.
229. Bhat RV, Budd Haeberlein SL, Avila J: **Glycogen synthase kinase 3: a drug target for CNS therapies.** *J Neurochem* 2004, **89**(6):1313-1317.
230. Takahashi-Yanaga F, Sasaguri T: **Drug development targeting the glycogen synthase kinase-3beta (GSK-3beta)-mediated signal transduction pathway: inhibitors of the Wnt/beta-catenin signaling pathway as novel anticancer drugs.** *J Pharmacol Sci* 2009, **109**(2):179-183.

231. Gould TD, Chen G, Manji HK: **In vivo evidence in the brain for lithium inhibition of glycogen synthase kinase-3.** *Neuropsychopharmacology* 2004, **29**(1):32-38.
232. Mori S, Zanardi R, Popoli M, Smeraldi E, Racagni G, Perez J: **Inhibitory effect of lithium on cAMP dependent phosphorylation system.** *Life Sci* 1996, **59**(9):PL99-104.
233. Einat H, Yuan P, Szabo ST, Dogra S, Manji HK: **Protein kinase C inhibition by tamoxifen antagonizes manic-like behavior in rats: implications for the development of novel therapeutics for bipolar disorder.** *Neuropsychobiology* 2007, **55**(3-4):123-131.
234. Su H, Chu TH, Wu W: **Lithium enhances proliferation and neuronal differentiation of neural progenitor cells in vitro and after transplantation into the adult rat spinal cord.** *Exp Neurol* 2007, **206**(2):296-307.
235. Basselin M, Villacreses NE, Lee HJ, Bell JM, Rapoport SI: **Chronic lithium administration attenuates up-regulated brain arachidonic acid metabolism in a rat model of neuroinflammation.** *J Neurochem* 2007, **102**(3):761-772.
236. Miyashita T, Koda M, Kitajo K, Yamazaki M, Takahashi K, Kikuchi A, Yamashita T: **Wnt-Ryk signaling mediates axon growth inhibition and limits functional recovery after spinal cord injury.** *J Neurotrauma* 2009, **26**(7):955-964.
237. Liu Y, Wang X, Lu CC, Kerman R, Steward O, Xu XM, Zou Y: **Repulsive Wnt signaling inhibits axon regeneration after CNS injury.** *J Neurosci* 2008, **28**(33):8376-8382.
238. Perlin JR, Lush ME, Stephens WZ, Piotrowski T, Talbot WS: **Neuronal Neuregulin 1 type III directs Schwann cell migration.** *Development* 2011, **138**(21):4639-4648.
239. Bouquet C, Ravaille-Veron M, Propst F, Nothias F: **MAP1B coordinates microtubule and actin filament remodeling in adult mouse Schwann cell tips and DRG neuron growth cones.** *Mol Cell Neurosci* 2007, **36**(2):235-247.
240. Halleskog C, Mulder J, Dahlstrom J, Mackie K, Hortobagyi T, Tanila H, Kumar Puli L, Farber K, Harkany T, Schulte G: **WNT signaling in activated microglia is proinflammatory.** *Glia* 2011, **59**(1):119-131.



# RESUME

Les cellules de Schwann sont responsables de la myélinisation du système nerveux périphérique. C'est un phénomène complexe et finement régulé. En effet, des altérations de l'expression touchant les protéines de la myéline périphérique (P0 et PMP22) peuvent provoquer des pathologies comme la Charcot-Marie-Tooth. Par ailleurs, les cellules de Schwann subissent d'importantes modifications de leur cytosquelette au cours du processus de myélinisation.

Nous avons identifié la voie Wnt/ $\beta$ -caténine comme directement impliquées dans la régulation de l'expression des gènes de la myéline P0 et PMP22 à la fois *in vitro* mais également *in vivo*. De plus, nous avons initié la démonstration de l'implication de la voie Wnt non canonique au cours de ce même processus. Par ailleurs, nous avons montré que les ligands Wnts aussi bien canoniques que non canoniques pouvaient provoquer l'allongement des extensions des cellules de Schwann. Le chlorure de lithium est un inhibiteur de la GSK3 $\beta$ , mimant l'activation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine. Il provoque un important allongement des cellules de Schwann accompagné de profonds remaniements de l'architecture interne. Par la suite nous nous sommes intéressés aux effets d'une lésion sur la remyélinisation. La voie Wnt/ $\beta$ -caténine est réactivée par une lésion *in vitro* tandis que le lithium accélère la récupération fonctionnelle du battement des vibrisses de souris après pincement du nerf facial, améliore les structures de la gaine de myéline et induit l'expression des gènes de la myéline *in vivo*.

## Conclusion

Notre travail a mis en évidence le rôle majeur des voies Wnt canoniques et non canoniques dans la régulation de l'expression de gènes de la myéline et dans le cytosquelette des cellules de Schwann.