

Thèse présentée pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université Louis Pasteur
Strasbourg I

Discipline: Sciences du Vivant
Spécialité: Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

par **Bastien FRICKER**

Utilisation de la lignée de souris transgéniques
Cycline D1-Luciférase pour l'analyse de mécanismes de
dégénérescence du système nerveux

Soutenue publiquement le 9 Novembre 2007

Commission d'Examen:

Docteur Frédérique RENE	<i>directeur de thèse</i>
Professeur Guy MENSAH-NYAGAN	<i>rapporteur interne</i>
Docteur Daniel HANTAI	<i>rapporteur externe</i>
Docteur Christophe EGLES	<i>rapporteur externe</i>
Docteur Pierre-François PRADAT	<i>examineur</i>

Je remercie :

Monsieur Guy MENSAH-NYAGAN,

Monsieur Daniel HANTAI,

Monsieur Christophe EGLES,

Monsieur Pierre-François PRADAT,

d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

SOMMAIRE

ABREVIATION 6

INTRODUCTION 7

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES 10

Le système nerveux périphérique et ses nerfs

10

Généralités sur le système nerveux périphérique 10

Architecture des nerfs périphériques 10

Histologie du nerf 12

L'unité fonctionnelle du nerf périphérique: la fibre nerveuse 12

Les neurones des nerfs périphériques

15

Généralités sur les neurones 15

Spécificités et architecture fonctionnelle 15

Spécificités des neurones 15

Architecture fonctionnelle des neurones 16

Cytosquelette, moteurs moléculaires et pathologies associées 17

Cytosquelette et transport axonal 18

Pathologies associées au cytosquelette et au transport axonal 19

Origine et organisation anatomique des neurones du système nerveux périphérique 20

Les motoneurones 20

Les motoneurones et leur afférences centrales 21

Les motoneurones dans la moelle épinière 22

Atteintes du motoneurone- α 24

Les neurones sensoriels 24

Généralités sur les neurones sensoriels primaires 24

Les afférences primaires 24

Les cellules de Schwann et la gaine de myéline

25

Origine des cellules de Schwann et gliogenèse 26

Marqueurs de la lignée gliale et réversibilité phénotypique 26

Molécules contrôlant la gliogenèse dans la crête neurale 26

Déterminisme des cellules de Schwann immatures 28

La gaine de myéline et sa formation 28

Organisation de la gaine de myéline 29

La région nodale 29

- La région paranodale 29
- La spécialisation juxtaparanodale 30
- L'internode 30
- Mécanismes d'engainage de l'axone 32
- Sélection des axones et initiation des premiers contacts 32
- Croissance des prolongements de la myéline 33
- Premiers contacts et formation des noeuds de Ranvier 33
- Régulation de l'épaisseur et allongement de la myéline 33
- Protéines des cellules de Schwann et pathologies associées 34

Pathologies des nerfs périphériques : compression, chimiothérapie et diabète

35

La compression nerveuse transitoire 35

- Modifications comportementales 36
- Changements structuraux et électrophysiologiques 36
- Réponse cellulaire 37

Neuropathie induite par le cis-platine 38

- Neuropathie au cis-platine chez l'homme 38
- Modèles murins des neuropathies au cis-platine 39
- Neuropathie expérimentale au cis-platine 39
- Neurotoxicité du cis-platine 39

Les neuropathies diabétiques 40

- Les neuropathies diabétiques chez l'homme et physiopathologie 40
- Modèle murin de diabète de type I induit par la streptozotocine 41

Cycline D1 dans le système nerveux

42

Cycle cellulaire et cycline D1 42

- Les phases du cycle cellulaire 43
- Le contrôle du cycle cellulaire par les complexes cycline/Cdk 45
- Les complexes cycline/Cdk au cours du cycle cellulaire 45
- La cycline D1 45
- Prolifération des cellules de Schwann 46
- Prolifération des cellules de Schwann in vitro 46
- Prolifération des cellules de Schwann in vivo 50

Hypothèse d'un lien entre cycle cellulaire et apoptose 50

- L'entrée en apoptose des neurones post-mitotiques: une tentative avortée d'initier le cycle cellulaire 51
- Arguments expérimentaux 51
- Arguments in vitro 51
- Arguments in vivo 54

MATERIEL & METHODES 56

Animaux et expérimentation animale 56

- Génération des souris transgéniques CnD1-Luc 56
- Expérimentation animale 56
- Compression du nerf sciatique 56

Induction des neuropathies au cis-platine et carboplatine 56

Induction du diabète et traitement neuroprotecteur 57

Prélèvements 57

Evaluation fonctionnelle 57

Mesure de la force musculaire 58

Indice de fonctionnalité du nerf sciatique 58

Examen électrophysiologique 58

Enregistrement des activités spontanées de dénervation 58

Enregistrement de potentiel d'action musculaire composé 61

Vitesse de conduction du nerf caudal 61

Culture primaire de fibroblastes 61

Transcription inverse et PCR semi-quantitatives 62

Extraction d'ARN totaux 62

Transcription inverse et PCR semi-quantitative 62

Western-blot 62

Dosage de l'activité luciférase 63

Immunomarquages 63

Immunofluorescence 63

Révélation à la peroxydase de raifort 64

Comptage de motoneurones 64

Analyses statistiques 65

RESULTATS 66

Cycline D1 et neuropathies périphériques

66

Prolifération des cellules de Schwann: un dénominateur commun des neuropathies périphériques? 66

Contexte de travail et objectif de l'étude 66

Résultats - Discussion 68

Publication n°1 - Evaluation Tools & Animal Models of Peripheral Neuropathies 72

Etude spatio-temporelle de l'expression de la cycline D1 dans les cellules de Schwann après une compression nerveuse 110

Contexte de travail et objectifs de l'étude 110

Résultats 110

Récupération fonctionnelle après une compression nerveuse 110

Modifications électrophysiologiques 111

Dosage global de l'activité luciférase du nerf sciatique après compression nerveuse 114

Analyse spatio-temporelle de l'activation transcriptionnelle de la CnD1 dans le nerf sciatique après compression nerveuse 114

Localisation cellulaire de la CnD1 dans les phases précoces de la dégénérescence Wallérienne 118

Discussion 118

Utilisation de la lignée cycline D1-luciférase pour l'évaluation de propriétés neuroprotectrices dans un modèle de neuropathie diabétique 121

Contexte de travail et objectifs de l'étude 121

Résultats 122

Cinétique d'induction de l'activité luciférase. 122

Effet d'un traitement chronique de C1 sur l'activité luciférase et la vitesse de conduction nerveuse de souris diabétiques 122

Effet du C1 sur la perte de poids et la glycémie de souris diabétiques 125

Effet d'une semaine de traitement de C1 sur l'augmentation d'activité luciférase associée à la compression nerveuse 125

Discussion 125

Expression de la cycline D1 dans les motoneurones adultes & apoptose neuronale

130

Publication n°2 - Cyclin D1 expression is not sufficient to induce motor neuron death in adult mice after a sciatic nerve crush 133

Aperçu des collaborations à d'autres projets

148

Publication n°3 - Mouse models with motor neurone defects as a tool for deciphering ALS : applications, limits and future challenges 148

Publication n°4 - Increased peripheral lipid clearance in an animal model of amyotrophic lateral sclerosis 150

DISCUSSION & PERSPECTIVES 152

Expression de la CnD1 et prolifération des cellules de Schwann : un dénominateur commun aux neuropathies expérimentales

153

CnD1 et dégénérescence Wallérienne associée à la compression nerveuse 153

La lignée de souris transgéniques CnD1-Luc : un outil d'évaluation des neuropathies périphériques 155

Actualisation du lien entre la cycline D1 et l'apoptose neuronale

158

Conclusion et perspectives

159

REFERENCES 162

ABREVIATION

ADN: acide désoxyribonucléique
ADNc: ADN complémentaire
ARNm: acide ribonucléique messenger
ASD: activité électrique spontanée caractéristique de la dénervation
bHLH: motif "hélice-boucle-hélice" basique
BMP: protéine morphogénique osseuse
C1: 2,4,4-triméthyl-3-(15-hydroxypentadécyl)-2-cyclohexe-1-one
CAM: molécule d'adhésion cellulaire
CCN: cellules de la crête neurale
ChAT: choline acétyl-transférase
CMT: syndrome de Charcot-Marie-Tooth
CnD1: cycline D1
Cdk: kinase dépendante des cyclines
CKI: inhibiteur des Cdk
CMAP: potentiel d'action musculaire composé
CS: cellule de Schwann
CSP: cellule de Schwann précurseur
Cx: connexine
dNTP: désoxynucléotides triphosphate
EGF: facteur de croissance de l'épiderme
EMG: électromyographie
FCS: sérum de veau foetal
i.p.: intrapéritonéale
IFS: indice de fonctionnalité du nerf sciatique
K⁺: ion potassium
MAP: protéine associée aux microtubules
MBP: protéine basique de la myéline
MMLV: virus de la leucémie murine de Moloney
MN: motoneurone
MPZ: protéine zéro de la myéline
NCAM: molécule d'adhésion cellulaire neuronale
PBS: tampon phosphate salin
PCR: réaction de polymérisation en chaîne
PFA: paraformaldéhyde
PMP22: protéine de la myéline périphérique 22KDa
RT: transcription inverse
Shh: Sonic hedgehog
SNC: système nerveux central
SNCV: vitesse de conduction des nerfs sensoriels
SNP: système nerveux périphérique
Sox10: SRY (sex determining region Y) box-10
SPG: paraplégie spastique
STZ: streptozotocine

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Dans le domaine de la recherche neurologique, les mécanismes responsables de la dégénérescence axonale et la réponse des cellules gliales qui contribuent au remodelage nerveux ont longtemps été négligés au profit d'études se focalisant sur le corps cellulaire des neurones. Pourtant, la compréhension de ces mécanismes pourrait avoir des retombées majeures pour le traitement des maladies neurodégénératives, des neuropathies périphériques et dans la reconstruction nerveuse.

Sous le terme de neuropathies périphériques les neurologues regroupent toutes pathologies caractérisées par une altération de la structure ou de la fonction des nerfs périphériques moteurs, sensoriels, mixtes ou du système nerveux autonome. D'étiologies très diverses, les mécanismes initiateurs peuvent prendre place dans l'axone lui-même, le corps cellulaire ou bien au sein de cellules de Schwann (CS). Ces pathologies incapacitantes constituent un véritable enjeu de santé publique comme l'atteste, pour ne citer que celui ci, le nombre de cas de neuropathies associées au diabète (une projection estime à 333 millions le nombre de diabétiques en 2025, dont 33% développeront une neuropathie), à l'infection par VIH ou par le bacille de la Lèpre (environ 550 000 cas enregistrés en 2003).

Lors de mon arrivée au laboratoire, une lignée de souris transgéniques avait été générée : les souris cyclineD1-Luciférase (CnD1-Luc) qui expriment la luciférase sous contrôle du promoteur de la cycline D1 (CnD1). L'intérêt de cette lignée était double :

- i.) La CnD1 est une molécule clé du cycle cellulaire puisqu'elle permet la transition de la phase G1 à la phase S. A l'aide de ce modèle transgénique, on peut aisément évaluer la régulation transcriptionnelle de ce gène, reflétant la réponse proliférative des cellules dans un tissu cible, par exemple celle des CS dans les nerfs périphériques.
- ii.) D'autre part, de nombreuses études portant sur l'apoptose neuronale et les maladies neurodégénératives avaient mis en évidence que la reprise du cycle cellulaire, médiée par la CnD1, était interprétée comme une information conflictuelle par ces cellules post-mitotiques, conduisant à l'initiation de l'apoptose.

Les objectifs de mon travail de thèse consistaient dans un premier temps à caractériser cette lignée CnD1-Luc, puis à l'appliquer à l'étude des neuropathies périphériques et de l'apoptose neuronale par l'utilisation de différents modèles animaux.

L'analyse intensive de la bibliographie relative aux neuropathies périphériques a rapidement révélé que la prolifération des CS est une constante des pathologies du système nerveux périphérique. Il ressortait également de cette étude que la prolifération des CS chez l'animal adulte est strictement dépendante de la CnD1. Ces observations nous ont conduit à tester trois modèles de neuropathies périphériques dans le but de vérifier que les souris CnD1-Luc pourraient être utilisées pour l'étude de ces pathologies. Les résultats obtenus, rapportés dans la publication n°1, montrent que les souris CnD1-Luc répondent à un large spectre de neuropathies : mononeuropathie induite par compression nerveuse, polyneuropathie sensorielle axonale provoquée par administration de composés platinés et polyneuropathie sensorielle démyélinisante associée au diabète.

La compression nerveuse est le paradigme expérimental qui permet l'étude du remodelage des nerfs périphériques. Les modifications comportementales, électrophysiologiques et structurales sont réversibles, contrairement au modèle d'axotomie où la régénération est faible voir inexistante. D'un point de vue cellulaire, une partie des axones dégénère de manière rétrograde du côté distal à la lésion. La régénération axonale est tributaire d'un guide physique que constitue la gaine de myéline, mais également de molécules de guidage et de facteurs trophiques délivrés par les CS. Ainsi, ce type de lésion s'accompagne d'une prolifération active des CS, dépendante de la CnD1. Si le sens de la dégénérescence axonale a récemment été élucidé, l'intensité, la direction et la chronologie de la réponse proliférative des CS restent inconnus. En débutant cette étude, les objectifs étaient (i.) de valider la fonctionnalité de la lignée CnD1-Luc, puis (ii.) d'établir le schéma spatial et temporel précis de la prolifération des CS jusqu'alors inconnu. Les résultats obtenus sont présentés dans le premier paragraphe du chapitre "La lignée de souris transgéniques CnD1-Luc : un outil d'étude des neuropathies périphériques".

Nous avons ensuite souhaité conforter l'applicabilité de ce modèle à l'ensemble des neuropathies périphériques mais aussi le développer pour des études de criblage d'agents neuroprotecteurs. Pour cela nous avons choisi de comparer la réponse de souris diabétiques à des souris, également diabétiques, mais traitées de manière chronique avec un composé potentiellement neuroprotecteur, le 2,4,4-triméthyl-3-(15-hydroxypentadécyl)-2-cyclohexe-1-one aussi appelé C1. Ces travaux, rapportés dans le deuxième chapitre de la section "Résultats", confortent l'utilisation de cette lignée pour le criblage de drogues à pouvoir thérapeutique.

La dernière partie de mes travaux s'intéresse à la régulation des voies apoptotiques après compression nerveuse. Chez le nouveau-né cette lésion induit l'apoptose des motoneurones (MN), *a contrario*, les mêmes neurones sont résistants à ce type de stress chez l'animal adulte. Basée sur des observations surprenantes initialement obtenues sur les souris CnD1-Luc qui suggéraient l'activation de la CnD1 dans la moelle épinière, nous avons entrepris une étude des régulateurs de la phase G1

du cycle cellulaire dans les MN. Les résultats obtenus, constituant la publication n°2, nous ont conduit à proposer une actualisation du lien entre cycle cellulaire et apoptose neuronale.

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

I. Le système nerveux périphérique et ses nerfs

A. Généralités sur le système nerveux périphérique

Le système nerveux est classiquement subdivisé en système nerveux central (SNC) et système nerveux périphérique (SNP). Cette dichotomie est liée à l'ontogenèse de ces systèmes. D'un point de vue embryologique, les cellules du SNC dérivent de la différenciation terminale du tube neural alors que celles qui constituent le SNP s'individualisent depuis les bourgeons de la crête neurale (Fig. 1).

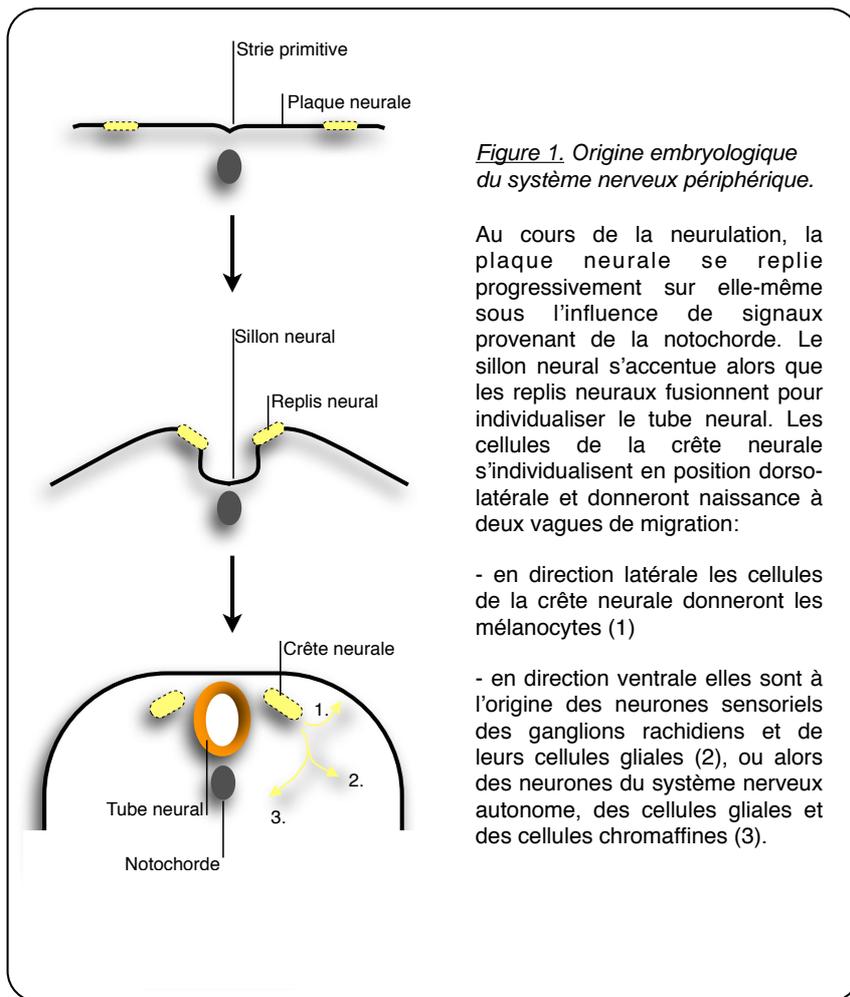
Anatomiquement, le SNC est protégé par les os du crâne et la colonne vertébrale. Il regroupe l'encéphale (cerveau, tronc cérébral et cervelet) et la moelle épinière. Le SNP quant à lui fait référence à des structures plus diffuses formées suite à la migrations des cellules de la crête neurale : les ganglions périphériques, le système nerveux entérique (localisé dans la paroi du tractus digestif) et la médullo-surrénale. Les corrélations entre fonctions et substrats ont permis d'élaborer une classification fonctionnelle :

- D'une part le SNP somatique qui reçoit les informations provenant de la peau, des tendons, du squelette, des articulations et des muscles. Il contrôle les mouvements des muscles squelettiques.
- D'autre part, les systèmes nerveux entérique et autonome (ou végétatif) qui contrôlent les mouvements péristaltiques du tractus digestif, les glandes digestives, la contractilité des vaisseaux sanguins et d'autres fonctions des organes profonds. Notons que le système nerveux autonome est lui même scindé en système sympathique (thoraco-lombaire) et parasympathique (cranio-sacré) dotés d'actions antagonistes sur les organes.

Les afférences et efférences d'origine somatique et viscérale de ces trois systèmes rejoignent la moelle épinière par les nerf spinaux.

B. Architecture des nerfs périphériques

Les nerfs sont classés en nerfs sensitifs et nerfs moteurs. Les premiers, à l'exemple des nerfs cutanés, contiennent uniquement des fibres sensorielles. Dans le second cas, c'est par abus de



langage qu'on le nomme ainsi car c'est en réalité un nerf à destination musculaire. Par exemple, le nerf sciatique et ses collatérales musculaires, abondamment étudiés au cours de mon travail, contiennent des fibres motrices et sensitives nécessaires à la coordination des muscles agonistes et antagonistes. En m'appuyant sur l'exemple du nerf mixte, je présenterai dans ce chapitre l'organisation anatomique et fonctionnelle des nerfs périphériques.

1.Histologie du nerf

L'analyse histologique de nerfs mixtes révèle une organisation en fascicules nerveux (Fig. 2). On distingue le tissu conjonctif intrafasciculaire, périfasciculaire et interfasciculaire. Le premier, également appelé endonèvre, sépare les fibres nerveuses les une des autres. Le périnèvre entoure chaque fascicule formant une couche d' $1\mu\text{m}$ d'épaisseur riche en fibroblastes et fibres de collagène. Puis l'épinèvre se dispose entre les fascicules. C'est un tissu conjonctif lâche, épais qui renferme des adipocytes, des fibroblastes et des capillaires. Ces éléments ont un rôle essentiel dans l'organisation anatomique, la cohésion et la résistance du nerf.

2.L'unité fonctionnelle du nerf périphérique: la fibre nerveuse

La collecte d'informations provenant de l'environnement et du corps, leur adressage aux centres nerveux spinaux et supérieurs puis la transmission d'une réponse adéquate vers les tissus cibles sont assurés par les neurones. Néanmoins, pour que cette réponse ait un sens, l'aspect temporel de la conduction nerveuse est fondamental. La gaine de myéline augmente la vitesse de l'influx nerveux et répond à ce problème. L'unité fonctionnelle du nerf périphérique est définie par la fibre nerveuse qui rassemble le prolongement d'un neurone moteur ou sensoriel associé ou non à une gaine de myéline.

Une coupe transversale de nerf mixte (Fig. 2) permet de mettre en évidence des fibres nerveuses de diamètre variable, myéliniques ou amyéliniques. Au centre de celle-ci apparaît le cytoplasme du neurone également appelé axoplasme. Il est entouré d'une cellule gliale satellite, la cellule de Schwann (CS). Dans le cas d'un axone amyélinique, le cytoplasme de la CS enveloppe plusieurs axones formant le faisceau de Remak. Pour un axone myélinisé, la CS se différencie pour former la gaine de myéline et le ratio CS/axone est de 1:1 (Kahle et al., 1981).

En coupe longitudinale, la gaine de myéline prend naissance rapidement au sortir de la moelle épinière et s'arrête juste avant l'arborisation terminale de l'axone. Cette gaine apparaît interrompue par des étranglements appelés noeuds de Ranvier (Fig. 3). A chaque segment internodal se place une CS dont le noyau est positionné en périphérie. Cette organisation en segment est le support anatomique de la conduction saltatoire, permettant un incrément de la vitesse de conduction.

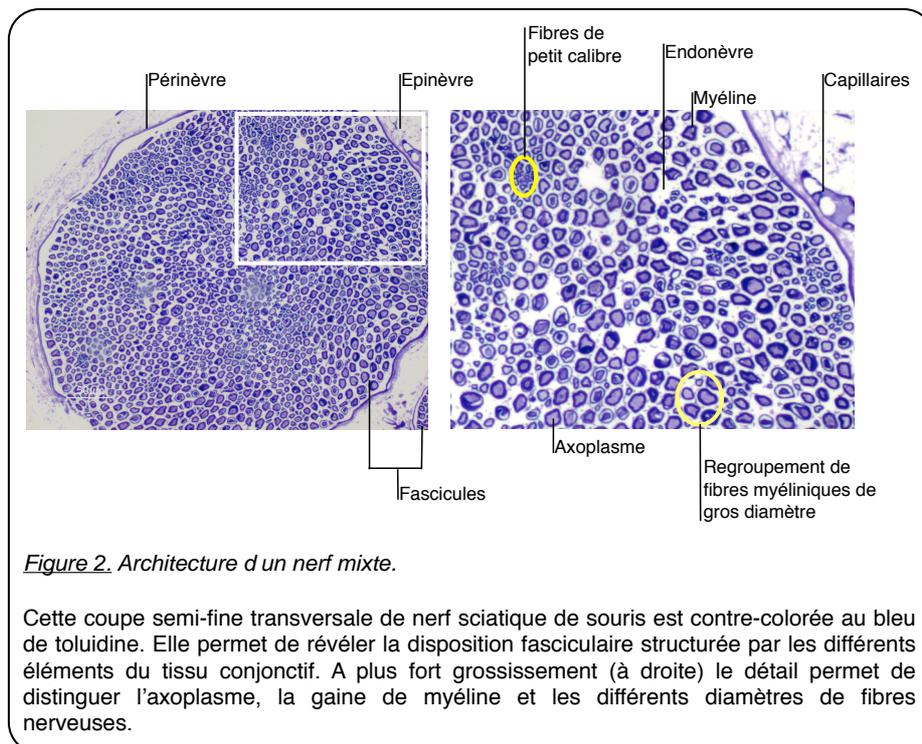
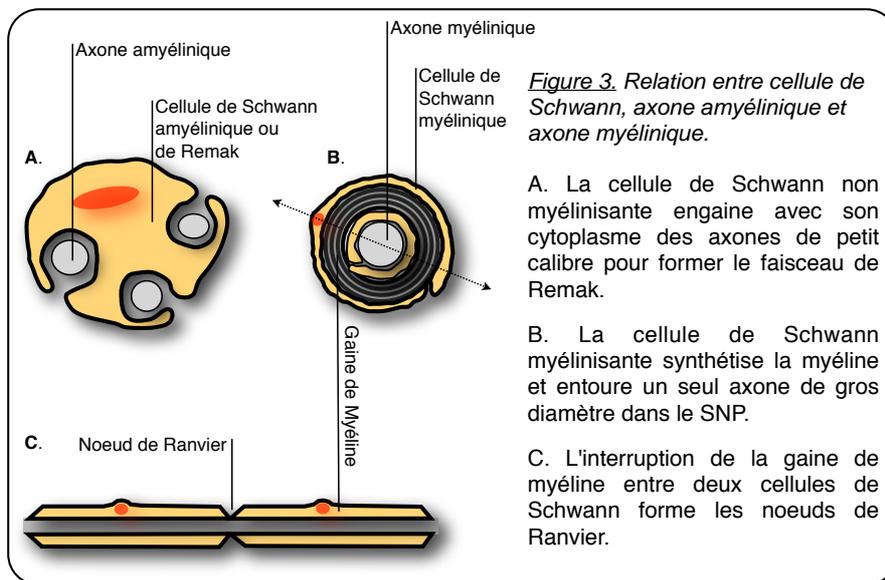


Figure 2. Architecture d un nerf mixte.

Cette coupe semi-fine transversale de nerf sciatique de souris est contre-colorée au bleu de toluidine. Elle permet de révéler la disposition fasciculaire structurée par les différents éléments du tissu conjonctif. A plus fort grossissement (à droite) le détail permet de distinguer l'axoplasme, la gaine de myéline et les différents diamètres de fibres nerveuses.



II. Les neurones des nerfs périphériques

Durant la première moitié du XVIII^{ème} siècle, le perfectionnement des microscopes a permis de nombreuses avancées dans l'étude des organes du corps humain et notamment la découverte d'éléments fondamentaux alors appelés "entités globulaires". Cependant, les caractéristiques physiques et la rapidité de détérioration du tissu nerveux l'ont rendu difficile à étudier. Ce ne fut qu'en mettant au point de nouvelles techniques de préparation des tissus (1832 à 1845) que le tchèque Jan Evangelista Purkinje décrivit pour la première fois les cellules qui portent son nom. C'est alors que fut énoncée par Théodor Schwann (1810-1882) la théorie cellulaire soutenant la thèse que les organismes vivants sont composés de cellules. Puis l'italien Camillo Golgi se concentra sur l'étude de nouveaux agents chimiques permettant de durcir et colorer les tissus, il découvrit ainsi la "réaction noire" (1873) qui lui permit d'étudier les "cellules de la pensée" avec une très grande précision. En 1889, après avoir vérifié les résultats de l'italien et persuadé de l'importance révolutionnaire de cette technique, l'espagnol Santiago Ramon y Cajal entreprit un voyage en Allemagne pour présenter de nombreuses découvertes et observations originales basées sur cette technique. Les deux protagonistes défendaient chacun une conception différente. Pour le premier le système nerveux était un "réseau nerveux diffus" où les dendrites avaient un rôle nutritif ; pour l'autre, chaque cellule nerveuse était une unité fonctionnelle et les dendrites étaient elles aussi impliquées dans la communication nerveuse. C'est alors que Cajal posa les bases de ce que l'anatomiste allemand Wilhelm von Waldeyer définit en 1891 comme la "théorie du neurone".

A. Généralités sur les neurones

Ce chapitre est l'occasion de rappeler quelques éléments de cytologie et de physiologie cellulaire communs aux neurones avant de présenter de manière plus détaillée les spécificités des neurones moteurs et des neurones sensoriels, principalement éclairées par des données anatomiques et de biologie du développement.

1. Spécificités et architecture fonctionnelle

1. Spécificités des neurones

Une des singularités du neurone est la transmission rapide d'informations sous forme de signaux électriques. A ce titre, le neurone est une cellule excitable et polarisée. Ses extrémités sont morphologiquement et fonctionnellement très spécialisées pour permettre d'une part la collecte

d'informations provenant d'autres neurones ou de terminaisons sensorielles et, d'autre part, de véhiculer et transmettre une réponse adaptée à la cellule cible.

Il est difficile de parler du neurone sans évoquer son statut de cellule post-mitotique. En effet, après la naissance, le neurone est une cellule quiescente qui ne peut plus entrer dans le cycle cellulaire, rendant toute division impossible. Le cerveau du nouveau né-humain est en surmaturation, à la naissance il possède un nombre excédentaire de neurones lesquels seront éliminés spontanément au cours de la période post-natale ("naturally occurring cell death") pour ne conserver que les connexions les plus pertinentes et les plus efficaces. Il est alors aisé de comprendre que les neurones portent les stigmates de la vie en s'imprégnant de "l'épigénétique" (Changeux, 1984). Cette incapacité de renouvellement cellulaire explique également le caractère irrémédiable des maladies neurodégénératives et l'absence de tumeur neuronale chez l'adulte.

Pour faire face à cette absence de renouvellement cellulaire, les neurones sont des cellules dites "plastiques". Cette souplesse est mise à profit dans les mécanismes d'apprentissage en augmentant le nombre et l'efficacité des synapses les plus pertinentes (Toni et al., 1999). Cette propriété intervient également après des lésions cérébrales importantes où la plasticité morphologique et neurochimique des réseaux neuronaux est à la base de la récupération fonctionnelle (Liegeois et al., 2004).

2. Architecture fonctionnelle des neurones

Le neurone dispose, comme toute autre cellule, des organites nécessaires à son homéostasie énergétique et à la synthèse protéique. Ils sont néanmoins plus ou moins développés selon la nature et la fonction du neurone. La taille de cette cellule varie considérablement, un neurone en grain du cervelet est globulaire et très compact (diamètre < 10 μm) alors qu'un motoneurone projetant à grande distance est stellaire et volumineux (diamètre = 25-70 μm).

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

- *Les dendrites*. Les dendrites sont plus ou moins nombreux et présentent une arborisation dichotomique. On y retrouve les mêmes organites que dans le péricaryon, surtout dans leur partie proximale. La présence de ribosomes indique l'existence d'une synthèse locale de protéines (Klann and Dever, 2004). Les épines dendritiques, excroissances recouvertes de récepteurs, reçoivent les afférences synaptiques. Leur nombre et leur morphologie varient selon le contexte ; cette plasticité synaptique est mise à l'épreuve dans des situations telles que la potentialisation à long terme.

- *L axone*. Il est en général unique et dépourvu de ribosomes. Cependant il semble que l'axone soit capable de synthèse protéique locale, notamment lors de la régénération nerveuse (Willis and Twiss, 2006). On a l'habitude de distinguer le cône d'émergence, zone où l'axone se détache du corps cellulaire, le segment initial, riche en canaux sodiques sensibles au voltage, une zone de conduction et la partie terminale.

- *Les terminaisons présynaptiques*. Les axones dialoguent avec leurs cellules effectrices par le biais de leurs terminaisons. Dans le cas particulier d'un dialogue neurone-neurone on parle de synapse neuronale. La majorité de ces connexions sont de type chimique et font intervenir des neurotransmetteurs mais il existe également des synapses électriques correspondant à des jonctions de type "gap".

Bien que les synapses axo-dendritiques soient les plus étudiées, elles peuvent également être axo-axoniques, dendro-dendritiques, et tout élément d'un neurone peut être présynaptique à un autre. Contrairement aux illustrations classiques en cul-de-sac, la majorité des terminaisons sont formées par des varicosités dites "en passant" qui s'étendent le long de l'axone. Cette organisation permet une régulation individuelle des boutons présynaptiques par la présence d'auto-récepteurs et un apport différentiel de matériel biologique grâce au flux axonal.

Mis à part le faible nombre de ribosomes et l'absence de lysosomes, le bouton synaptique est doté des mêmes constituants que le corps cellulaire. Notons en particulier l'abondance de mitochondries et un grand nombre de vésicules synaptiques. L'élément présynaptique est caractérisé par une différenciation membranaire dense (ou encroutement) que l'on appelle zone active, spécialisation permettant l'exocytose de vésicules synaptiques.

2.Cytosquelette, moteurs moléculaires et pathologies associées

Le haut degré de différenciation des neurones met en exergue l'importance d'un transport axonal organisé, structuré autour d'un cytosquelette spécifique aux axones ou aux dendrites. Comme toute cellule, le cytosquelette neuronal est constitué de microfilaments d'actine, de filaments intermédiaires et de microtubules. Leur interaction avec des ATPase spécifiques, appelées moteurs moléculaires, est responsable du transport rétrograde (200-400 mm/jour) et antérograde rapide (200-400 mm/jour) des constituants cellulaires (Brown, 2000). Le transport axonal lent (0,3-8 mm/jour) (Brown, 2000) semble quant à lui concerner l'acheminement et le recyclage des éléments du cytosquelette. En dépit de sa vitesse, il fait également intervenir des moteurs moléculaire, mais selon un mode "stop-and-go".

De manière intuitive, il est assez évident de concevoir que les neurones à projections longues sont très sensibles à des altérations du cytosquelette ou du système de transport. Cette vulnérabilité peut conduire à des pathologies des nerfs périphériques ou du système moteur, qui seront évoquées dans le présent chapitre.

1. Cytosquelette et transport axonal

a. Les microfilaments d'actine

Les microfilaments sont constitués d'une double hélice de 6 nm de diamètre formée par polymérisation de monomères d'actine globulaire. Du fait de leur dynamique, liée à des cycles de polymérisation-dépolymérisation, cette composante joue le rôle de cytomusculature du neurone et vient s'ancre à la membrane plasmique par des protéines adaptatrices telles que la taline, la spectrine ou la vinculine (Dent and Gertler, 2003). L'interaction des microfilaments avec des moteurs moléculaires de la famille des myosines leur confère un rôle dans le transport des protéines cargos, dans le flux rétrograde d'actine mais également des propriétés contractiles (Dent and Gertler, 2003). Les microfilaments sont fondamentaux dans le développement du SNC : sous l'influence de molécules attractives (nétrine-1) ou répulsives (sémaphorine-3A), les microfilaments d'actine sont responsables de la motilité des cônes de croissance et permet leur protrusion ou leur rétraction (Kalil and Dent, 2005). En plus de ce rôle, le cytosquelette d'actine est enrichi au niveau des épines dendritiques et permet de modifier la force d'une synapse en augmentant la densité et la longueur des épines dendritiques (Zito et al., 2004).

b. Les microtubules

Les microtubules forment une structure polarisée de 25 nm de diamètre constituée de protofibrilles d'hétérodimère d' α - et β -tubuline. L'extrémité dite "moins" est le site d'une dépolymérisation rapide alors que l'extrémité "plus" est le siège d'une polymérisation intense. Cette dynamique est contrôlée par des protéines de cape et des protéines de la familles des MAP (Microtubule Associated Protein) : la MAP-2 et la protéine Tau stabilisent respectivement les microtubules dans les dendrites et les axones (Dent and Gertler, 2003). Après leur synthèse dans le péricaryon, les microtubules sont transportés par les dynéines et prennent une orientation parallèle à l'axe des neurites (Dent and Gertler, 2003).

Grâce à leurs liaisons aux moteurs moléculaires de la famille des kinésines et des dynéines, les microtubules jouent un rôle fondamental dans le transport axonal. Les kinésines sont responsables du transport antérograde des vésicules synaptiques, des mitochondries, de protéines synaptiques et des récepteurs postsynaptiques dont l'adressage spécifique vers les axones ou les dendrites se fait par l'intermédiaire de protéines cargo (Hirokawa and Takemura, 2004). Les dynéines, associées à leur co-activateur la dynactine, génèrent une force dirigée vers l'extrémité moins des microtubules et sont responsables du transport rétrograde. De cette manière, le NGF lié à son récepteur TrkA est adressé au corps cellulaire depuis la terminaison, associé aux "endosomes de signalisation". Ce mécanisme permet la signalisation rétrograde en facilitant la remontée d'informations vers le corps cellulaire

(Hirokawa and Takemura, 2004). En plus de leurs fonctions dans le transport axonal et dendritique, les microtubules interviennent indirectement sur la mobilité des cônes de croissance, sur le guidage et l'arborisation des axones et dans la plasticité post-synaptique.

c. Les neurofilaments

Les neurofilaments sont les constituants les plus abondants du cytosquelette neuronal. Ils sont présents dans le périkaryon, les dendrites et les axones. Ces filaments intermédiaires forment un tube de 10 nm de diamètre et constituent l'élément le plus stable du cytosquelette. Ces tubes sont eux même constitués de triplets des trois isoformes de neurofilaments dont la présence est indispensable pour leur association (Lee et al., 1993) : la chaîne légère (Nf-L), la chaîne intermédiaire (Nf-M) et la chaîne lourde (Nf-H). 80% des neurofilaments sont hautement phosphorylés, modification qui permet la formation de ponts avec l'axo-squelette et qui constitue le "pool" statique (Petzold, 2005). En plus de ce rôle structural, ils interviennent dans la régulation du calibre de l'axone par l'intermédiaire d'espateurs avec les neurofilaments avoisinants. Cette fonction est assurée par les forces électrostatiques répulsives des groupements phosphates chargés et est régulée par leur état de phosphorylation (Petzold, 2005).

2. Pathologies associées au cytosquelette et au transport axonal

Il est admis que le transport axonal est perturbé dans un large spectre de maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer, la sclérose latérale amyotrophique ou encore les maladies à polyglutamine (Chevalier-Larsen and Holzbaur, 2006). Des mutations des composants du cytosquelette, de protéines associées ou encore de moteurs moléculaires sont à l'origine de pathologies du système nerveux : démence fronto-temporale, maladie de Parkinson et de Kennedy, syndrome de Charcot-Marie-Tooth, neuropathie motrice progressive, fibrose congénitale du muscle extraoculaire et paraplégie spastique... Le tableau 1 reprend de manière non exhaustive les principales protéines concernées et les syndromes qui y sont associés.

	Protéines mutées	Maladies associées
Mutations dans le cytosquelette	Nf-L	CMT2E
	Nf-M	Parkinson
Moteurs moléculaires	KIF1Bβ	CMT2A
	KIF5A	SPG
	KIF21A	CFEOM
	Dynactine (p150Glued)	SBMA
Protéines associées au cytosquelette	HSP27	CMT2F
	Tau	FTDP-17
	TBCE	PMN

Tableau 1: Transport axonal et pathologies du système nerveux.

Ce tableau fait le point sur des pathologies du système nerveux central et périphérique liées à des modifications des protéines du transport axonal. La perturbation de cette fonction essentielle pour le neurone est impliquée dans des maladies aussi diverses que le syndrome de Charcot-Marie-Tooth (CMT), le syndrome de Parkinson, les démences fronto-temporales associées au Parkinsonisme (FTDP-17), la paralysie spastique progressive (SPG), la maladie de Kennedy (SBMA), les neuropathies motrices progressives (PMN) et la fibrose congénitale du muscle extraoculaire (CFEOM).

B. Origine et organisation anatomique des neurones du système nerveux périphérique

1. Les motoneurones

Les motoneurones (MN) sont de grosses cellules étoilées (cellules de Golgi de type-I, diamètre = 25-70 μm) localisées dans la corne antérieure de la moelle épinière. Il est intéressant de souligner que leur corps cellulaire est localisé au sein du SNC alors que la quasi intégralité de leur long axone projette en périphérie, leur conférant des capacités de régénération. D'un point de vue neurochimique, ils synthétisent l'acétylcholine, leur neurotransmetteur privilégié. Son enzyme de synthèse, la choline-acétyltransférase (ChAT), est considérée comme un marqueur spécifique de ces cellules et permet leur identification par immunohistochimie. Lorsque l'on considère l'étendue de la moelle épinière dans l'axe rostro-caudal, son organisation somatotopique, les cibles variées de ces cellules et la taille des leurs projections, on comprend que les mécanismes qui contrôlent leur déterminisme et le guidage de leurs projections constituent un chapitre complexe des neurosciences.

1. Les motoneurones et leur afférences centrales

a. Classification générique des motoneurones

Les MN forment le dernier étage des voies de projections descendantes. Plusieurs populations génériques de MN peuvent être distinguées: les MN somatiques (bulbaires et spinaux), viscéraux et branchiaux. Ils répondent à une organisation selon l'axe cranio-caudal et ventro-dorsal.

- *Les MN branchiaux* innervent les arcs branchiaux, mésenchyme primordial qui contribuera à la formation de la tête et du cou. En position légèrement dorsale de la corne antérieure, ils sont restreints à la partie crâniale de la moelle épinière alors que les MN viscéraux et somatiques sont présents tout le long la moelle.

- *Les MN somatiques crâniens* (ou bulbaires) sont en position ventrale et innervent les muscles extraoculaires et ceux de la langue. Les MN somatiques spinaux (ou inférieurs), également en position ventrale, innervent les muscles du tronc et des membres.

- *Les MN viscéraux* du niveau cervical projettent sur les ganglions parasymphatiques et ceux du niveau thoraco-lombaire sur les ganglions sympathiques.

b. Les voies motrices descendantes de la moelle épinière

La moelle épinière possède une organisation segmentaire, elle est capable d'intégrer des informations périphériques et d'y répondre grâce aux arcs réflexes. Néanmoins, nombre de fonctions dépendent du contrôle supra-spinal et pour cela, deux principaux systèmes descendants établissent des connections avec les MN spinaux. D'une part les voies somato-motrices et d'autre part les voies viscéro-motrices (ou végétatives). L'organisation des voies autonomes ne sera pas développée d'avantage pour se consacrer essentiellement à celle du système moteur somatique divisé en faisceaux pyramidal et extrapyramidal.

- *Le système pyramidal.* Le faisceau pyramidal (ou tractus cortico-spinal) naît au niveau des aires corticales. 90% de ses fibres traversent la ligne médiane au niveau de la décussation des pyramides et forme le cordon latéral de la substance blanche. Les fibres pyramidales restées du côté ipsilatéral constituent le cordon ventral. Les voies pyramidales véhiculent des informations (excitatrices ou inhibitrices) pour le mouvement volontaire sous contrôle des aires corticales (motrices, sensori-

motrices et associatives) et contactent les MN directement ou par l'intermédiaire d'interneurones (Kahle et al., 1981).

- *Le système extra-pyramidal.* Le faisceau extrapyramidal, issu du tronc cérébral, véhicule les informations du système moteur extra-pyramidal (en particulier des ganglions de la bases) et contrôle les actions musculaires d'accompagnement, inconscientes, pour la phase d'exécution du mouvement. Ainsi il corrige l'équilibre, le tonus musculaire et les mouvements différentiels du corps et de la tête. Il descend le long de la moelle par le biais de nombreux faisceaux diffus pour contacter les MN spinaux (Kahle et al., 1981).

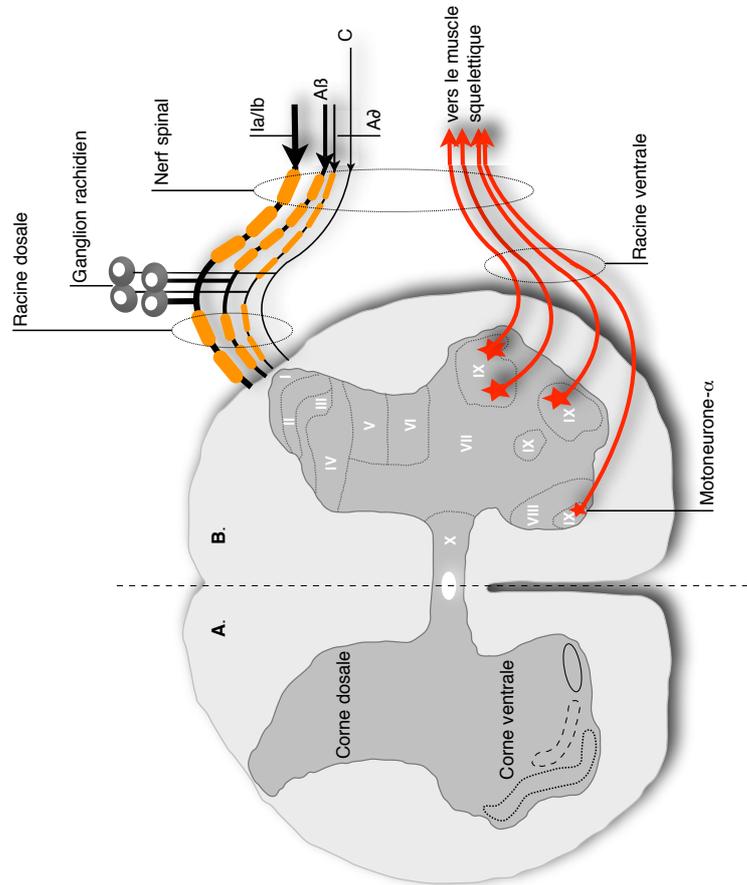
2. Les motoneurones dans la moelle épinière

Les corps cellulaires des MN somato-moteurs sont localisés dans la corne ventrale de la moelle épinière et répondent à une organisation somatotopique très précise (Fig. 4). Ils sortent de la moelle par la racine ventrale en émettant des axones myéliniques à conduction rapide. On les classe en $MN\alpha$, $MN\beta$ et $MN\gamma$. Les premiers innervent les muscles squelettiques grâce à leur terminaison caractéristique, la jonction neuromusculaire. Ainsi le $MN\alpha$ contrôle un ensemble de fibres musculaires qui se contractent de manière coordonnée, pour former une entité fonctionnelle que l'on appelle l'unité motrice. Les $MN\gamma$, ou fusi-moteurs, innervent le fuseau neuro-musculaire et contrôlent la longueur et la tension des muscles squelettiques. Les $MN\beta$ innervent à la fois les fibres musculaires squelettiques et intrafusales.

Les corps cellulaires sont principalement localisés dans la couche IX (les chiffres romains font référence à la lamination de Rexed) mais aussi dans la couche VIII, où ils sont entourés d'interneurones. Ils peuvent émettre des dendrites jusqu'à la couche III où ils collectent les informations d'interneurones. Cette organisation segmentaire permet une intégration locale et la genèse d'activités réflexes.

La majorité des afférences pyramidales font synapse directement sur les MN des couches VIII et IX. Le reste des fibres contacte les MN par l'intermédiaire d'interneurones localisés dans les couches VII et VIII. Les afférences du faisceau extra-pyramidal sont plus diffuses et généralement polysynaptiques. Elles projettent sur les couches II, V, VI, VII, VIII et IX.

Figure 4. Organisation d'un segment de moelle épinière lombaire.



A. Organisation somatotopique des MN α au sein de la corne ventrale. La ligne pointillée regroupe les MN qui innervent les muscles extenseurs, la ligne discontinue ceux des muscles fléchisseurs et la ligne continue ceux des muscles axiaux.

B. L'organisation laminaire des segments médullaires est indiquée par la numérotation de Rexed en chiffres romains.

Les afférences sensorielles, dont les corps cellulaires sont localisés dans les ganglions rachidiens, pénètrent dans la moelle par la racine dorsale. Le diamètre des axones et le degré de myélinisation des fibres proprioceptives (Ia/lb), extéroceptives (Aβ) et nociceptives (Aδ/C) sont suggérés par l'épaisseur des traits. Par soucis de clarté, le degré de myélinisation des éfferences motrices qui sortent par la racine ventrale n'est pas représenté. Un peu après la sortie de la moelle, les racines ventrale et dorsale fusionnent pour former le nerf spinal. D'après Kahle et al., 1981.

3. Atteintes du motoneurone- α

D'un point de vue clinique, l'atteinte du dernier étage des voies motrices constitué des neurones moteurs périphériques (MN α) et de ses prolongements prend la forme de syndrome neurogène périphérique. Il s'exprime principalement par une paralysie, une amyotrophie et des fasciculations, signatures d'unités motrices dénervées. Le syndrome neurogène périphérique peut résulter de lésions radiculaires, d'atteintes des nerfs périphériques (rarement purement motrices) mais surtout d'atteintes des MN périphériques de la corne antérieure. Dans ce cas, les causes les plus fréquentes sont la poliomyélite antérieure aiguë, les amyotrophies spinales (souvent héréditaires) et la sclérose latérale amyotrophique (associée à un syndrome pyramidal) (de Recondo, 1995).

2. Les neurones sensoriels

1. Généralités sur les neurones sensoriels primaires

Les neurones sensoriels primaires dérivent des cellules de la crête neurale. Leurs corps cellulaires sont localisés dans les ganglions de la racine dorsale (ou ganglions rachidiens), où ils sont entourés de petites cellules gliales, les cellules satellites. D'un point de vue morphologique, ce sont des neurones unipolaires. Un seul prolongement part du péricaryon et donne naissance à deux neurites : l'un vers la périphérie et l'autre vers la moelle. Rappelons que l'axone est défini comme le prolongement qui conduit le potentiel d'action dans le sens somatofuge et les dendrites dans le sens somatipète. Dans le cas de ces neurones, le prolongement périphérique conduit le potentiel d'action au péricaryon et devrait porter l'appellation de dendrite. Néanmoins, sur la base d'études *in vitro* puis par abus de langage, le prolongement périphérique des neurones unipolaires des ganglions rachidiens est couramment mais trompeusement dénommé axone. Précisons également qu'à l'inverse des MN, les neurones sensoriels ont une localisation purement périphérique : seules les projections centrales entrent dans la moelle pour atteindre les neurones sensoriels de second ordre qui projettent à leur tour vers les centres nerveux supérieurs.

2. Les afférences primaires

Le corps cellulaire des neurones sensoriels envoie des projections en direction de la moelle qui y pénètrent par la racine dorsale du nerf spinal. Il existe plusieurs types de fibres, organisées en contingents, qui véhiculent des informations de modalités spécifiques provenant des organes sensoriels. Par souci de simplicité, les différents systèmes de projection qui forment les voies

sensorielles ascendantes ne seront pas abordés et je me restreindrai à l'entrée des afférences primaires au niveau d'un segment médullaire.

Les fibres Ia et Ib sont de gros axones fortement myélinisés. Elles possèdent une vitesse de conduction très rapide (70 à 120 m/s). Les fibres Ia relaient les informations proprioceptives du fuseau neuro-musculaire et les fibres Ib celles de l'organe tendineux de Golgi. Elles entrent dans la moelle et se placent au niveau des cordons dorsaux avant d'abandonner des collatérales dans les couches intermédiaires IV/VII et les couches VIII/IX où elles contactent les MN et participent au réflexe myotatique.

Les fibres AB sont des fibres myélinisées à conduction rapide (30 à 70 m/s) qui véhiculent les informations tactiles extéroceptives (touché, vibration). Elles pénètrent dans la moelle dans le cordon dorso-latéral et font synapses dans les noyau propres de la corne dorsale (III/IV) où les informations proprioceptives et extéroceptives convergent.

Les fibres A δ sont faiblement myéliniques (30 à 50 m/s) et les fibres C sont amyéliniques (0,5 m/s). Elles véhiculent les informations provenant des terminaisons libres de type extéroceptives non discriminatives, thermiques et nociceptives. Elles entrent dans la moelle par le faisceau dorso-latéral et abandonnent principalement des collatérales dans les couches superficielles (I/II) mais aussi dans d'autres régions impliquées dans la nociception comme l'aire autonome centrale (X) et la couche V.

III. Les cellules de Schwann et la gaine de myéline

Les cellules gliales du SNP peuvent être spécifiques ou non d'un type neuronal ou d'une localisation particulière. Leur rôle initial de "glue interneuronale" a fait place à une diversité de fonctions essentielles au fonctionnement du système nerveux et des organes des sens.

Les corps cellulaires des neurones des ganglions rachidiens, sympathiques et parasympathiques sont entourés de petites cellules gliales connues sous le nom de cellules satellites. Les axones, quant à eux, sont associés à des CS myéliniques ou amyéliniques. Les terminaisons nerveuses de la jonction neuromusculaire sont recouvertes par la CS terminale alors que les terminaisons entériques sont irrégulièrement associées à des processus émanant des CS amyéliniques. Au niveau des terminaisons sensorielles de la peau, ces mêmes cellules contribuent à l'organisation des organes sensoriels comme c'est le cas pour les corpuscules de Pacini.

L'intégration réalisée par notre système nerveux nécessite une conduction rapide des impulsions nerveuses. Cette spécialisation s'est faite au cours du développement grâce aux cellules myélinisantes, créant une gaine isolante autour de l'axone, responsable de la propagation des potentiels d'action sur les noeuds de Ranvier (Stoffel and Bosio, 1997). La dépolarisation membranaire n'a lieu qu'en ces points discontinus, base anatomique de la conduction rapide "saltatoire" (Ritchie and Rogart, 1977). Ce chapitre présente les mécanismes qui gouvernent la différenciation des cellules de Schwann et la mise en place de la gaine de myéline, l'une des membranes les plus étudiées en biologie.

A. Origine des cellules de Schwann et gliogenèse

Les CS progénitrices migrent depuis la crête neurale en direction antérieure (Fig. 1). Trois stades de développement sont décrits: les CS progénitrices passent par le stade de CS immatures avant d'entamer leur différenciation terminale en CS myéliniques ou amyéliniques (également appelée cellule de Remack). Cette cascade de différenciation dépend de signaux de survie, de signaux mitogènes et de signaux de différenciation. L'axone, un partenaire indissociable de la CS, joue un rôle déterminant dans le développement et la différenciation de ces cellules.

1. Marqueurs de la lignée gliale et réversibilité phénotypique

L'établissement de marqueurs précis de chacun des stades de développement des cellules de Schwann progénitrices a permis de mieux comprendre leur devenir. Cinq groupes de marqueurs moléculaires ont été proposés (Fig. 5) : (I.) les marqueurs présents à tous les stades ; (II.) les marqueurs des cellules de la crête neurale et des cellules de Schwann progénitrices ; (III.) les marqueurs des cellules de Schwann progénitrices ; (IV.) les marqueurs des cellules de Schwann progénitrices et CS immatures ; (V.) et finalement les marqueurs des CS immatures (Jessen and Mirsky, 2005).

Bien que la différenciation terminale et la sortie du cycle cellulaire aient déjà eu lieu dans les CS myéliniques et amyéliniques matures, certaines de ces étapes sont réversibles et la CS peut changer de phénotype. Pour illustration, après une lésion nerveuse, les CS matures se dé-différencient et prennent un phénotype de CS immatures (Chen et al., 2007). *In vitro*, les CS progénitrices et les CS immatures peuvent être différenciées en d'autres dérivés de la crête neurale (Dupin et al., 2003).

2. Molécules contrôlant la gliogenèse dans la crête neurale

La mise en place de la crête neurale lors de la neurulation est gouvernée par un double système d'induction : l'un selon l'axe médio-latéral et l'autre selon l'axe dorso-ventral. L'expression précoce de

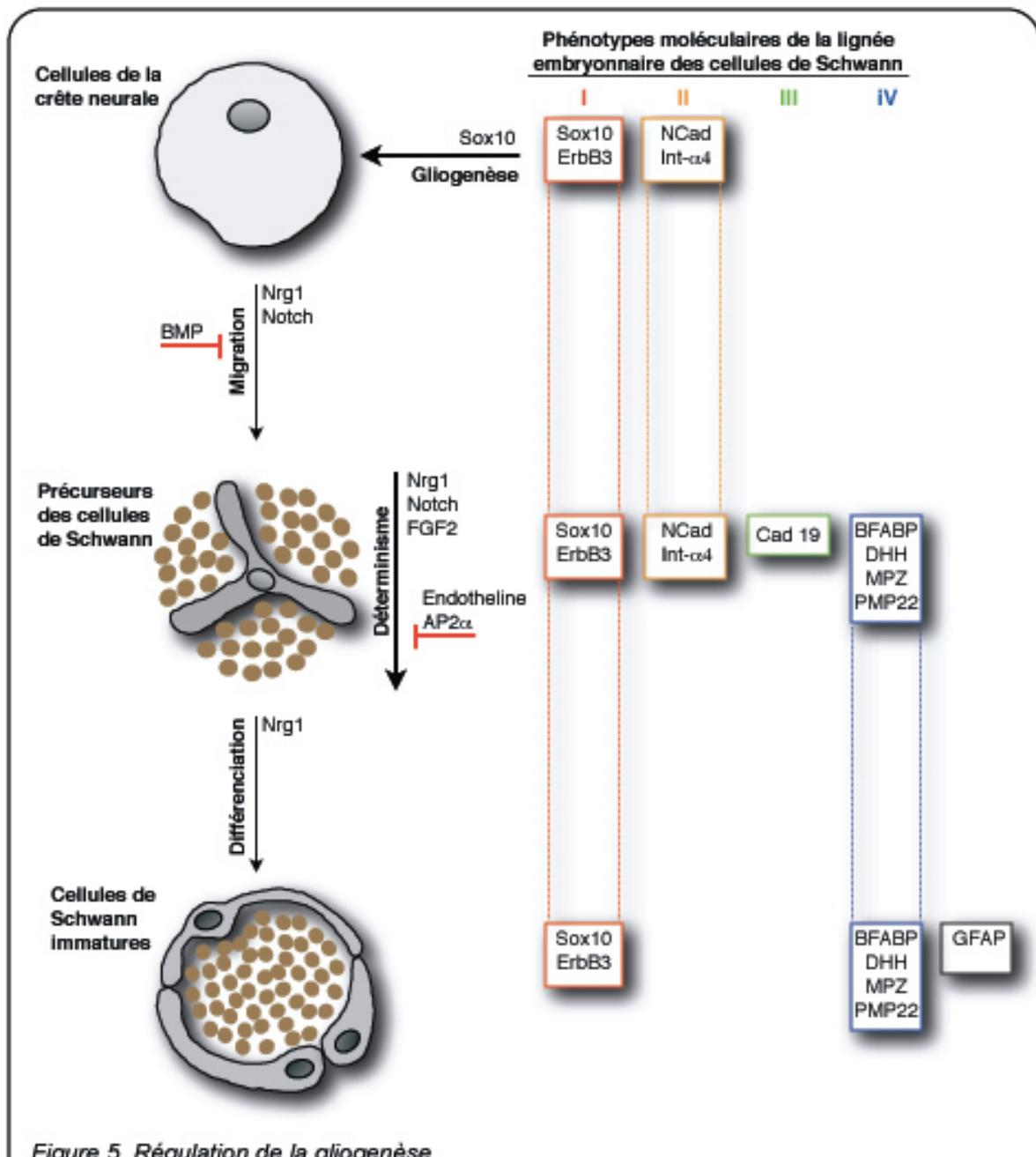


Figure 5. Régulation de la gliogenèse.

Au cours de la neurulation l'expression de SOX10 initie la migration des cellules de la crête neurale. Au cours de leur migration, la régulation croisée de différents signaux paracrines oriente ces cellules vers un destin de précurseur de cellules de Schwann. La différenciation des précurseurs en cellules de Schwann immatures fait principalement intervenir la voie des neurégulines. A droite sont représentés les groupes de marqueurs qui permettent l'identification du stade de développement (Jessen and Mirsky, 2005).

SOX10, facteur de transcription SRY box-10 ; BMP, protéine morphogénique osseuse ; Nrg1, neurégulines de type 1 ; FGF2, facteur de croissance des fibroblastes 2 ; AP2 α , protéine activatrice 2 α ; NCad, cadhérine neuronale ; Int- α 4, intégrine α 4 ; Cad19, cadhérine 19 ; MPZ, protéine de la myéline zéro ; PMP22, protéine de la myéline périphérique 22kDa ; GFAP, protéine fibrillaire acide de la myéline ; BFABP, protéine du cerveau se liant aux acides gras ; DHH, desert hedgehog.

BMP (bone morphogenic protein) selon un gradient medio-latéral détermine les limites latérales du tube neural antérieur. Une fois ces limites établies, un gradient de molécules “posteriorisantes” comme Wnt induit la transformation de la partie postérieure de la plaque neurale en cellules de la crête neurale (Aybar and Mayor, 2002). Ces molécules polarisantes stimulent l’expression du facteur de transcription SOX10 dans toutes les cellules migrantes de la crête neurale. Puis il s’inactive dans les progéniteurs neuronaux alors qu’il reste exprimé dans la glie périphérique en développement. L’analyse des souris invalidées pour ce gène confirme que cette protéine est nécessaire à la spécification gliale, alors que son absence ne perturbe pas le développement neuronal (Britsch et al., 2001).

Le contrôle de la gliogenèse fait également intervenir des signaux paracrines: une des voies de communication les plus étudiées entre la CS et l’axone est la liaison des Neurégulines 1 axonales (Nrg1 de type III en particulier) à leur complexe de récepteurs gliaux ErbB3-ErbB2. Nrg1 stimule la gliogenèse dans la crête neurale et permet la migration et la survie des CS précurseurs (Jessen and Mirsky, 2005). D’autres études montrent également que les Nrg1 ont un rôle important dans la différenciation terminale des CS : le niveau d’expression de Nrg1 de type III module la myélinisation des cellules de Schwann immatures en les orientant vers un phénotype myélinique (forte concentration de Nrg1) ou amyélinique (faible concentration de Nrg1) et permet aussi le maintien de la gaine de myéline (Nave and Salzer, 2006).

D’autres facteurs régulent la gliogenèse: Notch a un rôle semblable aux Nrg1 alors que BMP-2 et -4 freinent la migration et la différenciation des cellules de la crête neurale (Jessen and Mirsky, 2005).

3.Déterminisme des cellules de Schwann immatures

Chez les rongeurs, les précurseurs des CS se différencient en CS immatures quelques jours avant la naissance. Ce phénomène est concomitant à l’apparition de la structure tissulaire du nerf adulte, c’est à dire à la mise en place de sa vascularisation et au développement de la matrice extracellulaire.

Parmi les nombreuses molécules impliquées dans cette différenciation phénotypique, Nrg1, FGF2 et Notch stimulent la différenciation des précurseurs gliaux en CS immatures. Le facteur de transcription AP2 α (activator protein 2 α) et l’endothéline inhibent cette transition. A ce stade la CS immature assure sa propre survie grâce à la sécrétion autocrine de facteurs trophiques comme l’IGF, NT3, LIF et PDGF β , mais aussi grâce à ses interactions avec les laminines dans la lame basale (Nave and Salzer, 2006).

B.La gaine de myéline et sa formation

La gaine de myéline est une membrane complexe qui fait intervenir de nombreuses protéines. Certaines sont impliquées dans l'organisation structurale de la gaine de myéline, d'autres sont spécifiques au dialogue entre neurone et CS ou permettent l'interaction avec l'environnement extracellulaire. Le chapitre qui suit présente de manière détaillée l'organisation topographique de la gaine de myéline et les étapes qui conduisent à la myélinisation.

1. Organisation de la gaine de myéline

La gaine de myéline est organisée en domaines fonctionnels responsables de la propagation saltatoire du potentiel d'action et de l'interaction entre l'axone et les CS. On distingue les régions nodale, paranodale, juxtaparanodale et internodale (Fig. 6).

1. La région nodale

La région nodale marque une interruption périodique, courte, de la gaine de myéline. A cet endroit, la CS entre en contact avec l'axolemme par l'intermédiaire de ses microvillosités, un des constituants de la myéline non compacte. Une lame basale continue recouvre ces éléments et limite l'espace périnodal. L'axolemme nodal est enrichi en canaux sodiques sensibles au voltage (Nav). Leur densité ($>1200/\mu\text{m}^2$) permet d'entretenir le potentiel d'action lors de la conduction saltatoire (Waxman and Ritchie, 1993). Chez l'adulte, les canaux Nav1.6 sont les plus représentés au noeud de Ranvier (Arroyo and Scherer, 2000). Les sous-unités β de ces mêmes canaux possèdent un domaine immunoglobuline qui permet des interactions homophiles avec des molécules d'adhésion cellulaire (CAM) de la superfamille des immunoglobulines comme la NrCAM et la neurofascine-186 (Nf186) (Ratcliffe et al., 2001). Ce complexe est connecté au cytosquelette axonal grâce à l'ankyrine G, une protéine adaptatrice, et à la spectrine- β IV, une protéine de liaison au filament d'actine, et permet de stabiliser la région nodale (Poliak and Peles, 2003).

2. La région paranodale

De part et d'autre de la région nodale s'étend une courte zone dite paranodale. Elle constitue le site majeur d'interactions entre la myéline compacte, prenant ici la forme de boucles (boucles paranodales), et l'axone. Ces jonctions étroites entre l'axone et la cellule gliale sont assurées par trois molécules. La membrane axonale est enrichie en protéines membranaires de type I permettant l'interaction cellule-cellule comme la contactine et la protéine associée à la contactine (Caspr, contactin-associated protein ou paranodine). Ces deux protéines interagissent en *cis* et forment un complexe capable de s'associer en *trans* avec la Nf155, une protéine membranaire de type I des boucles paranodales des CS, interprétée comme le récepteur glial de la contactine (Charles et al.,

2002). Fonctionnellement, ces molécules sont impliquées dans la stabilisation des liens cellule-cellule et dans la communication intercellulaire. Ainsi, on peut voir la région paranodale comme une zone d'attachement fort entre la gaine de myéline et l'axone qui isole l'activité électrique aux noeuds de Ranvier et évite la diffusion latérale des protéines membranaires (notamment des canaux Nav nodaux et des canaux potassiques de la région juxtaparanodale) (Poliak and Peles, 2003).

3. La spécialisation juxtaparanodale

En s'éloignant encore de la région nodale on trouve la région juxtaparanodale. Dans cette courte zone, l'axolemmes est enrichi en canaux potassiques à rectification retardée qui ont des cinétiques d'activation et d'inactivation lentes, contribuant à la repolarisation membranaire suite à un potentiel d'action (Wang et al., 1993). Ces canaux K⁺ forment un complexe avec un membre de la famille Caspr qui s'associe en *cis* ou en *trans* avec d'autres CAM (Tag-1). La densité élevée de canaux K⁺ contribue au maintien du potentiel de repos et semble avoir un rôle protecteur lors de situations de démyélinisation modérée (Poliak and Peles, 2003). La membrane adaxonale de la CS est perforée de pores constitués de connexine 29 (Cx29), formant une synapse électrique axone-glie, ouverte au flux de K⁺. En plus de constituer une voie de communication rapide entre ces deux types cellulaires, ce système permet également de tamponner les ions K⁺ (Baker, 2002).

4. L'internode

L'internode ne présente pas de jonctions particulières entre la membrane adaxonale de la CS et l'axolemmes. Cette zone est constituée en majorité de myéline compacte, formée par l'intrication étroite de feuillettes de membrane plasmique entre eux.

- *La myéline compacte*. Elle est principalement composée de lipides (cholestérol et sphingolipides) et d'une faible proportion de protéines qui permettent la cohésion des feuillettes entre eux.

PMP22 (peripheral myelin protein 22 KDa) est une petite protéine membranaire qui forme des multimères. Elle intervient dans la myélinisation, le maintien de la myéline (Adlkofer et al., 1995) et dans le recyclage de la membrane plasmique (Chies et al., 2003). PMP22 interagit avec MPZ (myelin protein zero, aussi appelée P0), une autre protéine de la myéline compacte (D'Urso et al., 1999) et la modification du ratio PMP22/MPZ est suffisante pour déstabiliser la myéline (Suter and Scherer, 2003).

MPZ est la protéine la plus abondante de la myéline. Cette protéine transmembranaire de type I possède un domaine immunoglobuline du côté extracellulaire qui permet son association homophile en tétramères grâce à des interactions en *cis* ou en *trans* avec le feuillette adjacent (Shapiro et al., 1996). De cette manière MPZ permet la compaction et la stabilisation de la myéline (Martini et al., 1995)

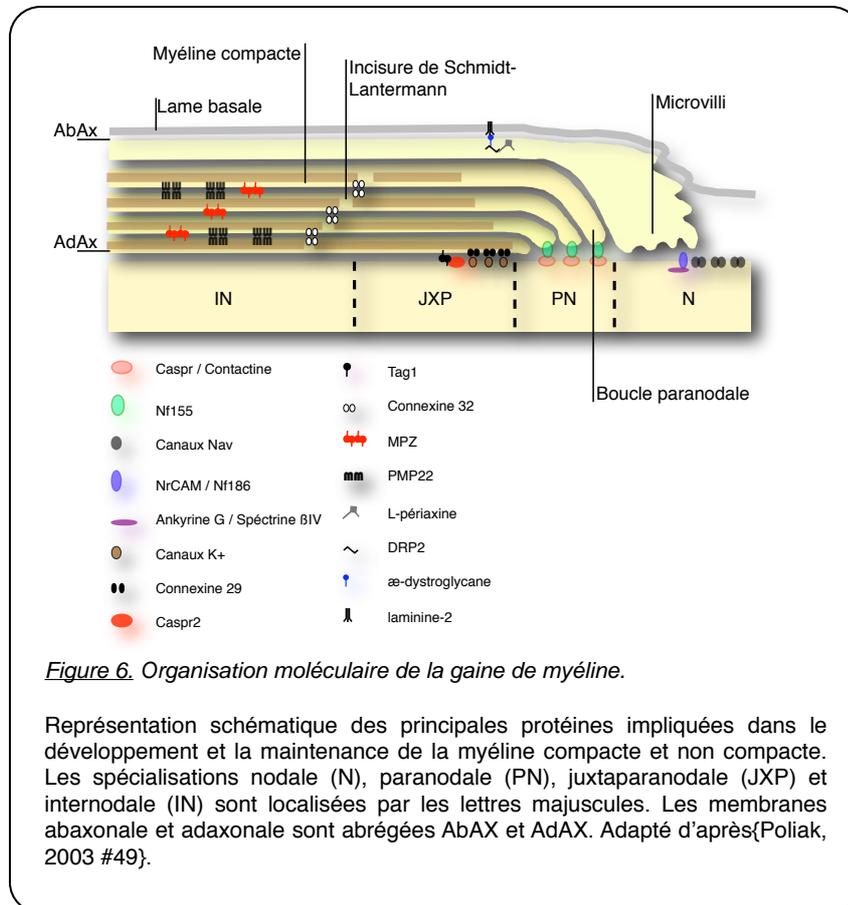


Figure 6. Organisation moléculaire de la gaine de myéline.

Représentation schématique des principales protéines impliquées dans le développement et la maintenance de la myéline compacte et non compacte. Les spécialisations nodale (N), paranodale (PN), juxtaparanodale (JXP) et internodale (IN) sont localisées par les lettres majuscules. Les membranes abaxonale et adaxonale sont abrégées AbAX et AdAX. Adapté d'après (Poliak, 2003 #49).

- *La myéline non-compacte*. L'internode est traversé par un canal de myéline non compacte qui permet la diffusion radiale de molécules entre différents feuillettes au travers de pores formés par la Cx32. Ce canal connecte les couches adaxonale et abaxonale (Suter and Scherer, 2003) et est connu sous le nom d'incisure de Schmidt-Lanterman.

Des canaux de myéline non compacte s'étalent longitudinalement sur la face externe de la CS pour former les bandes de Cajal. Elles sont séparées les unes des autres par l'interposition du complexe périaxine-DRP2(dystrophin related protein 2)-dystroglycane qui intervient dans la liaison entre la membrane externe de la CS et la laminine-2 de la lame basale (Sherman and Brophy, 2005). Ce complexe est vu comme le récepteur du bacille de la lèpre qui facilite l'infection des CS (Rambukkana et al., 1998).

2.Mécanismes d'engainage de l'axone

L'établissement de la gaine de myéline fait suite à la sélection des axones à myéliniser, phénomène concomitant des premiers contacts entre l'axone et la CS. L'extension des prolongements des CS permet à la gaine de myéline de croître, il s'en suit la mise en place des spécialisations précédemment évoquées.

1.Sélection des axones et initiation des premiers contacts

Le diamètre de l'axone est un facteur important dans l'initiation de la myélinisation : la taille seuil d' $1\mu\text{m}$ de diamètre oriente la CS immature vers un phénotype myélinique. Les mécanismes qui permettent l'intégration de ce paramètre ne sont pas clairement identifiés mais plusieurs hypothèses sont proposées : l'intervention de molécules d'adhésion cellulaire, les interactions avec la lame basale, les facteurs de croissance ou encore les neurégulines.

L'axone non myélinique exprime des NCAM (neural cell adhesion molecule) qui sont réprimées lors de la myélinisation, suggérant que l'interaction intercellulaire pourrait jouer un rôle dans ce phénomène (Sherman and Brophy, 2005).

La présence de laminines, de dystroglycan et de récepteurs aux intégrines sur la membrane des CS leurs permettent d'interagir avec la lame basale, aboutissant à la défasciculation des axones à myéliniser (Feltri and Wrabetz, 2005).

Récemment le NGF a lui aussi été présenté comme un régulateur de la myélinisation (Chan et al., 2004). Son effet indirect passe par sa liaison aux récepteurs TrkA de l'axone qui permet l'activation de voies de signalisation convergeant vers le noyau (Sherman and Brophy, 2005). En réponse, le neurone exprime des molécules à destination des CS et module la myélinisation de manière juxtacrine et paracrine : les neurégulines (Nave and Salzer, 2006) et des petits médiateurs se liant aux

récepteurs purinergiques (Stevens et al., 2002) pourraient être de bons candidats à cette signalisation.

2. Croissance des prolongements de la myéline

Les lipides de la myéline, en particulier le cholestérol et les galactolipides, sont adressés à la membrane en croissance sous forme de radeaux lipidiques. L'acheminement des protéines de la myéline est associé à une synthèse protéique locale (comme pour la protéine basique de la myéline, MBP) et fait intervenir le transport microtubulaire d'ARN messagers. Les forces responsables de l'élongation de la membranes sont générées par l'interaction entre les microfilaments d'actine et les myosines et sont régulées par des phosphorylations dépendantes de la Rho kinase (Sherman and Brophy, 2005).

3. Premiers contacts et formation des noeuds de Ranvier

Les premiers contacts entre les CS et l'axone s'établissent au niveau des paranodes grâce à l'interaction de protéines neuronales (Caspr et contactine) et gliales (Nf155). Les protéines nodales (Nf186, ankyrine-G, NrCAM et la spectrine-βIV) sont exprimées au même moment et conduisent au regroupement des canaux Na⁺ sensibles au voltage. La formation des noeuds et l'engainage de l'axone sont indissociables: l'environnement paranodal agit comme un chasse neige qui rassemble les constituants nodaux nécessaires à l'agrégation des canaux Na⁺. La Nf186 et le NrCAM pourraient avoir un rôle dans la nucléation des regroupements (Lustig et al., 2001).

4. Régulation de l'épaisseur et allongement de la myéline

- *Régulation de l'épaisseur de la myéline.* Outre ses fonctions dans le développement des CS, l'interaction juxtacrine entre les Nrg1 de type III et leurs récepteurs à tyrosine kinase ErbB module l'épaisseur de la myéline. L'invalidation de ErbB3 (Riethmacher et al., 1997) conduit à une déficience en CS, celle de ErbB2 (Garratt et al., 2000) ou de Nrg1-III (Michailov et al., 2004) à une hypomyélinisation. Les facteurs de croissance peuvent également réguler l'épaisseur de la myéline : la liaison de BDNF au récepteur p75NTR augmente l'épaisseur de la gaine (Tolwani et al., 2004).

- *Allongement de la gaine de myéline.* L'élongation des internodes dépend des bandes de Cajal qui permettent la diffusion latérale des constituants nécessaires à la croissance longitudinale de la myéline. La perturbation du complexe périaxine-DRP2-dystroglycane qui limite ces bandes conduit à un déficit d'élongation de la myéline (Court et al., 2004).

3. Protéines des cellules de Schwann et pathologies associées

Un certain nombre de mutations ou de situations pathologiques (métabolique, iatrogène, infectieuse, immunitaire, ...) affectent le bon fonctionnement de protéines des CS ou de la myéline. Elles sont à l'origine de pathologies des nerfs périphériques, le tableau 2 fournit une liste non exhaustive de protéines impliquées dans la pathogénie de neuropathies périphériques et les syndromes qui y sont associés. Des informations complémentaires relatives à ce sujet pourront être trouvées dans la publication n°1.

Protéine	Modification	Maladie associée
PMP22	Mutation	CMT
	Délétion	CMT HNPP
	Auto-anticorps	Syndrome de Guillain-Barré
MPZ	Mutation	CMT Syndrome de Dejerin-Sottas Neuropathie congénitale hypomyélinisante
	Auto-anticorps	Syndrome de Guillain-Barré
Cx32	Mutation	CMT
Périaxine	Mutation	CMT
Krox20 (facteur de transcription des gènes de la myéline)	Mutation	CMT Syndrome de Dejerin-Sottas Neuropathie congénitale hypomyélinisante
MBP / MAG	Auto-anticorps	Syndrome de Guillain-Barré
α -dystroglycane	?	Cible nerveuse de la lèpre

Tableau 2: Protéines de la myéline et neuropathies périphériques.

Neuropathies périphériques les plus fréquentes liées à des protéines de la cellule de Schwann et de la myéline. On y retrouve des neuropathies héréditaires comme les CMT, le syndrome de Dejerin-Sottas, les neuropathies congénitales hypomyélinisantes et les neuropathies héréditaires avec hypersensibilité à la pression (HNPP). La présence d'auto-anticorps dirigés contre des protéines de la myéline semble à l'origine des neuropathies dys-immunitaires comme le syndrome de Guillain-Barré. Le complexe L-périaxine-DRP2- α DG constitue la porte d'entrée du bacille de la lèpre pour l'infection des cellules de Schwann, événement initiateur de cette neuropathie infectieuse.

IV. Pathologies des nerfs périphériques : compression, chimiothérapie et diabète

La perturbation de la fonction ou de la structure d'un nerf périphérique associée à sa dégénérescence plus ou moins importante donne lieu à des pathologies regroupées sous le terme de neuropathies périphériques. Leur étiologie est extrêmement diverse; d'origine héréditaire (syndrome de Charcot-Marie-Tooth), métabolique (diabète, alcool, carences), infectieuse (VIH, hépatites, Lyme, lèpre), iatrogène et toxique (*cis*-platine, antimétabolique, thalidomide, acrylamide), immunitaire (syndrome de Guillain-Barré) ou encore néoplastique. Leur expression clinique peut prendre plusieurs formes : aiguë ou chronique, symétrique ou asymétrique, démyélinisante ou axonale (Pereon et al., 2003).

Elles sont regroupées en quatre principaux types anatomocliniques : (i) les mononeuropathies correspondent à l'atteinte isolée d'un nerf, elles sont le plus souvent d'origine traumatique ou mécanique; (ii) les mononeuropathies multiples (ou multinévrites) correspondent à l'atteinte simultanée de plusieurs troncs nerveux et sont liées à des affections souvent systémiques sans mécanismes univoques ; (iii) les polynévrites sont caractérisées par des troubles symétriques à prédominance distale habituellement d'origine neuronale ou dégénérative ; (iiii) les polyradiculonévrites présentent des troubles neurologiques qui s'étendent de la racine à l'extrémité des nerfs et sont souvent d'origine inflammatoire ou néoplastique (Cambier et al., 2004).

Ce chapitre présente les modèles animaux des neuropathies périphériques qui ont fait l'objet d'une analyse détaillée lors de ce travail de thèse : la compression du nerf sciatique, les neuropathies induites par le *cis*-platine et les complications neurologiques du diabète. La compression transitoire du nerf sciatique modélise, au moins partiellement, certaines neuropathies humaines d'origine mécanique. Ce paradigme expérimental fournit une situation propice à l'étude des mécanismes fondamentaux de la dégénérescence et de la régénération nerveuse. Ensuite je présenterai successivement les modèles utilisés pour étudier les neuropathies induites par un traitement chronique au *cis*-platine et le modèle murin de neuropathies diabétiques induit par la streptozotocine. Des informations complémentaires d'ordre clinique et physiopathologique pourront être trouvées dans la publication n°1 de ce manuscrit.

A. La compression nerveuse transitoire

Chez l'homme, les lésions des troncs nerveux périphériques sont le plus souvent d'origine mécanique. Elles sont la conséquence d'un traumatisme (fracture, luxation), de compression liée à l'anesthésie, à une injection médicamenteuse, à un plâtre mais résultent aussi de situations de la vie courante

comme la compression osseuse suite au maintien prolongé dans une position défavorable, à des traumatismes professionnels ou lors de syndromes canaux. Les conséquences fonctionnelles varient en fonction de l'intensité et de la durée de la compression, elles sont en général réversibles.

La compression transitoire de la partie moyenne du nerf sciatique de souris ne modélise que très partiellement ces pathologies humaines. Néanmoins, elle est massivement utilisée pour étudier les processus de dégénérescence et régénération nerveuse, la réponse adaptative du système nerveux, l'apoptose neuronale chez les animaux nouveaux nés, les douleurs neuropathiques, les processus de dénervation-réinnervation musculaire et pour le criblage de composés pro-régénératifs.

1. Modifications comportementales

La compression transitoire du nerf sciatique induit une mononeuropathie sensori-motrice qui s'accompagne de perturbation de la locomotion et de phénomènes douloureux. L'analyse de la démarche grâce à l'indice de fonctionnalité du nerf sciatique (IFS) ou par d'autres méthodes (cinématique, analyse des traces de pas, coordination, ...) montre que ce type de dommages provoque une altération massive de la démarche dès la lésion. La récupération fonctionnelle prend 6 à 8 semaines (Varejao et al., 2003).

La douleur induite dans ce modèle s'exprime par des comportements douloureux spontanés ou par des réponses inappropriées à des stimuli mécaniques ou thermiques. Dans le cas de compression transitoire inférieure à la minute, les comportements douloureux spontanés tels que la prostration, le "grooming", l'autotomie et le léchage des pattes sont plus modérés. Des modèles expérimentaux plus pertinents ont été développés pour étudier les douleurs neurogènes. Citons à titre d'exemple les modèles de constriction chronique (modèle de Bennett) et de ligature partielle du nerf sciatique (modèle de Seltzer) (Wang and Wang, 2003). Même si la constriction aiguë n'est pas intensivement utilisée dans les études relatives à la douleur, elle s'accompagne d'une allodynie et d'une hyperalgésie transitoire en réponse à des stimulations de modalités variées (mécanique, chaleur et froid) (Decosterd and Woolf, 2000) mais aussi d'une hypersensibilité tactile durable qui s'installe progressivement (Decosterd et al., 2002).

2. Changements structuraux et électrophysiologiques

La compression nerveuse s'accompagne d'une dégénérescence axonale modérée et transitoire. L'analyse morphométrique d'un nerf lésé révèle une diminution de la densité des fibres nerveuses : la distribution bimodale classique se décale vers la population d'axones à faible diamètre et à gaine de myéline plus fine (Azzouz et al., 1996). Puis fait suite une phase de régénération nerveuse associée à une augmentation du nombre de fibres. Cinq mois après la compression, les axones de gros diamètre fortement myélinisés sont toujours déficitaires (Wolthers et al., 2005).

L'examen électrophysiologique de souris ayant subi une compression nerveuse transitoire révèle une diminution massive du potentiel d'action composé musculaire (CMAP) dès les premiers jours après lésion. Son amplitude reste faible durant 2 à 3 semaines puis la ré-innervation progressive du muscle s'accompagne d'une lente normalisation des CMAP, toujours inférieurs aux valeurs normales 5 semaines après la lésion (Azzouz et al., 1996). L'électromyographie réalisée sur de tels muscles met en évidence l'apparition d'activités électriques spontanées, signature de dénervation musculaire : dès le 3^{ème} jour post-lésion des potentiels de fibrillation et des fasciculations apparaissent, le retour progressif à un tracé plat coïncide avec la normalisation des CMAP (Azzouz et al., 1996). La récupération des muscles distaux est plus lente, les caractéristiques électrophysiologiques sont toujours altérées 100 jours après la compression (Kennedy and Zochodne, 2000; Wolthers et al., 2005).

3. Réponse cellulaire

La compression nerveuse s'accompagne d'une dégénérescence modérée des fibres nerveuses en aval du site de lésion mais aussi de modifications touchant les autres éléments de l'unité motrice.

- *Conséquences sur les neurones sensoriels et moteur.* Chez les animaux nouveau-nés, ce modèle est intensément utilisé dans l'étude de l'apoptose des neurones moteurs spinaux, des interneurones et des neurones sensoriels des ganglions rachidiens (Lowrie et al., 1994; Lawson and Lowrie, 1998; Lowrie and Lawson, 2000). Si la même lésion est pratiquée sur des animaux adultes, les neurones spinaux sont résistants à l'apoptose observée chez les jeunes animaux. Les mécanismes qui sous-tendent cette différence développementale constituent un déficit dans l'étude de l'apoptose neuronale et seront discutée plus-tard. Au niveau des ganglions rachidiens la situation est différente ; les neurones sensoriels entrent en apoptose, phénomène suivi d'une neurogenèse compensatrice (Groves et al., 2003; Sorensen et al., 2003).

- *Elimination des débris myéliniques.* La dégénérescence axonale active les CS et permet la phagocytose précoce des débris myéliniques. A partir de 2 jours, les macrophages endoneuraux et migrants contribuent à l'élimination des résidus myéliniques par opsonisation, ce phénomène se poursuit au moins sur 2 semaines (Stoll and Muller, 1999).

- *Réponse des cellules de Schwann.* Les CS myéliniques se différencient, prolifèrent activement dans le tronc distal à la lésion et atteignent un pic d'activité mitotique 3-4 jours après la compression (Atanasoski et al., 2001). Elles fourniront à l'axone un guide physique pour la repousse axonale et contribuent à la régénération en délivrant des facteurs trophiques et des signaux de guidage au cône de croissance. Cette vague de prolifération, comme nous le verrons plus-tard, est strictement

dépendante de la CnD1 (Atanasoski et al., 2001). La répression du proto-oncogène Ski (Atanasoski et al., 2004) stimule l'expression de gènes de la myéline tels que PMP22, MPZ et PRX (périaxine) et permet la rémyélinisation par les CS ayant acquis un phénotype immature. Quelques publications décrivent une mort par apoptose des CS au-cours de la première semaine qui suit la lésion. Une seconde vague d'apoptose, cette fois indiscutable, a lieu 3 semaines après la compression. Elle implique la liaison du NGF à son récepteur à basse affinité p75NTR (Ferri and Bisby, 1999) et l'activation de la voie des céramides (Hirata et al., 2001). Ce mécanisme permet l'élimination des CS surnuméraires et le rétablissement du ratio 1:1 entre l'axone et la CS.

- *Modifications de la plaque motrice.* L'analyse du muscle tibial antérieur indique que la majorité des plaques motrices est déinnervée dès la première semaine. Dans un délais de 3 semaines les jonctions neuromusculaires sont reconnectées, mais à ce stade les plaques motrices sont poly-innervées. Cet excès d'innervation est accompagné d'une sur-représentation des CS périphériques et terminales. L'innervation classique des jonctions neuromusculaires associant une plaque motrice à un axone, encapsulée par une unique CS terminale prend environ 6 semaines (Magill et al., 2007).

D.Neuropathie induite par le *cis*-platine

La neurotoxicité périphérique est un effet secondaire limitant des chimiothérapies anticancéreuses basées sur l'usage d'analogues du platine, d'agents dirigés contre le système microtubulaire (taxol, vincristine) ou encore de thalidomide. La sévérité des neuropathies induites dépend de la dose cumulée administrée et de l'agent utilisé. Leur incidence est estimée autour de 50% (Cata et al., 2006) et elle prennent le plus souvent la forme de polyneuropathies sensorielles axonales, progressivement démyélinisantes.

1.Neuropathie au *cis*-platine chez l'homme

L'incidence des neuropathies au *cis*-platine est de l'ordre de 47% mais cette estimation n'inclue pas les cas infracliniques (Screnci and McKeage, 1999). La neurotoxicité de ce composé apparaît à une dose cumulée de 300mg/m² (Quasthoff and Hartung, 2002). Après l'arrêt du traitement la récupération est lente et incomplète. Les symptômes sont principalement sensoriels et s'expriment par une ototoxicité, des paresthésies, une ataxie (liée aux perturbations du système proprioceptif) et des déficits de perception sensorielle notamment dans la discrimination des vibrations. La sévérité des paresthésies peut aller jusqu'à des douleurs intenses. A l'examen électrophysiologique, cette neuropathie est accompagnée d'une diminution de la vitesse de conduction nerveuse et de l'amplitude du potentiel d'action des nerfs sensoriels. Ces paramètres reflètent une perte axonale associée à une démyélinisation, confirmées par l'analyse de biopsies nerveuses (Krarup-Hansen et al., 1993).

2. Modèles murins des neuropathies au *cis*-platine

Le traitement chronique de *cis*-platine administré à des souris pendant plusieurs semaines induit une neuropathie proche de celle observée chez l'homme. Les doses cumulées utilisées sont comprises entre 20 et 60 mg/kg. La durée du traitement varie en fonction de la souche utilisée, elle est souvent comprise entre 1 à 2 mois. La toxicité du *cis*-platine induit une diminution significative de poids parfois associée à de l'alopécie.

1. Neuropathie expérimentale au *cis*-platine

2 à 3 semaines après le début du traitement apparaît une hyperalgésie associée à une allodynie mécanique et thermique (Tredici et al., 1999; Authier et al., 2003; Ozturk et al., 2005). La principale modification électrophysiologique observée est une diminution de la vitesse de conduction des nerfs sensoriels (SNCV) (Tredici et al., 1999; ter Laak et al., 2000; Ozturk et al., 2005) parfois associée à un retard du réflexe H, l'équivalent électrique du réflexe mono-synaptique d'étirement (Gao et al., 1995).

D'un point de vue histologique, le *cis*-platine induit une diminution du diamètre des gros axones myélinisés (Tredici et al., 1999; Authier et al., 2003) alors que la gaine de myéline reste préservée et la dégénérescence axonale est rare. Puis la distribution des fibres se décale vers les axones de petit diamètre traduisant une axonopathie modérée et des CS apoptotiques sont alors détectables (Ozturk et al., 2005).

Au niveau des ganglions rachidiens, les observations diffèrent selon les traitements. De nombreux groupes ont décrit une réduction de la taille du corps cellulaire des neurones sensoriels, du noyau et du nucléole sans mort cellulaire associée (Tredici et al., 1999). Dans des conditions expérimentales avec un traitement plus intense les neurones des ganglions sensoriels meurent par apoptose suite à leur reprise du cycle cellulaire (Adlkofer et al., 1995; Gill and Windebank, 1998).

2. Neurotoxicité du *cis*-platine

Si les mécanismes conduisant à la neurotoxicité du *cis*-platine ne sont pas totalement élucidés, la biodistribution des dérivés platinés et leur haute affinité pour les ganglions rachidiens expliquent l'atteinte sélective des neurones sensoriels : le *cis*-platine ne traverse pas la barrière hémocéphalique mais s'accumule dans les ganglions sensoriels. En se liant préférentiellement à l'ADN des neurones sensoriels primaires, il induit leur apoptose d'une manière dose-dépendante (McDonald

et al., 2005; Ta et al., 2006). Les voies apoptotiques empruntées impliquent la redistribution de Bax, un gène pro-apoptotique, et le relargage de cytochrome C (McDonald and Windebank, 2002).

D'autres hypothèses ont été suggérées pour expliquer les effets délétères du *cis*-platine sur les neurones: un effet direct sur l'excitabilité neuronale (Scott et al., 1995) mais aussi la perturbation du transport axonal (Russell et al., 1995).

Les cellules gliales interviennent également dans la physiopathologie de cette neuropathie. Comme évoqué précédemment, une proportion de CS meurt par apoptose (Ozturk et al., 2005). De plus, un traitement au *cis*-platine diminue le niveau des facteurs trophiques (LIF, GGF2, NGF et NT-3) indispensables à la prolifération et à la survie de ces cellules : le traitement avec l'un de ces facteurs est suffisant pour améliorer l'état neuropathique des souris (Tredici et al., 1999; ter Laak et al., 2000; Pradat et al., 2002; Ozturk et al., 2005).

Les limitations des modèles animaux de neuropathies au *cis*-platine proviennent principalement de la variabilité des résultats liée à la souche utilisée, au protocole de traitement et à la fourchette restreinte entre la dose injectée et la dose maximale tolérée. Malgré ces réserves, les modèles expérimentaux utilisés reflètent assez bien les troubles observés chez l'homme.

C. Les neuropathies diabétiques

Avec une prévalence de 5,1%, le diabète est l'une des principales maladies des pays industrialisés. En 2003, 194 millions de patients diabétiques ont été recensés et d'après les projections démographiques, on estime à 333 millions le nombre de personnes atteintes en 2025 (prévalence de 6,3%, www.eatlas.idf.org) (Boyle et al., 2001).

Les neuropathies sont une des complications les plus communes du diabète, leur prévalence moyenne est de 30% mais ce chiffre dépend de la durée du diabète (8% au moment du diagnostic et 50% après 25 ans de diabète) (Pirart, 1978; Pambianco et al., 2006). De par leur fréquence et leur sévérité, elles font partie des pathologies du SNP les plus étudiées (Simmons and Feldman, 2002).

1. Les neuropathies diabétiques chez l'homme et physiopathologie

- *Tableau clinique.* Les neuropathies diabétiques sont hétérogènes, elles sont divisées en neuropathies sensori-motrices et neuropathies végétatives. Les troubles sensori-moteurs s'expriment sous forme d'une polyneuropathie sensitive distale symétrique ou d'une polynévrite sensori-motrice (Cambier et al., 2004).

Les polyneuropathies sensitives distales regroupent 75% des formes cliniques de neuropathies diabétiques (Perkins and Brill, 2003). Elles sont principalement associées à des paresthésies, hypoesthésies et des douleurs distales. Dans les formes les plus sévères, toutes les modalités sensorielles sont altérées mais la sensibilité tactile et la proprioception peuvent être préservées au niveau proximal.

L'examen électrophysiologique révèle une diminution de l'amplitude des potentiels d'actions des nerfs sensoriels et de la vitesse de conduction nerveuse associées à une dégénérescence axonale distale et à une démyélinisation segmentaire (Karsidag et al., 2005).

D'un point de vue histologique on retrouve une perte d'axones par dégénérescence Wallerienne, une démyélinisation segmentaire, la prolifération de CS, la présence de bulbes d'oignons et une hypovascularisation. Les fibres nerveuses dégèrent de manière rétrograde (Said et al., 1992; Said, 1995; Malik et al., 2001).

- *Physiopathologie*. Les neuropathies diabétiques sont multifactorielles et mettent en jeu des facteurs métaboliques et vasculaires. L'hyperglycémie provoque une augmentation de l'activité enzymatique de l'aldose réductase, une augmentation consécutive de sorbitol et de fructose, une déplétion en taurine et myoinositol et un déséquilibre des nicotinamides. En découle une auto-oxydation du glucose qui génère des radicaux libres. La glycation non-enzymatique excessive des protéines produit des agrégats et contribue à la mort cellulaire en association avec l'altération du neurotrophisme, l'activation de la PKC, la production excessive de NO et de prostanoides en conséquence de l'hypovascularisation endoneurale (Sima and Sugimoto, 1999).

2. Modèle murin de diabète de type I induit par la streptozotocine

Le modèle le plus communément utilisé est l'induction d'un diabète de type I par injection unique de streptozotocine (STZ) chez le rat ou la souris. La STZ induit une destruction partielle des cellules β des îlots de Langerhans.

Les animaux traités de cette manière ne présentent pas de signes moteurs mais les troubles sensoriels apparaissent précocement (Al Deeb et al., 2000; Pradat, 2003). L'évaluation de la fonction des fibres A δ et C par les tests de retrait de la queue ou de la plaque chauffante révèlent une légère hyperalgésie 2 semaines après installation du diabète qui évolue progressivement vers une hypoalgésie (Apfel et al., 1994; Kolta et al., 1996). Ces modifications sont sous-tendues par des mécanismes pro-nociceptifs au niveau des ganglions rachidiens (Uehara et al., 2004) mais aussi par des modulations des voies sensorielles spinales (Saredi et al., 2005).

L'évaluation de l'état neuropathique par électrophysiologie indique une diminution de la vitesse de conduction nerveuse (sensorielle et motrice) dès 2 à 4 semaines après induction du diabète. De manière surprenante, à ce stade, les altérations électrophysiologiques ne corrèlent pas avec les rares

modifications structurales observées : aux temps précoces, la dégénérescence axonale n'est pas clairement démontrée (Walker et al., 1999).

Après un mois de diabète, l'analyse de prélèvements nerveux révèle des modifications métaboliques et fonctionnelles importantes : augmentation de métabolites (sorbitol, fructose et myo-inositol), diminution de l'activité de la Na⁺K⁺ATPase et du flux sanguin, modification du contenu en neurotrophines et altération du transport axona (Lee et al., 2001; Pop-Busui et al., 2002; Sayers et al., 2003). Ces données suggèrent que les modifications de vitesse de conduction sont la conséquence des dysfonctionnements métaboliques et fonctionnels plutôt que la résultante d'anomalies structurales.

Après deux mois de diabète, les études morphométriques mettent en évidence des anomalies structurales : diminution de la surface des grosses fibres myélinisées et du nombre de fibres de gros diamètre responsable du décalage de la distribution bimodale classique vers une population unique (Qiang et al., 1998; Gerbi et al., 1999). L'analyse des fibres nerveuses par la technique de fibres isolées indique une structure anormale de la gaine de myéline, une démyélinisation paranodale et de la dégénérescence Wallérienne (Kato et al., 2000). D'autres études morphométriques indiquent une dystrophie neuro-axonale (Schmidt et al., 2004), une diminution de l'innervation de l'épiderme (Christianson et al., 2003) et une mort des neurones sensoriels par apoptose dépendante de la caspase-3 (Russell et al., 1999).

Le réponse des CS au cours des neuropathies diabétiques est mixte. Une partie des CS prolifère activement (Almhanna et al., 2002) alors que d'autres CS entrent en apoptose (Delaney et al., 2001; Vincent et al., 2002). La perturbation de la physiologie des CS pourrait expliquer les déficits régénératifs observés dans les modèles animaux (Tantuwaya et al., 1997; Kennedy and Zochodne, 2000) et chez les patients atteints de neuropathie diabétique (Kennedy and Zochodne, 2005).

Pour plus d'informations, d'autres modèles de diabète (de type I et II) sont discutés dans la publication n°1.

III. Cycline D1 dans le système nerveux

Avant d'envisager le rôle de la CnD1 dans deux configurations radicalement opposées et les mécanismes moléculaires communs entre la division cellulaire et l'apoptose, des rappels sur la machinerie du cycle cellulaire s'imposent. Ce chapitre présente les liens et divergences entre ces deux phénomènes, illustrés par la confrontation des données obtenues sur des cellules mitotiques comme les CS et à celles issues de cellules post-mitotiques, en particulier le neurone.

A. Cycle cellulaire et cycline D1

Le contrôle du nombre de cellules est un phénomène essentiel au cours du développement, de la croissance, de la réparation tissulaire et du vieillissement normal ou pathologique. Le contrôle de cette "biomasse cellulaire" implique une régulation fine de l'état de différenciation, de la mort et de la division cellulaire. L'entrée dans le cycle cellulaire dépend de signaux mitogènes qui stimulent l'expression des régulateurs de la transition entre la phase G1 et la phase S et engagent la cellule vers la mitose.

1. Les phases du cycle cellulaire

Une cellule ne peut se diviser sans s'y préparer. L'obtention de deux cellules filles "normales" implique que la cellule mère augmente sa taille, duplique sa quantité d'ADN et prépare la division afin de distribuer son contenu génétique de manière équivalente. Cette séquence événementielle constitue les phases du cycle cellulaire (Fig. 7).

La cellule quiescente (G0) possède des senseurs de signaux mitogènes qui la sortent de son repos pour l'engager vers une étape de croissance, première phase du cycle cellulaire (G1). Si les signaux mitogènes comme certains facteurs du sérum sont retirés suffisamment tôt, la cellule retourne à un état quiescent. Passé un certain point, même en absence de signaux mitogènes, la cellule continuera sa progression à travers les phases S, G2 et M. Ce point de non retour marque la scission entre la phase G1 et la phase de synthèse d'ADN (S) et a été baptisé point de restriction (Pardee, 1974). Après avoir atteint une taille suffisante et synthétisé la machinerie protéique nécessaire, la cellule entre en phase S et réplique son matériel génétique (2n). Après duplication, la cellule entre en phase G2 puis vérifie le bon déroulement de la synthèse d'ADN au point de contrôle G2-M (Minshull et al., 1994). La cellule entre alors en phase de mitose (M) dont l'objectif est la séparation chromosomique à l'identique pour obtenir deux cellules équivalentes. Un dernier point de contrôle existe à la fin de cette phase. Le but des trois points de contrôle est de vérifier le bon déroulement de chaque phase et éventuellement de stopper leur évolution. Cette pause transitoire laisse le temps à des mécanismes de réparation d'avoir lieu, et, dans le cas de dommages trop sévères, d'engager la cellule vers une mort "suicide" (Hartwell and Weinert, 1989).

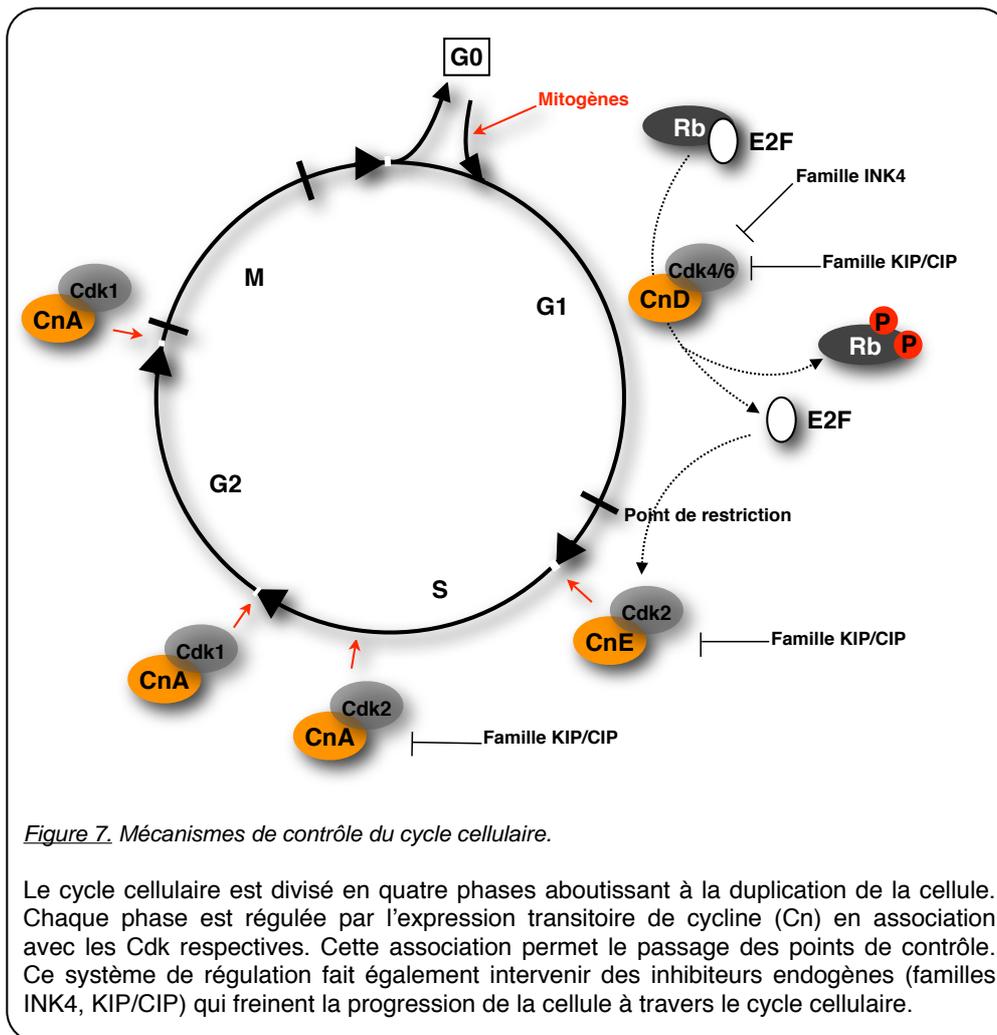


Figure 7. Mécanismes de contrôle du cycle cellulaire.

Le cycle cellulaire est divisé en quatre phases aboutissant à la duplication de la cellule. Chaque phase est régulée par l'expression transitoire de cycline (Cn) en association avec les Cdk respectives. Cette association permet le passage des points de contrôle. Ce système de régulation fait également intervenir des inhibiteurs endogènes (familles INK4, KIP/CIP) qui freinent la progression de la cellule à travers le cycle cellulaire.

2. Le contrôle du cycle cellulaire par les complexes cycline/Cdk

A la fin des années 60, le laboratoire de Leland Hartwell isola chez la levure un groupe de gènes contrôlant le cycle cellulaire: les gènes *cdc* (cell division cycle). Quelques années plus tard, Paul Nurse et son équipe identifièrent le gène *cdc2* chez l'homme aujourd'hui appelé Cdk1 (cyclin-dépendant kinase 1) pour son activité kinase dépendante des cyclines. Puis Timothy Hunt mit en évidence une protéine dont l'accumulation oscillait pendant les phases du cycle cellulaire, justement appelée cycline. Les travaux de ces trois laboratoires ont été récompensés en 2001 par l'attribution du prix Nobel puisqu'ils découvraient les mécanismes fondamentaux du contrôle de la division cellulaire. Ce système se base sur la formation de complexes cycline/Cdk (Pines and Hunter, 1994; Sherr, 1994), capables de phosphoryler des cibles spécifiques de chaque phase sur des résidus sérine et thréonine. L'évolution des complexes cycline/Cdk au cours du cycle et quant à elle contrôlée par différents modes de régulation (Sanchez and Dynlacht, 2005) qui font l'objet de ce chapitre.

1. Les complexes cycline/Cdk au cours du cycle cellulaire

- *Evolution des complexes cycline/Cdk.* En réponse à un signal mitogène, les CnD (D1, D2 et D3) sont synthétisées. Elles s'associent aux Cdk de type 4 et 6 pour former un complexe actif en phase G1 précoce (Matsushime et al., 1991; Lukas et al., 1996). En milieu de phase G1, la CnE est induite, s'associe à la Cdk2, complexe qui permet l'entrée en phase S (Ohtsubo et al., 1995). Au moment de la synthèse d'ADN, la cycline A apparaît et interagit avec la Cdk2 puis avec la Cdk1 (transition S-G2) (Pagano et al., 1992). L'initiation de la phase M n'a lieu qu'après assemblage du facteur promouvant la mitose (MPF) composé de la cycline B et de la *cdc2*.

- *Régulation des kinases dépendantes des cyclines.* Les stratégies de régulation des Cdk sont principalement le contrôle de leur activité par l'état de phosphorylation (Sherr and Roberts, 1995), les inhibiteurs de Cdk (CKI) et l'abondance des cyclines. Les CKI inhibent l'activité kinase et bloquent la progression du cycle (Hunter and Pines, 1994). Deux familles ont été identifiées, les membres de la famille KIP/CIP (p21, p27, p57) sont des inhibiteurs à spectre large des Cdk2/4/6 (LaBaer, Garrett et al. 1997), et la famille INK (p16, p15, p19, p18) s'associe spécifiquement sur les Cdk4/6 en phase précoce de G1 (Serrano et al., 1993), comme l'illustre la figure 7. La dégradation des cyclines de la phase G1 et des cyclines mitotiques (A/B) est assurée par le système ubiquitine-protéasome (Diehl et al., 1997).

2. La cycline D1

Contrairement aux autres cyclines, la CnD1 est décrite comme un capteur intracellulaire de signaux mitogènes. A ce titre elle est l'élément limitant de la progression du cycle cellulaire en phase G1.

- *Mécanisme d'action de la CnD1*. La CnD1 est capable d'interagir avec les Cdk4, 5 et 6 mais s'associe préférentiellement à la Cdk4 (Matsushime et al., 1992) par le motif conservé "cyclin box". Dans sa région N-terminale, elle contient un domaine Leu-X-Cys-Glu qui lui permet d'interagir avec le produit du gène de susceptibilité au rétinoblastome (Dowdy et al., 1993), Rb, substrat du complexe CnD1/Cdk4. La phosphorylation de Rb aboutit au relarguage des facteurs de transcription de la famille E2F permettant l'expression des gènes responsables de la synthèse d'ADN (Dyson, 1998). Ce modèle, dit de "dé-répression d'E2F", est illustré dans la figure 8.

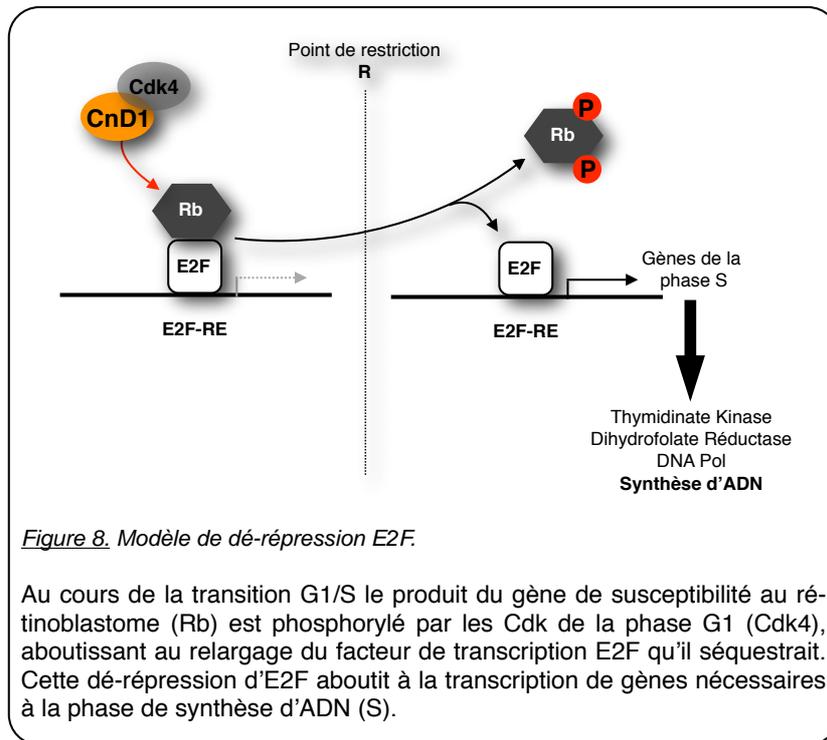
- *Régulation de la CnD1*. L'expression de la CnD1 est contrôlée par une boucle d'autorégulation qui dépend de la protéine Rb. Le promoteur de la CnD1 possède un élément de réponse à E2F (Muller et al., 1994) et la CnD1 agirait dans un premier temps comme un régulateur positif de son expression en activant Rb par l'intermédiaire de la Cdk4. Puis l'apparition de formes hyperphosphorylées de Rb participerait à sa répression en fin de G1. Les mécanismes de régulation les plus puissants sont post-traductionnels et impliquent une dégradation par des protéases, en particulier sur un site PEST (Pro-Glu-Ser-Thr) situé dans sa région C-terminale (Rechsteiner and Rogers, 1996).

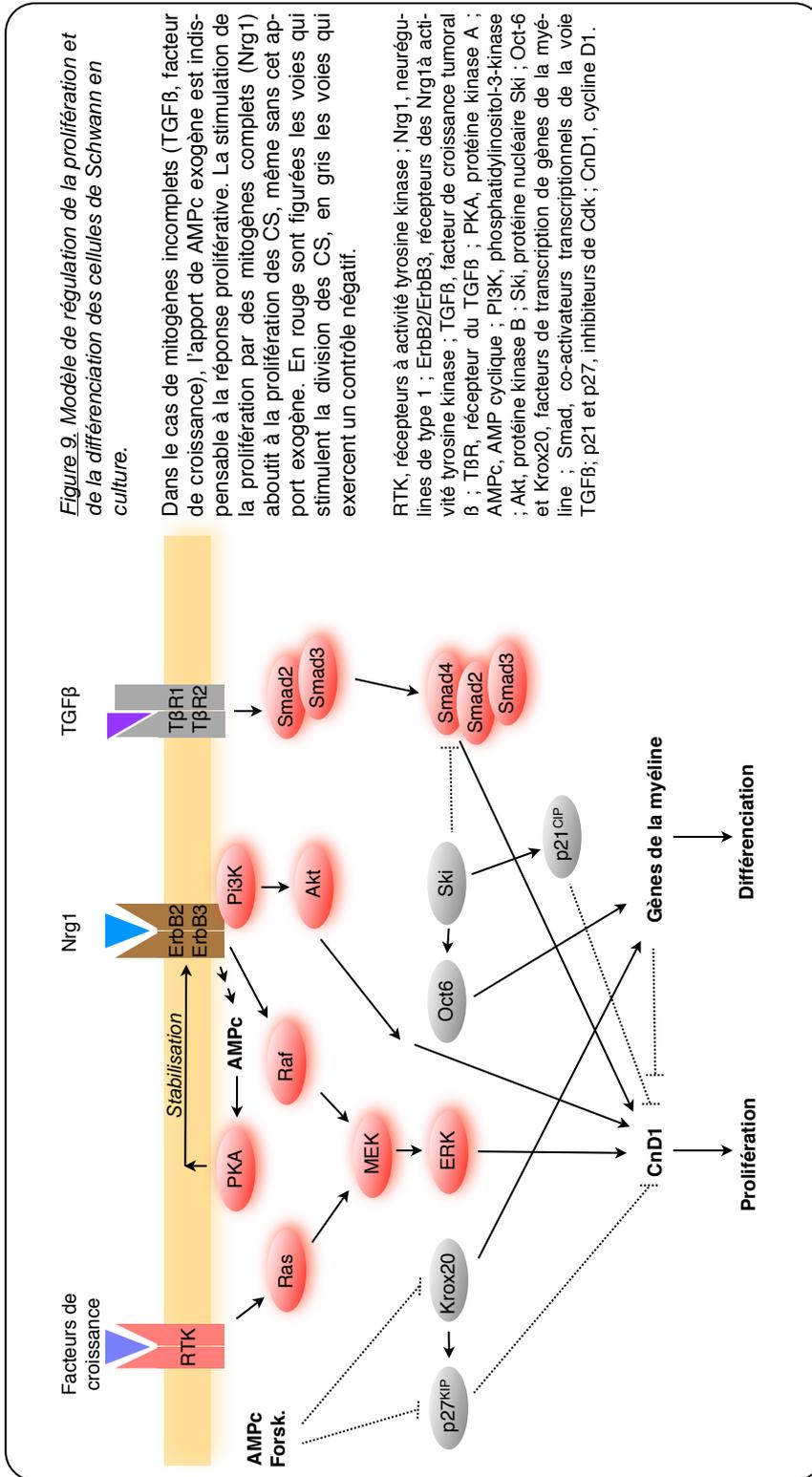
3.Prolifération des cellules de Schwann

A la différence du SNC, le SNP est doué de régénération. Cette caractéristique réside en partie dans les propriétés des CS. Après lésion, les CS et les macrophages phagocytent les débris de myéline contribuant ainsi à la dégénérescence Wallérienne. S'en suivent plusieurs cycles de réplication qui conduisent à la formation d'un tube qui fournit le support et les signaux nécessaires à la survie et au guidage des axones vers leur cible originelle. La compréhension des mécanismes fondamentaux qui contrôlent la croissance et la différenciation des CS pourraient avoir des retombées importantes dans le domaine de la reconstruction nerveuse et dans le traitement des neuropathies périphériques.

1.Prolifération des cellules de Schwann *in vitro*

Même dans des modèles simplifiés, les mécanismes qui contrôlent la prolifération des CS ne sont que partiellement compris et parfois contradictoires. La variabilité des protocoles utilisés en culture primaire (âges de animaux, utilisation de sérum ou non, ...) est en grande partie responsable du manque de consensus à ce sujet, une tentative de synthèse est présentée dans la figure 9.





- *Les mitogènes incomplets.* Contrairement à la plupart des cellules, la stimulation avec du sérum n'est pas suffisante pour induire la prolifération des CS. Le sérum et les facteurs de croissance (bFGF, IGF, GGF, PDGF) sont considérés comme des mitogènes "incomplets". En revanche, si le sérum ou l'un de ces facteurs de croissance est administré en même temps qu'un apport d'AMPc exogène (ou qu'un traitement à la forskoline, un activateur de l'adénylate cyclase), les CS prolifèrent activement. La PKA (protéine kinase A) pourrait être impliquée dans le déblocage de la prolifération (Kim et al., 2001) mais les données actuelles ne permettent pas de trancher clairement (Iacovelli et al., 2007).

- *Nrg1, un mitogène complet.* Contrairement aux facteurs de croissance, la Nrg1 est un mitogène "complet". En présence de sérum et sans apport exogène d'AMPc la Nrg1 provoque la prolifération des CS. Le co-traitement avec la Nrg1 et la forskoline induit une prolifération massive des CS, ces deux voies agissent de manière synergique même si le sérum est retiré du milieu de culture (Iacovelli et al., 2007). En se fixant sur ses récepteurs ErbB3, la Nrg1 provoque la trans-phosphorylation de ErbB2, l'activation des voies Pi3K/Akt et Erk qui aboutissent à la prolifération des CS (Maurel and Salzer, 2000; Iacovelli et al., 2007). La voie Erk a des rôles différents selon le type cellulaire, ici elle stimule la prolifération par stabilisation de la CnD1 associée à la diminution de l'inhibiteur de Cdk p27^{KIP} (Iacovelli et al., 2007).

- *Régulation de la prolifération et de la différenciation.* Le sérum seul stimule l'expression de la CnD1 mais son action est inhibée par un niveau constitutif élevé de p27^{KIP} et de Krox-20 (Arthur-Farraj et al., 2006; Iacovelli et al., 2007). Krox-20 est un facteur de transcription à doigts de zinc qui contribue au verrouillage de l'état différencié et à l'arrêt du cycle en stimulant l'expression des gènes de la myéline et de p27^{KIP} (Arthur-Farraj et al., 2006). La forskoline permet la progression en G1 par diminution de Krox-20 et de p27^{KIP}. L'effet synergique entre les Nrg1 et la forskoline est sous tendu par la stabilisation des récepteurs ErbB2 et l'activation de la Pi3K, tous deux médiés par le AMPc (Iacovelli et al., 2007).

Le proto-oncogène Ski a un rôle pivot dans le contrôle de la prolifération et de la différenciation des CS. Il est capable de réprimer la prolifération induite par le TGFβ d'au moins deux manières. Il interagit avec les facteurs Smad et empêche la transcription de ses gènes cibles par des effets sur les enzymes de remodelage de la chromatine (histone-désacétylases et histone-acétyltransférases). De plus, la surexpression de Ski induit une augmentation de p21^{Cip}, un autre inhibiteur de Cdk. Ski ne se contente pas de bloquer la prolifération; il active également Oct-6, le deuxième facteur de transcription responsable de la synthèse des gènes de la myéline (Atanasoski et al., 2004).

- *CnD1 et prolifération des CS.* En culture, l'expression des CnD1 et CnD2 corrèle parfaitement avec la prolifération des CS induite par la forskoline et le PDGF ou par la Nrg1. La mise en culture de CS issues de souris invalidées pour l'un ou l'autre de ces gènes a permis de montrer que seule la CnD1

est nécessaire à leur prolifération *in vitro* (Kim et al., 2000). En condition proliférative, la CnD1 est présente dans le noyau, confortant les données établies sur de nombreuses lignées cellulaires. Suite à l'arrêt de la prolifération par retrait des signaux mitogènes, la CnD1 est localisée en région périnucléaire (Atanasoski et al., 2001). Conjointement, la localisation périnucléaire de la CnD1 et la présence d'inhibiteurs de Cdk contribuent à bloquer le cycle cellulaire en condition quiescente.

2. Prolifération des cellules de Schwann *in vivo*

- *La cycline D1 au cours du développement.* L'analyse de souris invalidées pour la CnD1 révèle que l'absence de cette protéine n'affecte pas la croissance des CS embryonnaires ni la myélinisation des nerfs (Kim et al., 2000). Au moment du développement, l'expression de la CnD1 est restreinte à l'espace périnucléaire, indiquant qu'elle n'est pas fonctionnelle (Atanasoski et al., 2001).

- *Cycline D1 et prolifération des cellules de Schwann matures en conditions pathologiques (Fig. 10).* Dans le nerf intact de souris adultes, la CnD1 est localisée dans l'espace périnucléaire des CS myéliniques (Fig. 10). Les CS amyéliniques matures sont, elles, totalement dépourvues de CnD1 (Atanasoski et al., 2001). Chez les souris invalidées pour la CnD1, la prolifération des CS après compression nerveuse est totalement abolie. Ce phénomène n'est pas compensé par le sauvetage génétique par la CnE, une cycline aux fonctions très similaires. Ces données montrent que la prolifération des CS adultes après dégénérescence Wallérienne est strictement dépendante de la CnD1 (Kim et al., 2000) et de sa translocation nucléaire (Atanasoski et al., 2001). L'analyse des modèles animaux de CMT1-A, une neuropathie démyélinisante associée à la présence de bulbes d'oignons (structures constituées de CS surnuméraires), a confirmé que l'expression de la CnD1 et sa translocation nucléaire sont indispensables à la prolifération de CS mature en condition pathologique (Atanasoski et al., 2002). Cette neuropathie présente une dégénérescence axonale tardive, fournissant un paradigme expérimental de neuropathie périphérique différent de la dégénérescence Wallérienne.

D. Hypothèse d'un lien entre cycle cellulaire et apoptose

Le cycle cellulaire et l'apoptose sont deux mécanismes extrêmement conservés chez les eukaryotes. Bien que leurs retombées soient radicalement différentes, des liens clairs existent entre ces deux processus (Evan et al., 1995). D'un point de vu morphologique, l'apoptose et la mitose sont des processus actifs qui s'accompagnent de rétrécissement cellulaire, de condensation chromatinienne, de boursofflures membranaires et de perte de contact cellulaire. De plus, ils ont des acteurs moléculaires communs comme Rb, E2F et p53. Les différences ne sont pas tant dans leurs mécanismes initiateurs mais plutôt dans les voies effectrices finales et leur conséquences :

ségrégation chromosomique et cytotdiérèse équitable dans un cas, fragmentation oligonucléosomale et phagocytose des corps apoptotiques dans l'autre cas.

1.L'entrée en apoptose des neurones post-mitotiques: une tentative avortée d'initier le cycle cellulaire

Au cours du développement embryonnaire, les cellules neuro-épithéliales du tube neural prolifèrent intensément durant la neurogénèse puis quittent irréversiblement le cycle cellulaire lors de leur différenciation terminale. Le neurone entre dans une phase de quiescence associée à un verrouillage du cycle cellulaire qui maintient l'état post-mitotique du neurone différencié et bloque toute division. Il en ressort le modèle théorique selon lequel l'activation des gènes du cycle constitue une tentative avortée de mitose qui génère une signalisation conflictuelle pour le neurone et aboutit à l'apoptose (Fig. 11).

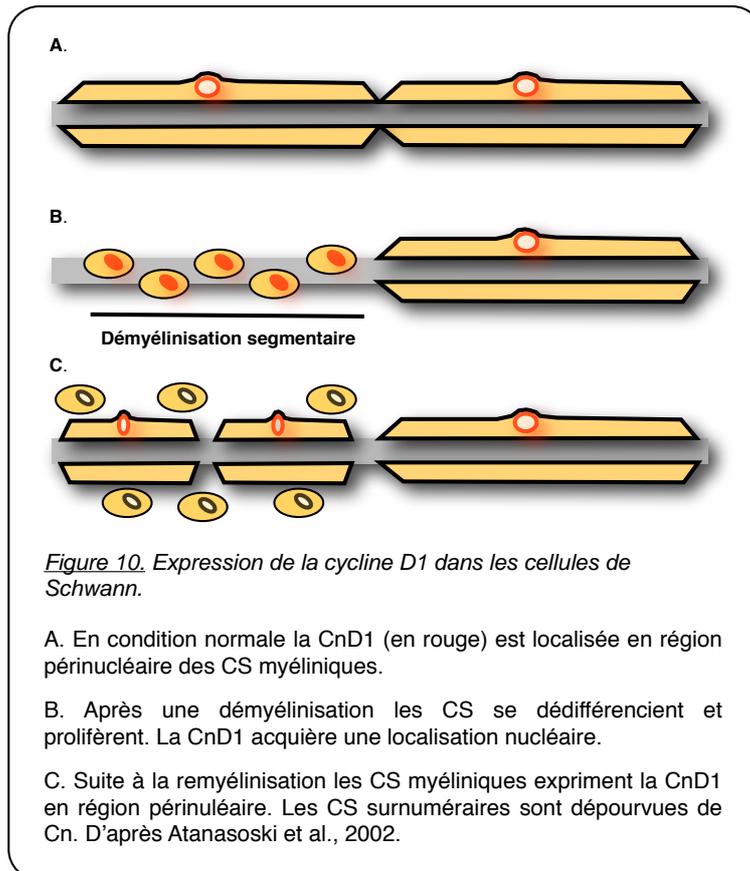
De nombreuses études prouvent que la machinerie du cycle cellulaire intervient dans la mort neuronale (Krantic et al., 2005). Ce chapitre présente les arguments *in vivo* et *in vitro* qui permettent d'affirmer que les complexes de la phase G1 ont un rôle déterminant dans la décision d'orienter le neurone vers l'apoptose (Liu et al., 2001).

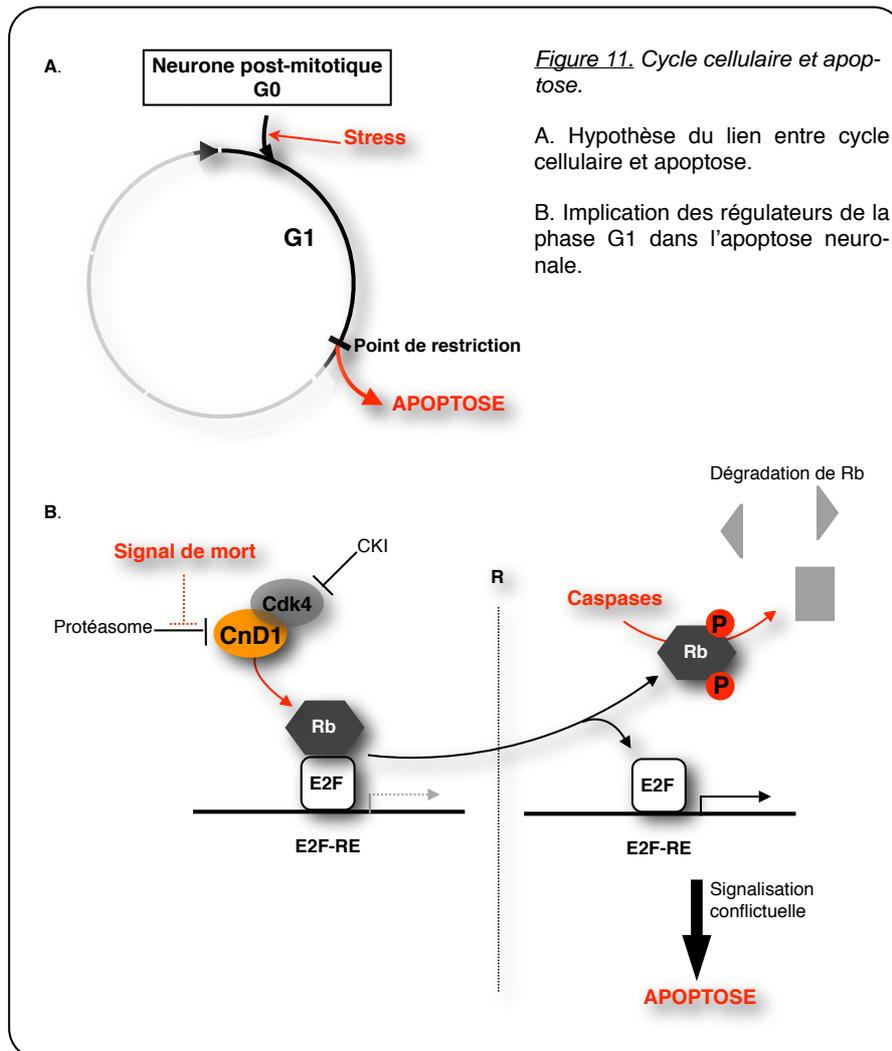
2.Arguments expérimentaux

1.Arguments *in vitro*

Les premières études s'intéressant à cette problématique ont montré une augmentation de la CnD1 lors de l'apoptose induite par retrait du NGF dans des cultures de neurones sympathiques ou de cellules PC12 (Freeman et al., 1994). La sur-expression de la CnD1 par transfection dans une lignée neuronale différenciée N1E-155 suffit à induire l'apoptose (Kranenburg et al., 1996).

Dans des cultures de neurones sensoriels l'apoptose induite par le *cis*-platine est accompagnée d'une augmentation de la CnD1 et de la phosphorylation de Rb (Gill and Windebank, 1998). Des neurones corticaux cultivés en présence de peptide β -amyloïde meurent également suite à la phosphorylation de Rb dépendante de la CnD1 (Giovanni et al., 2000). Les travaux réalisés sur des neurones en grain du cervelet déprivés en K^+ , un autre modèle d'apoptose neuronale, montrent que l'augmentation de CnD1 est principalement liée au dysfonctionnement du système ubiquitine protéasome (Boutillier et al., 1999), mais aussi au clivage de Rb par les caspases, une étape indispensable à l'apoptose (Boutillier et al., 2000). La CnD1 est également induite suite au retrait de sérum dans des cultures de





MN, situation dans laquelle les inhibiteurs de Cdk réduisent le nombre de cellules apoptotiques (Appert-Collin et al., 2006).

La preuve de concept d'un lien entre apoptose et cycle cellulaire provient des stratégies d'inhibition de l'un ou l'autre de ces gènes par utilisation d'antisens, de cultures primaires invalidées ou d'inhibiteurs pharmacologiques des Cdk (olomoucine, roscovitine, flavopiridol) (Giovanni et al., 1999; Appert-Collin et al., 2006; Rashidian et al., 2007) dans de nombreuses situations expérimentales. Le modèle hypothétique qui découle de ces observations est illustré par la figure 11.

2. Arguments *in vivo*

In vivo, les premières évidences de la contribution de la CnD1 dans la mort neuronale datent de la fin des années 90. Les souris Weaver (*wv*) sont générées par mutation du gène GIRK2 (G-protein-activated inwardly rectifying potassium). Elles se caractérisent par une nécrose des neurones dopaminergiques mais également par l'apoptose des neurones de la couche granulaire du cervelet. Chez ces souris *wv*, la diminution d'activité du canal potassique s'accompagne d'une augmentation des CnD1, CnA et Cdk4, associée à l'apoptose des neurones granulaires identifiée par la technique de TUNEL (Migheli et al., 1999).

Dans le modèle d'excitotoxicité induit par injection systémique d'acide kaïnique, l'augmentation de CnD1 dans les neurones de l'amygdale et du cortex piriforme provoque leur l'apoptose (Ino and Chiba, 2001). Ce traitement s'accompagne également de l'accumulation des Cdk4 et Cdk6 et de la phosphorylation de Rb (Park et al., 2000). Contrairement aux modèles *in vitro*, Timsit montre que l'apoptose des neurones des régions amoniques CA1/CA3 après injection intra-hippocampique de kaïnate (un modèle d'épilepsie) ou après ischémie cérébrale est sous-tendue par l'activation transcriptionnelle du gène de la CnD1 (Timsit et al., 1999).

Les modèles animaux d'accident vasculaire-cérébraux confirment ce paradigme établi *in vitro* (Rashidian et al., 2007). Osuga et collaborateurs montrent que l'activation de la voie CnD1/Cdk4 permet de phosphoryler Rb. La dé-répression consécutive d'E2F permet alors l'activation de ses gènes cibles. L'utilisation de Flavopiridol, un inhibiteur de Cdk, réduit l'apoptose et confirme le rôle du complexe Cn/Cdk dans la mort neuronale par apoptose (Osuga et al., 2000). Plus récemment, ces données ont été renforcées par l'utilisation de mutants dominants négatifs de Cdk4 (Rashidian et al., 2005). Ces mécanismes sont associés à une diminution de CKI (p16INK^{4a}) qui amplifie la voie de signalisation des Cdk (Katchanov et al., 2001).

Dans le cadre de maladies neurodégénératives, les régulateurs de la phase G1 sont aussi modifiés. Les patients atteints de la maladie de Parkinson présentent une augmentation de phospho-Rb dans la

substance noire, le cortex frontal et l'hippocampe (Jordan-Sciutto et al., 2003). La dérégulation de ces protéines du cycle est aussi observée dans la substance noire (*pars-compacta*) de rats injectés à la 6-hydroxydopamine, un modèle expérimental de maladie de Parkinson (El-Khodori et al., 2003). La CnD1 est retrouvée dans le cortex temporal de patients atteints de démence de type Alzheimer (Hoozemans et al., 2002).

Le lien entre cycle cellulaire et apoptose s'applique également aux neurones associés au SNP. Après le traitement d'animaux au *cis*-platine, l'équipe de Windebank a mis en évidence une apoptose des neurones des ganglions rachidiens par activation transcriptionnelle de la CnD1 (Fischer et al., 2001). Sakurai et collaborateurs montrent que la vulnérabilité des motoneurones spinaux après ischémie médullaire est liée à une augmentation de la CnD1 et de la Cdk4 chez le lapin (Sakurai et al., 2000). L'altération des régulateurs de la transition G1-S est maintenant confirmée dans la sclérose latérale amyotrophique: les autopsies réalisées sur des patients révèlent une accumulation de CnD1, de phospho-Rb et du facteur de transcription E2F dans les neurones moteurs corticaux et spinaux (Ranganathan and Bowser, 2003). Ces observations ont été vérifiées dans des modèles murins de cette maladie du motoneurone (Nguyen et al., 2003).

MATERIEL & METHODES

MATERIEL & METHODES

A. Animaux et expérimentation animale

Les souris de souche FVB/N utilisées sont élevées dans une animalerie conventionnée selon un cycle nyctéméral 12h/12h où elles ont accès à la nourriture et à l'eau de boisson *ad libitum*. L'élevage et les procédures expérimentales sont en accord avec les lois Européennes en vigueur et réalisées sur des mâles adultes (3 à 4 mois, 30-40g) sous contrôle d'une personne accréditée.

1. Génération des souris transgéniques CnD1-Luc

La lignée transgénique CnD1-Luc a été générée au laboratoire par recombinaison hétérologue. Le vecteur -1745 CnD1-LUC linéarisé par BamH1 a été introduit par microinjection dans le pronucleus mâle d'un ovocyte fécondé, issu de la lignée FVB/N. Le vecteur -1745 CnD1-LUC contient le promoteur humain fonctionnel de la CnD1 (Albanese et al., 1995) qui pilote la séquence codante de la luciférase du ver luisant.

La lignée est maintenue par croisement de mâles homozygotes avec des femelles sauvages. La descendance hétérozygote CnD1-Luc/+ est utilisée pour les manipulations. Les animaux transgéniques sont identifiés par génotypage PCR en utilisant les oligonucléotides suivant:

- sens 5'-TTCCATCTTCCAGGGATACG-3'
- antisens 5'-GTGTTTCGTCTTCGTCCCAGT-3'.

Les paramètres de la réaction de polymérisation sont les suivants : 30 sec à 94°C(dénaturation), 30 sec à 54°C (hybridation), 30 sec à 72°C (élongation) durant 30 cycles.

2. Expérimentation animale

1. Compression du nerf sciatique

Les souris sont anesthésiées par injection intrapéritonéale (i.p.) de xylazine/kétamine (5mg/kg-100mg/kg). Après incision des plans cutanés, le nerf sciatique droit est exposé par écartement délicat des muscles de la cuisse. Les souris subissent une compression du nerf dans sa partie moyenne pendant 30 secondes avec un forceps fin ou non (contrôle opératoire), puis sont immédiatement suturées.

2. Induction des neuropathies au *cis*-platine et carboplatine

Deux injections intra-péritonéales de *cis*-platine à 10mg/kg (NaCl 0,9 %, dose cumulée de 20mg/kg) ou de carboplatine à 40 mg/Kg (Teva®, NaCl 0,9 %, dose cumulée de 80mg/kg) sont étalées sur trois semaines. Les souris contrôles sont injectées avec le solvant seul. A l'issue des trois semaines, des prélèvements de moelle épinière et de nerf sciatique sont effectués pour des dosages d'activité luciférase.

3. Induction du diabète et traitement neuroprotecteur

Le diabète est induit par une injection intra-péritonéale unique de streptozotocine (STZ, Sigma) à 200mg/kg (NaCl 0,9 %) (Akkina et al., 2001). Les souris contrôles sont injectées avec le solvant seul. L'installation du diabète est vérifiée par mesure de la glycémie à l'aide d'un glycomètre électronique.

L'influence de C1 (2,4,4-triméthyl-3-(15-hydroxypentadecyl)-2-cyclohexe-1-one), une molécule à propriétés neuroprotectrices (Gonzalez de Aguilar et al., 2001), sera évaluée sur ce modèle grâce à un traitement chronique. Des injections de C1 à 8 mg/kg (i.p.) sont répétées tous les 3 jours après l'injection de STZ. Ses effets seront évalués au bout d'un mois par luminométrie et électrophysiologie.

3. Prélèvements

Après anesthésie profonde à l'hydrate de chloral (2g/kg), les animaux sont perfusés pendant 10 minutes par voie intra-cardiaque avec du paraformaldéhyde à 4% dans du tampon phosphate 0,1M pH7,4 (PFA). Les tissus prélevés (segment L3-L5 de moelle épinière lombaire, nerfs sciatiques et ganglions rachidiens) sont post-fixés à 4°C durant la nuit puis cryoprotégés pendant 24h dans un mélange de PBS (tampon phosphate salin) et de sucrose à 20% (4°C). Les tissus sont congelés dans un milieu d'enrobage (OCT compound, Dako) par immersion dans de l'isopentane à -40°C avant la découpe au cryostat (coupe de 10-20µm d'épaisseur, transversale pour la moelle épinière et longitudinale pour le nerf sciatique). Les coupes sériées sont récupérées sur lames gélatinées et conservées à -20°C.

Pour les études de biologie moléculaire les souris sont euthanasiées par dislocation cervicale. Les tissus frais sont utilisés immédiatement pour la luminométrie ou congelés à l'azote liquide et conservés à -80°C pour les études par western-blot et transcription inverse semi-quantitative (RT-PCR).

4. Evaluation fonctionnelle

Après observation de l'état général, aucun animal n'a montré de signe d'autotomie ou de prostration intense. L'efficacité de la compression nerveuse a été vérifiée par la présence d'anomalies lors de la

démarche et par les déficits du réflexe d'extension des pattes arrières lorsque la souris est suspendue par la queue.

1. Mesure de la force musculaire

L'évaluation de la force musculaire, mesurée en Newton, se fait par la technique du test d'agrippement. Les souris sont tenues par la queue et la peau du cou puis tirées le long d'une grille connectée à un transducteur de force (Grip-Test, Bioseb) en leur laissant la possibilité de s'y agripper avec les pattes arrières. L'expérience est réalisée deux fois, la première sur la patte arrière lésée et la seconde sur la patte arrière opposée qui sert de contrôle interne. Trois mesures sont successivement enregistrées et la force maximale développée lors du meilleur essai est prise en compte pour l'analyse.

2. Indice de fonctionnalité du nerf sciatique

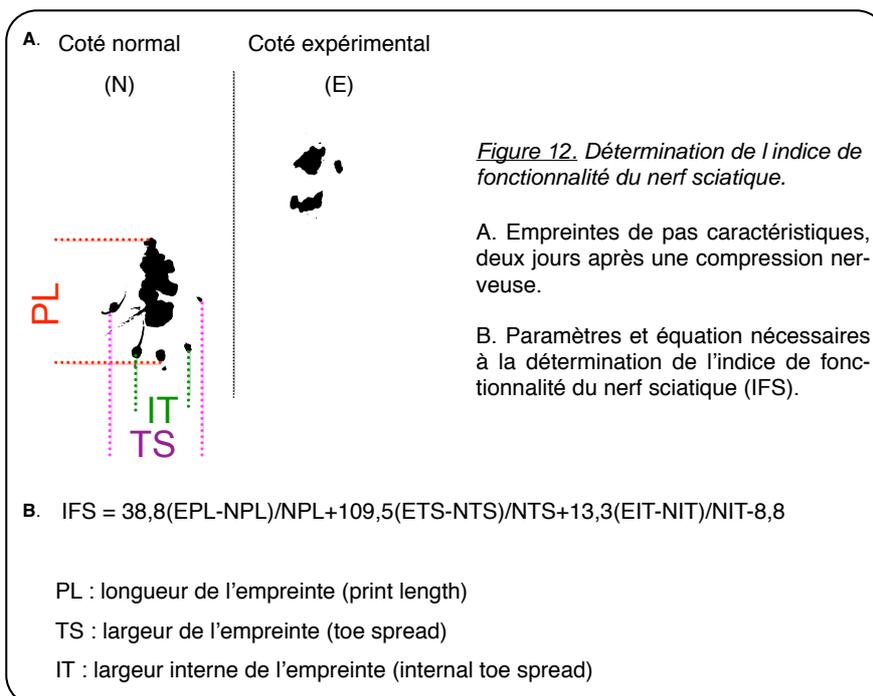
Après avoir marqué les pattes arrières avec de l'encre de chine, les animaux sont placés sur un plan incliné (20°) recouvert d'un papier blanc. Les traces de pas sont analysées selon l'équation de Medinaceli (Fig. 12) (de Medinaceli et al., 1982) : $IFS = 38,8(EPL-NPL)/NPL + 109,5(ETS-NTS)/NTS + 13,3(EIT-NIT)/NIT - 8,8$, où E correspond au côté expérimental (ipsi-latéral), N au côté normal (contra-latéral), PL à la longueur de l'empreinte (Print Length), TS à la largeur de l'empreinte entre les orteils les plus externes (Toe Spread) et IT à la largeur de l'empreinte entre les orteils internes (Internal Toe Spread). Chez une souris normale, l'indice de fonctionnalité du nerf sciatique (IFS) est proche de 0. Un IFS de -100 signifie que la fonction du nerf sciatique est totalement abolie.

5. Examen électrophysiologique

Les enregistrements sont réalisés avec un appareil électromyographique (EMG) classique (Couterpoint Mk2, Dantec). Les souris sont anesthésiées par injection i.p. de xylazine/kétamine et maintenues sur un tapis thermostaté à 36°C. La figure 13 illustre les différents montages utilisés.

1. Enregistrement des activités spontanées de dénervation

Les enregistrements électrophysiologiques sont réalisés par le même expérimentateur pour minimiser la variabilité. Les enregistrements sont réalisés à l'aide d'une électrode concentrique (Medtronic, 9013S0011, diamètre de 0,3mm) insérée dans le muscle gastrocnémien pendant au moins deux minutes. Une électrode monopolaire (Medtronic, 9013R0312, diamètre de 0,3mm) est placée à la base de la queue pour relier le système à la terre. Les tracés présentant des activités volontaires sont



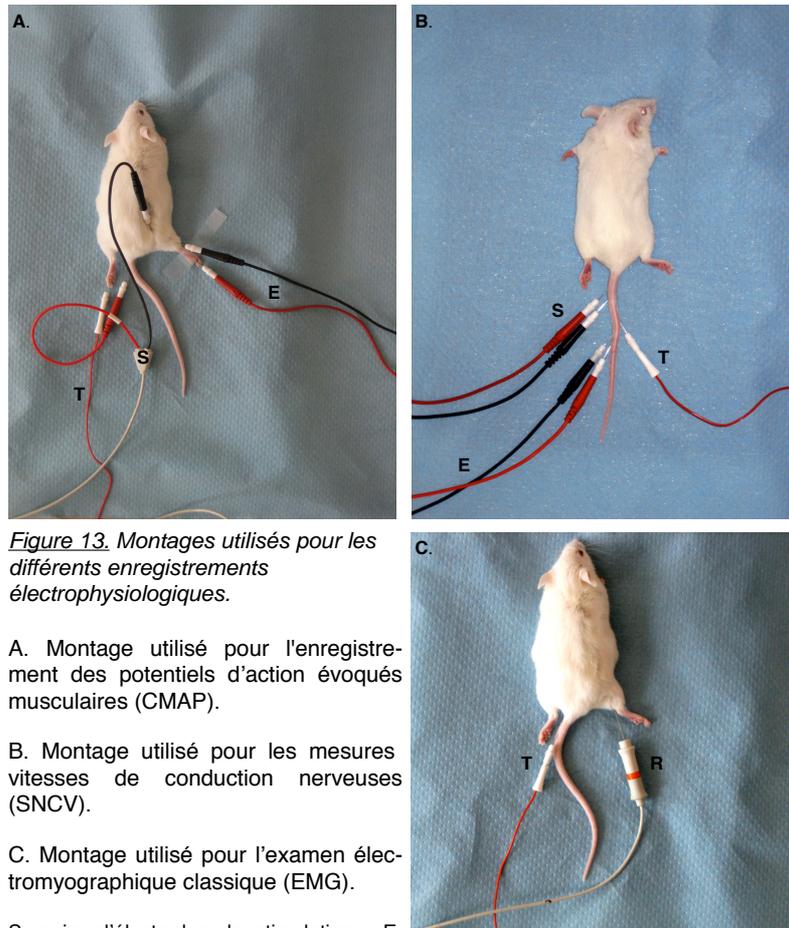


Figure 13. Montages utilisés pour les différents enregistrements électrophysiologiques.

A. Montage utilisé pour l'enregistrement des potentiels d'action évoqués musculaires (CMAP).

B. Montage utilisé pour les mesures vitesses de conduction nerveuses (SNCV).

C. Montage utilisé pour l'examen électromyographique classique (EMG).

S, paire d'électrodes de stimulation ; E, paire d'électrodes d'enregistrement ; T, électrode de terre ; R, électrode bipolaire d'enregistrement.

éliminés. Les activités spontanées caractéristiques de la dénervation (ASD) musculaire (principalement des fibrillations et des fasciculations) sont différenciées des activités volontaires par inspection visuelle et auditive (décharges régulières qui disparaissent avec la relaxation musculaire). Seules les activités spontanées avec une amplitude pic-à-pic supérieure à $50\mu\text{V}$ sont considérées comme significatives.

Les ASD sont cotées de 0 à 4: (0) absence d'ASD, (1) présence d'un train de potentiels persistant (>2-3 secondes) dans au moins deux champs examinés, (2) nombre modéré de potentiels dans au moins trois champs, (3) nombreux potentiels dans plusieurs zones (4) tracé interférentiel.

2. Enregistrement de potentiel d'action musculaire composé

Le nerf sciatique droit (nerf lésé) est stimulé avec une électrode au niveau du bassin. L'anode est insérée à la base de la queue. La stimulation consiste en une impulsion unique de 1Hz à une intensité supra-maximale (8mA). L'électrode de terre est insérée de manière sous cutanée sur la face plantaire de la patte opposée. L'électrode d'enregistrement est placée à proximité du tendon d'Achille droit et le potentiel d'action évoqué (CMAP) est enregistré dans le muscle gastrocnémien à l'aide d'une électrode unipolaire. L'amplitude entre le pic du potentiel évoqué et la ligne de base est mesurée directement sur l'appareil d'enregistrement.

3. Vitesse de conduction du nerf caudal

Les fonctions sensorielles peuvent être évaluées par mesure de la latence du potentiel d'action évoqué sensoriel du nerf caudal. Les enregistrements sont effectués sur un appareil EMG classique cité précédemment. Après anesthésie profonde, une paire d'électrodes stimulatrices est insérée à la base de la queue. La paire d'électrodes d'enregistrements est insérée en position distale et le système est relié à la terre par une électrode positionnée entre le point de stimulation et le point d'enregistrement. Après stimulation à une intensité supraliminaire (8mA) le potentiel évoqué sensoriel est enregistré. La latence de la réponse est mesurée entre l'artéfact de stimulation et le début de la déflexion négative issue de 10 enregistrements indépendants. La vitesse de conduction, exprimée en m/s, est estimée en divisant la latence distale ainsi obtenue par la distance entre les deux paires d'électrodes.

B. Culture primaire de fibroblastes

Les fibroblastes sont obtenus à partir d'explants cutanés de souris CnD1-Luc hétérozygotes. Les explants sont mis en culture dans du DMEM contenant 50% de sérum de veau foetal (FCS) et de la

gentamycine (50µg/ml). Après deux semaines de croissance *in vitro*, les cellules adhérentes (fibroblastes) sont dissociées et ensemencées pour 12h dans du DMEM contenant 5% de FCS. Les fibroblastes sont alors synchronisés dans du DMEM pendant 48h puis cultivés pendant 24h dans un milieu mitogène (12% FCS, EGF 20nM) ou non (DMEM sans sérum). Les cellules sont ensuite utilisées pour les études luminométriques et les expériences de western-blot et de RT-PCR. Pour les expériences d'immunocytochimie les fibroblastes sont directement cultivés sur lamelle de verre.

C. Transcription inverse et PCR semi-quantitatives

1. Extraction d'ARN totaux

Pour l'extraction et la purification d'ARN les cellules sont incubées dans 100µl de TRIzol Reagent (Invitrogen).

Les segments L3-L5 de moelle épinière lombaire d'animaux lésés et non lésés sont homogénéisés en présence de 300µl de TRIzol Reagent avec un broyeur en Téflon. Les ARN sont extraits par la méthode adaptée de Chomczynski and Sacchi (Chomczynski and Sacchi, 1987).

2. Transcription inverse et PCR semi-quantitative

Les ADNc sont synthétisés à partir de 2µg d'ARN total (1h, 37°C) par 200U de transcriptase inverse de M-MLV dans le tampon RT (Promega) en présence d'un mélange de 0,5µg d'amorces nucléotidiques aléatoires (Promega), de déoxyribonucléotides-triphosphates (dNTP, 10mM) et de RNAsine (40U, Promega). Les PCR semi-quantitatives sont réalisées avec 1U de Taq polymérase (New England BioLabs) dans le tampon de PCR (Q-BIOgene) en présence d'un mélange de dNTP (2mM) et de 10pmol d'amorces nucléotidiques spécifiques:

- CnD1-anti-sens: 5'- ATGCTGGTTTTTGCCTGAAG -3'
- CnD1-sens: 5'- TGGTCCCCAATCCTTGTC -3'
- 18S-anti-sens: 5'- CGTCTGCCCTATCAACTTTCG -3'
- 18S-sens: 5'- TCCTTGGATGTGGTAGCCG -3'

A l'issue de la réaction, les produits de PCR sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 2% et visualisés au bromure d'éthidium. L'ARNr 18S est utilisé comme standard et permet de vérifier l'homogénéité des dépôts.

C. Western-blot

Les segments L3-L5 de moelle épinière lombaire des animaux ayant subi une compression nerveuse sont disséqués longitudinalement pour séparer le côté ipsi- du côté contra-latéral à la lésion. Les

protéines issues des homogénats des héli-moelles ou des cultures de fibroblastes sont extraites dans du PBS contenant 1% d'IGEPAL, 0,5% de déoxycholate de sodium, 0,1% de SDS, 0,5% d'aprotine, 5mM de DTT et 1mM de PMSF. Les homogénats sont bouillis pendant 5min et soniqués 30sec. Après centrifugation et dosage protéique (BCA-Protein Assay Kit, Pierce), des quantités égales de protéines sont déposées sur gel SDS-polyacrylamide 12% dans du tampon de charge (glycérol 10%, β -mercaptoéthanol 1%, bleu de bromophénol 0,05% et SDS 1%). Les protéines sont électrotransférées à intensité constante (100mA, 2h à 4°C) sur membrane de nitrocellulose (0,2 μ m, Biorad). Le blocage des sites aspécifiques est réalisé dans du tampon TBST (100mMTrisHCl, 0,9% NaCl 0,05%, Tween20 pH 8) contenant 5% de protéines de lait. Les membranes sont incubées durant la nuit (4°C) avec l'anticorps monoclonal anti-CnD1 (clone DCS-6, Sigma) dilué à 1/200 dans du TBST contenant 3% de protéines du lait. Les membranes sont alors lavées trois fois dans du TBST et incubées 2h à température ambiante avec l'anticorps anti-souris couplé à la peroxydase de raifort (1/1000, Jackson Laboratories). Après trois lavages, la détection s'effectue par chimio-luminescence. L'homogénéité des dépôts est contrôlée immédiatement après transfert par coloration de la membrane au rouge Ponceau (Ponceau S solution, Sigma).

D. Dosage de l'activité luciférase

Les dosages d'activité luciférase sont réalisés sur les cultures primaires de fibroblastes, sur des prélèvements de moelle épinière (thoracique ou sur les segment L3-L5 séparé ou non dans le sens longitudinal) et de nerf sciatique (entier, ou en fragments).

L'extraction nécessaire au dosage d'activité luciférase s'effectue sur glace en présence de 100 μ l de tampon de lyse adapté (Luciferase Cell Culture Lysis 5X Reagent, Promega). Après centrifugation (10min, 15000rpm) la concentration protéique du surnageant est déterminée (BCA-Protein Assay Kit, Pierce). Cinq μ l du surnageant sont mis en présence de 50 μ l de Luciferase Assay Reagent (Promega) et la lumière résultante est quantifiée à l'aide d'un luminomètre (FB-12 Luminometer, Berthold). L'activité luciférase est exprimée en unité relative de luminescence (RLU) par μ g de protéines.

E. Immunomarquages

1. Immunofluorescence

Les tissus destinés aux études immunohistologiques sont traités au micro-onde (3X10min, P=750W) dans du tampon citrate 10mM pH6 pour favoriser le démasquage des sites antigéniques. Les tissus ainsi prétraités ou les fibroblastes cultivés sur lamelles en verre sont rincés au PBS (3X5 min) puis perméabilisés 30 min (PBS-1%Triton100X). Après une étape de blocage des sites aspécifiques (30 min, PBS-5% sérum de cheval - 0,1% Triton-X100) les anticorps primaires sont incubés pour la nuit

(4°C) à dilution désirée (Tableau 3) dans du PBS contenant 0,1% de Triton-X100. Après rinçage les anticorps secondaires sont incubés à la dilution souhaitée (Tableau 3) pendant 2h. Les lames sont montées en Mowiol et l'observation s'effectue sur un microscope à épifluorescence.

	Spécificité de l'anticorps	Espèce productrice	Dilution	Source
Anticorps primaires	CnD1 (clone SP4)	lapin	1/100	AbCam
	CnD1 (clone DCS6)	souris	1/200	Sigma
	MBP	chèvre	1/200	SantaCruz
	pRb (Ser249-Thr252)	chèvre	1/200	SantaCruz
	ChAT	chèvre	1/200	Chemicon
	luciférase	lapin	1/200	Sigma
Anticorps secondaires	AlexaFluor-555@chèvre	âne	1/500	Molecular Probe
	FITC@chèvre	âne	1/500	Jackson laboratories
	AlexaFluor-594@lapin	âne	1/500	Molecular Probe
	AlexaFluor-488@lapin	chèvre	1/500	Molecular Probe
	biotine@lapin	âne	1/500	Jackson laboratories
	HRP@souris	ane	1/1000	Jackson laboratories

Tableau 3. Caractéristiques des anticorps utilisés.

2. Révélation à la peroxydase de raifort

Après l'étape de démasquage des sites antigéniques, les peroxydases endogènes sont inactivées par un traitement de 10 min à l'H₂O₂ 3% dans du PBS. Après perméabilisation et incubation avec l'anticorps primaire, les coupes sont rincées, incubées pendant une heure avec un anticorps secondaire biotinylé (Tableau 3) puis révélées avec le système ABC (Vector).

3. Comptage de motoneurones

Les segments de moelle épinière L3-L5, correspondants au groupe de MN du nerf sciatique, sont coupés à une épaisseur de 20µm au cryostat (Leica) et colorés au bleu de toluidine à 1% (tampon borate de sodium 5%). Les comptages de MN sont effectués sur les cornes ventrales (200X) de 8 à 12 sections non adjacentes (séparées de 200µm) par animal (3 à 5 animaux par groupe). Les MN sont identifiés visuellement d'après leur localisation, leur forme et leur surface supérieure à 300µm².

D. Analyses statistiques

Les résultats présentés correspondent aux moyennes des données obtenues \pm SEM. Les comparaisons statistiques sont effectuées soit par un test-t de Student, soit par une ANOVA-1 suivie d'un test post-hoc de Newman-Keuls. Les études de corrélation sont effectuées à l'aide du test non-paramétrique de Spearman.

RESULTS

RESULTATS

I. Cycline D1 et neuropathies périphériques

A.Prolifération des cellules de Schwann: un dénominateur commun des neuropathies périphériques?

Les neuropathies périphériques, comme évoqué lors des rappels bibliographiques, sont des pathologies d'origines extrêmement diverses qui aboutissent toutes à l'altération structurale et fonctionnelle des nerfs périphériques. D'origines héréditaire, infectieuse, dys-immunitaire, métabolique, iatrogène ou lésionnelle, les événements initiateurs et leur séquence physiopathologique varient d'un cas à l'autre.

1.Contexte de travail et objectif de l'étude

Contexte. Dans un grand nombre de neuropathies périphériques, les événements initiateurs prennent place dans les CS. Par exemple, les études génétiques réalisées sur des familles atteintes de formes démyélinisantes de CMT ont révélé de nombreuses mutations ou délétions localisées sur les gènes impliqués dans la physiologie des CS et dans la formation de la myéline (Tableau 2) (Suter and Scherer, 2003).

Les mutations ou délétions des gènes codant pour PMP22, MPZ, Cx32, Krox20 et PRX sont parmi les mieux connues. Leur identification a permis d'élaborer de très bon modèles animaux par approche transgénique. Chez les CMT1-A souris qui sur-expriment la PMP22, la normalisation du niveau de PMP22 spécifiquement dans les CS (par knock-out tissu spécifique inductible) suffit à reverser le phénotype neuropathique (Perea et al., 2001). Cette étude prouve formellement que l'origine de cette pathologie réside dans les CS.

Les complications neurologiques de la lèpre sont également liées à une atteinte primaire des CS. *Mycobacterium leprae*, l'agent pathogène à l'origine de la lèpre, infecte les CS au niveau des nerfs intradermiques, y trouvant une niche à l'abri du système immunitaire, idéale pour sa prolifération et source de démyélinisation. Un des composants majeurs du bacille (PGL1, phenolic glycolipid 1) interagit avec les laminines- α 2 de la lame basale et forme un pont avec les α -dystroglycans, directement connectés à la périaxine qui limite les bandes de Cajal. Ce complexe constitue un

véritable récepteur pour le bacille et facilite l'infection des CS, qui, en réponse, entrent dans un cycle de prolifération (Rambukkana et al., 1998).

Dans le cas du syndrome de Guillain-Barré, une neuropathie dys-immunitaire, c'est une attaque auto-immune de la myéline par les macrophages, les lymphocytes puis le système du complément qui sont à l'origine des troubles observés (Toyka, 1999). Chez le rat ou la souris l'immunisation avec des extraits ou épitopes de myéline fournit un modèle isomorphe à la pathologie humaine (Gold et al., 2000) et confirme que les CS ont un rôle central dans la pathogénie de ces neuropathies.

Les neuropathies périphériques résultent également d'atteintes du transport axonal ou du corps cellulaire lui-même. Parmi les formes axonales de CMT, plusieurs mutations perturbent le flux axonal, notamment celles identifiées sur les gènes codant pour Nf-L et KIF1 β . Les souris invalidées pour KIF1 β présentent une dégénérescence neuronale associée à un phénotype de type CMT2 (Zhao et al., 2001) alors que les souris transgéniques basées sur des mutations (Lee et al., 1994) ou sur-expressions de Nf-L (Cote et al., 1993) correspondraient plutôt à des modèles de maladies du MN. L'interruption du transport axonal est un phénomène important dans les processus de dégénérescence Wallerienne (Coleman, 2005) et la réduction du transport axonal a aussi été rapportée dans les modèles d'animaux traités au *cis*-platine (Russell et al., 1995). Il semble dans ce dernier cas que la toxicité directe de ce composé sur les corps cellulaires des neurones sensoriels (lors d'un traitement intense uniquement) suffit à provoquer leur apoptose. Pour autant, dans un grand nombre de neuropathies périphériques, le type cellulaire dans lequel les événements initiateurs prennent place n'est pas clairement identifié.

Au cours de l'étude bibliographique présentée dans la publication n°1 nous avons méticuleusement analysé les principaux modèles animaux de neuropathies périphériques. Cette synthèse a permis de mettre en évidence que l'activation des CS est un événement commun à la majorité des neuropathies périphériques, quelle que soit leur origine. Dans les modèles murins de CMT1A, du syndrome de Déjérin-Sotas ou encore de neuropathies héréditaires avec hypersensibilité à la pression, la démyélinisation caractéristique est associée à une augmentation du nombre de noyaux de CS (Robertson et al., 2002) et à leur prolifération (Atanasoski et al., 2002). Dans ces modèles l'analyse des nerfs par puces à ADN a révélé une induction des gènes liés à la prolifération cellulaire et une répression de ceux responsables du contrôle du cycle et de la myélinisation (Giambonini-Brugnoli et al., 2005; ten Asbroek et al., 2005; Vigo et al., 2005). Des indices de prolifération sont aussi rapportés dans les neuropathies liées à la lèpre (Rambukkana, 2004), au diabète (Said et al., 1992; Said, 1995; Malik et al., 2001) ou encore après compression nerveuse (Atanasoski et al., 2001). Même si à l'heure actuelle il y a un manque d'études similaires dans les autres cas de neuropathies périphériques, la démyélinisation rapportée dans les neuropathies au *cis*-platine (Krarup-Hansen et al., 1993; Ozturk et al., 2005) ou encore dans le syndrome de Guillain-Barré (Toyka, 1999; Gold et al., 2000; Hughes and Cornblath, 2005) suggère une réponse adaptative des CS de type proliférative.

Objectifs de l'étude. Ainsi la prolifération des CS, sous la stricte dépendance de la CnD1 (Kim et al., 2000; Atanasoski et al., 2001; Atanasoski et al., 2002), peut être vue comme un dénominateur commun des neuropathies périphériques. Nous avons donc postulé que l'augmentation de CnD1 dans le nerf pourrait être utilisé comme un index de souffrance nerveuse. Pour tester cette hypothèse nous avons utilisé la lignée de souris transgéniques CnD1-Luc qui exprime le gène de la luciférase de ver luisant comme système rapporteur, contrôlé par le promoteur de la CnD1 (Albanese et al., 1995). Après avoir validé sa fonctionnalité *in vitro* (Fig. 14), nous avons induit trois types distincts de neuropathies périphériques (publication n°1) : compression transitoire du nerf sciatique, neuropathie diabétique et neuropathies induites par un traitement aux dérivés platinés.

2. Résultats - Discussion

Fonctionnalité du transgène *in vitro*. Pour vérifier la fonctionnalité du transgène, des fibroblastes issus de souris hétérozygotes ont été cultivés en conditions quiescentes (DMEM seul) ou en conditions mitogènes en présence d'EGF et de FCS (Fig.14). Comme attendu, la stimulation du cycle cellulaire s'accompagne d'une importante augmentation de l'activité luciférase (Fig. 14A). Afin de vérifier que l'activité luciférase mesurée suit l'activation transcriptionnelle du promoteur endogène de la CnD1, nous avons quantifié le niveau d'expression de l'ARNm de CnD1. Comme illustré sur la figure 14B, la stimulation du cycle cellulaire par l'EGF induit une augmentation significative de l'ARNm de la CnD1. Les expériences de Western-blot (Fig. 14C) révèlent que cette augmentation est associée à une accumulation de CnD1 nécessaire à la progression du cycle cellulaire. Le double immunomarquage réalisé confirme que la luciférase et la CnD1 sont localisées dans les mêmes cellules (Fig. 14E-F). Dans les fibroblastes en division, caractérisés par la présence de deux noyaux (Fig. 14D), la CnD1 est nucléaire (Fig. 14D) alors que l'immunoréactivité de la luciférase est restreinte au cytoplasme des fibroblastes CnD1⁺ (Fig. 14F). La co-localisation cellulaire de ces deux protéines est systématique.

- *Fonctionnalité et spécificité du système rapporteur.* La stimulation du cycle cellulaire de fibroblastes CnD1-Luc par un traitement mitogène (sérum, EGF) active la transcription de la CnD1 (Fig. 14A-B). Cette induction transcriptionnelle provoque l'accumulation de la protéine et sa translocation nucléaire dans les fibroblastes, aboutissant à l'entrée en mitose (Fig.14C-F). L'expression de la luciférase (une enzyme cytoplasmique) est restreinte aux cellules immunoréactives pour CnD1, cette observation confirme la spécificité du système rapporteur développé et valide son utilisation pour les futures études.

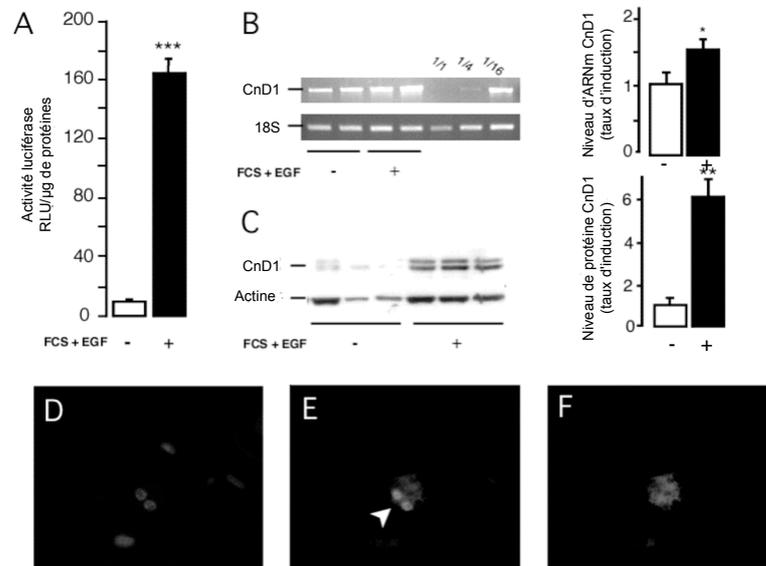


Figure 14. Fonctionnalité de la lignée transgénique CnD1-Luc in vitro.

A : Activité luciférase de fibroblastes CnD1-Luc après 24h de culture en conditions quiescentes (sans sérum) ou prolifératives (FCS 12%, EGF 20nM). Les valeurs correspondent aux moyennes \pm SEM, n=3, ***p<0,0001, test-t de Student.

B : Détection par RT-PCR des ARNm CnD1 et 18S de fibroblastes CnD1-Luc. Une expérience représentative est présentée à gauche. La quantification (à droite) révèle une induction de $1,5 \pm 0,14$ fois (n=4, *p<0,05, test-t de Student).

C : Détection par Western-blot de la CnD1 et de l'actine (utilisée comme contrôle interne) de fibroblastes CnD1-Luc. Une expérience représentative est présentée à gauche. La quantification (à droite) révèle une augmentation de la quantité de CnD1 de $6,2 \pm 0,58$ fois par rapport aux contrôles (n=3, ***p<0,005, test-t de Student).

D-E-F : Détection par immunocytochimie de la CnD1 et de la luciférase dans des fibroblastes CnD1-Luc après 24h de culture en conditions mitogènes. E: L'immunoréactivité pour la CnD1 est détectée dans les noyaux des fibroblastes en division (tête de flèche) comme indiqué par la présence de deux noyaux (marquage nucléaire avec du Hoechst-33342) (D). F: L'immunoréactivité pour la luciférase est restreinte au cytoplasme des fibroblastes en division.

- *Avantage du système CnD1-Luc.* L'activité du promoteur de la CnD1 peut être quantifiée de manière précise et sensible avec le système rapporteur, offrant un avantage par rapport à la technique semi-quantitative de RT-PCR. Cette propriété permet de s'intéresser à l'activité du promoteur de la CnD1 dans des prélèvements de petite taille, moins évident à réaliser avec les techniques traditionnelles.

Validation de la démarche expérimentale *in vivo*. Afin de vérifier que la lignée CnD1-Luc puisse refléter des dommages nerveux, nous avons soumis les souris CnD1-Luc à trois modèles de neuropathies périphériques. Voici les principaux résultats présentés dans la publication n°1.

Le premier modèle utilisé est la compression transitoire du nerf sciatique. Ce paradigme expérimental bien caractérisé induit une prolifération des CS dépendante de la CnD1 suite à la perte de contact entre les axones dégénératifs et les CS. Les analyses réalisées sur les souris CnD1-Luc révèlent une augmentation de la quantité de CnD1 (mesurée par western-blot) associée à une induction de l'activité luciférase dans le nerf. La cinétique d'activation du promoteur de la CnD1, évaluée par luminométrie, suit le décours temporel de l'accumulation de son ARNm (Atanasoski et al., 2001) suggérant que le système développé est fonctionnel et applicable pour ce type d'études.

Pour conforter ces premiers résultats nous avons utilisé un modèle de neuropathie diabétique connu pour induire une démyélinisation paranodale associée à une remyélinisation active (Kato et al., 2000; Almhanna et al., 2002). Suite à l'injection de STZ l'activité luciférase de souris CnD1-Luc est induite dans les nerfs sciatiques dès la 3^{ème} semaine de diabète puis augmente progressivement. La cinétique obtenue correspond au délai nécessaire à l'apparition des premiers troubles fonctionnels. Ces résultats prouvent que ces souris transgéniques constituent un outil sensible, potentiellement utilisable pour étudier des neuropathies d'origines diverses. Nous avons également montré pour la première fois que les neuropathies diabétiques sont associées à une activation transcriptionnelle de la CnD1. Bien que l'origine cellulaire de la luciférase n'ait pas été déterminée, il est raisonnable d'envisager qu'elle soit liée à une induction de la CnD1 au sein des CS.

Enfin, le troisième modèle étudié reproduit les troubles associés aux chimiothérapies basées sur les dérivés du platine. Le traitement d'animaux avec ces composés induit une neuropathie sensorielle liée à leur toxicité pour les ganglions rachidiens. Dans les cas de neuropathies au *cis*-platine les atteintes du SNP s'expriment par une apoptose des neurones sensoriels, des changements morphologiques des cellules satellites et une réduction du transport axonal. Le carboplatine est quant à lui réputé beaucoup moins neurotoxique (Screnci and McKeage, 1999), de ce fait, très peu d'études animales sont disponibles. Néanmoins les rats traités à hauteur de 90mg/kg à 135mg/kg présentent une diminution de la SNCV et une constriction des corps cellulaires et des noyaux des neurones sensoriels (Cavaletti et al., 1998). Après trois semaines de traitement à des doses faibles de *cis*-

platine (dose cumulée de 20mg/kg) ou de carboplatine (dose cumulée de 80mg/kg) l'activité luciférase des nerfs sciatiques est augmentée de 3 à 4 fois par rapport aux souris contrôles. Si l'on considère la courte durée du traitement et les faibles doses utilisées cette étude confirme la sensibilité du système d'évaluation proposé et montrent pour la première fois une activation précoce de la transcription de la CnD1 dans ces neuropathies périphériques. Ces données suggèrent également que des atteintes primitives des neurones stimulent la prolifération des CS, peut-être en réponse à leur apoptose (Ozturk et al., 2005).

Publication n°1 - Evaluation Tools & Animal Models of Peripheral Neuropathies

Bastien FRICKER, André MULLER & Frédérique RENE

Neurodegenerative Disease, *accepté*

Evaluation Tools & Animal Models of Peripheral Neuropathies

Bastien FRICKER, André MULLER, Frédérique RENE

Neurodegenerative Diseases, 2008, Vol. 5, N° 2, Pages 72–108

Pages 73-109 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Les utilisateurs peuvent consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://dx.doi.org/10.1159/000112835>

La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services :

<http://www-sicd.u-strasbg.fr/services/peb/>

B. Etude spatio-temporelle de l'expression de la cycline D1 dans les cellules de Schwann après une compression nerveuse

1. Contexte de travail et objectifs de l'étude

Contexte. Après une compression nerveuse, les nerfs périphériques entrent dans un processus de dégénérescence caractérisé par la "désintégration granulaire de l'axone distal au site de lésion" connu sous le nom de dégénérescence Wallérienne (Stoll et al., 2002). Pendant longtemps ce mécanisme était considéré comme passif, résultant d'une interruption entre l'axone et le corps cellulaire. La découverte de mutants spontanés caractérisés par une dégénérescence Wallérienne plus lente (souris *Wld^s*) a permis de prouver que l'auto-destruction de l'axone est un processus actif, indépendant de l'apoptose neuronale (Finn et al., 2000). Après l'initiation d'un programme spécifique à l'axone, l'activation de protéases par l'influx calcique abouti à la dégradation du cytosquelette et des protéines membranaires (Coleman, 2005). Suite à un siècle de débats, il a été récemment montré qu'après une compression nerveuse les axones dégèrent de manière rétrograde et asynchrone (Beirowski et al., 2005). Les débris de l'axone et de la myéline sont éliminés par les CS et les macrophages hématogènes (Stoll and Muller, 1999). Les CS répondent à l'absence d'axone par une répression des gènes de la myéline, puis elles se différencient, prolifèrent, et s'alignent en tube (bande de Bügner) pour créer un micro-environnement propice à la repousse axonale (Stoll and Muller, 1999).

Objectifs de l'étude. La prolifération des CS apparaît comme un événement clé de la régénération des nerfs périphériques. Devant le manque de données à ce sujet, nous avons choisi d'identifier avec précision le schéma spatial et temporel de prolifération des CS après une compression nerveuse. Comme leur prolifération est strictement dépendante de la *CnD1* (Atanasoski et al., 2001) nous avons décidé d'utiliser les souris *CnD1-Luc* comme un index de prolifération de ces cellules.

Après avoir caractérisé les conséquences fonctionnelles du modèle de compression avec différentes méthodes d'évaluation (test d'agrippement, IFS et électrophysiologie), nous avons établi avec précision le schéma spatio-temporel d'induction de luciférase dans le nerf sciatique. Finalement nous avons précisé le type cellulaire exprimant la *CnD1*.

2. Résultats

1. Récupération fonctionnelle après une compression nerveuse

Afin d'établir l'intensité des troubles moteurs et la cinétique de récupération, la force musculaire des pattes arrières lésée et intacte et l'IFS ont été mesurés à 2, 8, 17 et 30 jours après la compression

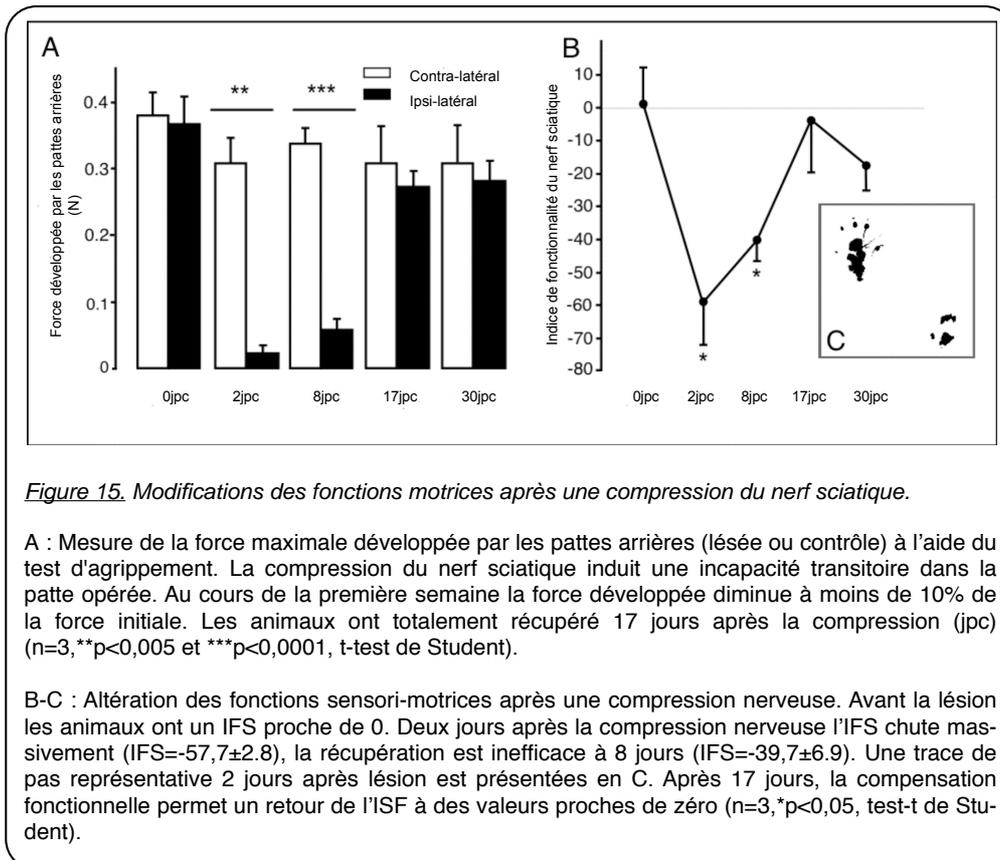
(Fig. 15). Au cours de la première semaine après lésion (2 et 8 jours après compression), les performances de la patte ipsilatérale à la compression sont totalement abolies (Fig. 15A). La force développée chute à des valeurs inférieures à 10% de la force initiale alors que la patte contralatérale n'est pas affectée. Une semaine plus tard, 17 jours après lésion, la récupération fonctionnelle de la patte ipsilatérale à la compression est efficace et la force musculaire revient à des valeurs normales (0,3N).

L'IFS permet d'évaluer les fonctions sensori-motrices du nerf sciatique par analyse des modifications des traces de pas. La compression nerveuse induit une incapacité massive révélée par une diminution de la longueur et de la largeur des empreintes du côté opéré, aboutissant à un IFS inférieur à zéro à 2 et 8 jours post-intervention (Fig. 15B). Un exemple caractéristique 2 jours après lésion est présenté dans la figure 15C. Avec ces méthodes d'investigation les souris analysées ont récupéré en 2 à 3 semaines. Néanmoins, au dernier temps examiné (30 jours post-compression) le réflexe d'extension des pattes arrières est toujours altéré (non présenté).

2. Modifications électrophysiologiques

- *Potentiel d'action composé musculaire.* Un CMAP, enregistré dans le muscle gastrocnémien avant l'intervention, est typiquement biphasique (Fig. 16A, à gauche) et a une amplitude d'environ 38mV (Fig. 16A-B). Deux jours après la compression l'amplitude des CMAP diminue massivement ($5,1 \pm 1,33\text{mV}$). Ces altérations perdurent jusqu'au 17^{ème} jour après la compression. 30 jours après la compression nerveuse l'amplitude des CMAP est 4 fois supérieure aux précédentes mesures ($21,4 \pm 2,09\text{mV}$) mais toujours inférieure aux valeurs initiales (réduction de 50%) et souvent de forme polyphasique (Fig. 16A-B).

- *Activités spontanées de dénervation.* La présence d'ASD est la signature typique de fibres musculaires dénervées. Deux jours après la compression, les enregistrements EMG réalisés sur le muscle gastrocnémien présentent un nombre modéré de potentiels de fibrillation (Fig. 16D). L'activité électrique spontanée évolue vers un tracé interférentiel 4 jours après lésion (score 4, Fig. 16C-D). Les ASD restent soutenues à 8 jours (score 3) avant une normalisation progressive des enregistrements (score 2, Fig. 16C) et le retour à un tracé plat 30 jours après lésion nerveuse (Fig. 16C en bas et 16D).



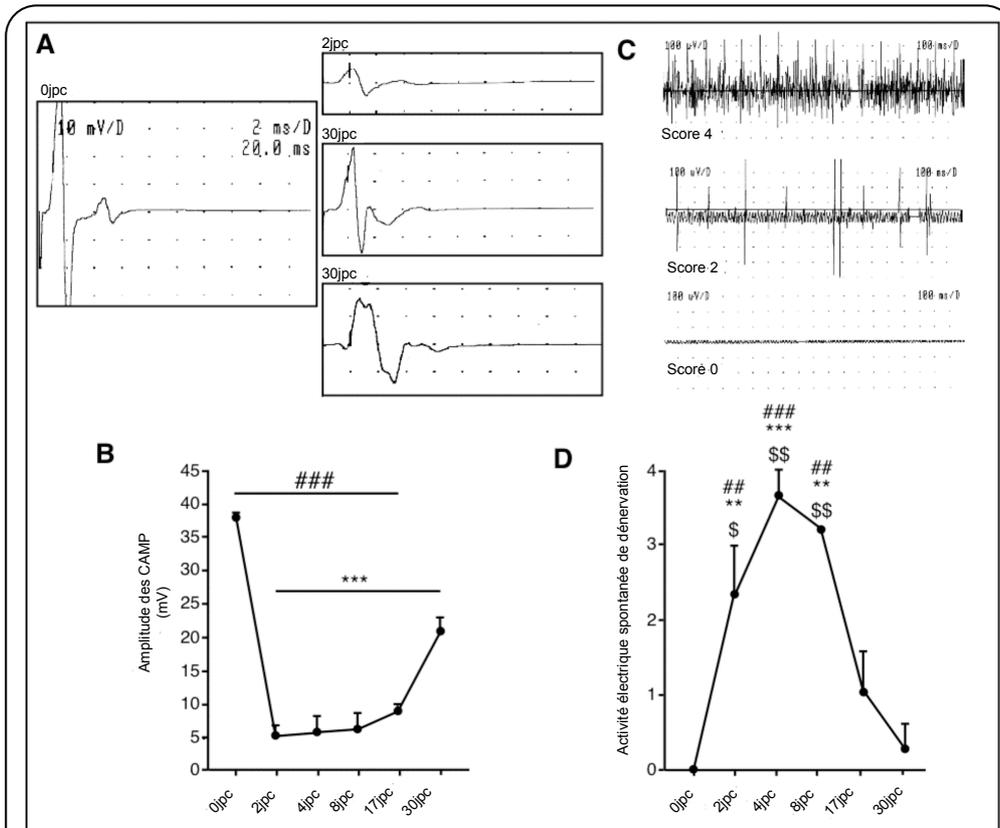


Figure 16. Modifications électrophysiologiques après une compression du nerf sciatique.

A-B : Evolution des CMAP enregistrés dans le muscle gastrocnémien. Un enregistrement représentatif de CMAP avant la compression (A, à gauche) est typiquement biphasique et a une amplitude moyenne de $37,80 \pm 6,67$ mV. Deux jours après la compression, l'amplitude des CMAP diminue massivement (A, en haut à droite) puis évolue vers une récupération partielle à 30jpc (A, à droite). La quantification des CMAP (B) révèle une diminution significative et soutenue des amplitudes au moins durant les 2 semaines après lésion (7 fois à 2 jours post-compression). Un mois après la lésion la récupération n'est que partielle. $n=3$, $***p<0,001$ comparée au contrôle et $###p<0,001$, comparé à 30 jours après lésion; test de comparaisons multiples de Newman-Keuls.

C-D : Evolution de la dénervation du muscle gastrocnémien suivi par EMG.

C : Enregistrements représentatifs d'ASD. Une dénervation sévère est associée à un tracé interférentiel (score 4, en haut). Les enregistrements de muscles subissant une dénervation intermédiaire sont caractérisés par la présence de trains de potentiels de fibrillation et de fasciculation distinguables (score 2, au milieu). Après réinnervation, les enregistrements EMG ne sont pas distinguables d'enregistrements contrôles (score 0, en bas).

D : Quantification des ASD. La dénervation fonctionnelle débute dès les premiers temps analysés, atteint son paroxysme à 4 et 8 jours post-lésion avant d'entamer un retour graduel à la normale à 30 jours. $n=3$, $***p<0,001$, $**p<0,01$, $*p<0,05$ comparé au contrôle ; $###p<0,001$, $##p<0,01$, $\#p<0,05$ comparé à 30 jours; $$$p<0,01$, $\$p<0,05$ comparé à 17 jours; test de comparaisons multiples de Newman-Keuls.

3. Dosage global de l'activité luciférase du nerf sciatique après compression nerveuse

Nous avons réalisé des études luminométriques sur l'intégralité du nerf sciatique après une compression transitoire. Comme illustré par la figure 17, l'activité luciférase du nerf sciatique est augmentée d'un facteur deux dès le quatrième jour qui suit la lésion. Cette induction s'accroît de manière importante à 8 jours (17 fois par rapport aux valeurs contrôles), reste élevé à 17 jours puis se normalise un mois après la lésion.

4. Analyse spatio-temporelle de l'activation transcriptionnelle de la CnD1 dans le nerf sciatique après compression nerveuse

Afin d'établir avec précision le schéma spatio-temporel d'activation du promoteur de la CnD1 le long du nerf, le segment proximal et le segment distal à la compression ont été subdivisés en deux fragments de taille égale. Ainsi, pour l'analyse de la régulation spatiale nous disposons de quatre morceaux de nerf sciatique définis de la manière suivante (de l'extrémité médullaire à l'extrémité distale) : la partie médullaire du tronc proximal (mProx) et la partie distale du tronc proximal (dProx) d'une part ; le fragment du tronc distal orienté du côté médullaire (mDist) et la partie distale du tronc distal (dDist) d'autre part (Fig. 18A). Le fragment de nerf sciatique incluant la zone de compression a été écarté de l'étude pour s'affranchir des effets de la cicatrice gliale.

- *Expression de la luciférase dans un nerf sciatique intact.* Chez les animaux du groupe contrôle opératoire (non représenté), la comparaison de l'activité luciférase des quatre localisations entre elles ne montre pas de différences significatives. L'activité luciférase est homogène le long du nerf ($I/C_{\text{sciatique}}=1,3\pm 0,1$).

- *Gradient rétrograde de luciférase.* Deux jours après compression, les légères variations d'activité luciférase observées ne sont pas suffisantes pour différer des souris contrôles. Afin d'étudier l'influence de la localisation sur l'activité luciférase, nous avons comparé les résultats de chaque localisation à 2 jours post-lésion : l'activité luciférase est plus importante dans le tronc distal (Fig. 18B). La différence la plus significative se situe entre dDist ($I/C^{\text{dDist}}=1,9\pm 0,3$) et les segments proximaux ($I/C^{\text{mProx}}=0,4\pm 0,1$ et $I/C^{\text{dProx}}=0,6\pm 0,2$), suggérant une régulation différentielle entre les deux extrémités du nerf. L'analyse statistique présentée en figure 18C révèle une corrélation parfaite entre le niveau d'induction et la localisation, confirmant la mise en place d'un gradient de luciférase depuis l'extrémité la plus distale (Fig. 18C). Quatre jours après la compression, l'induction de luciférase

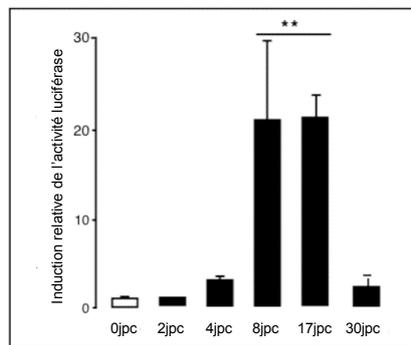
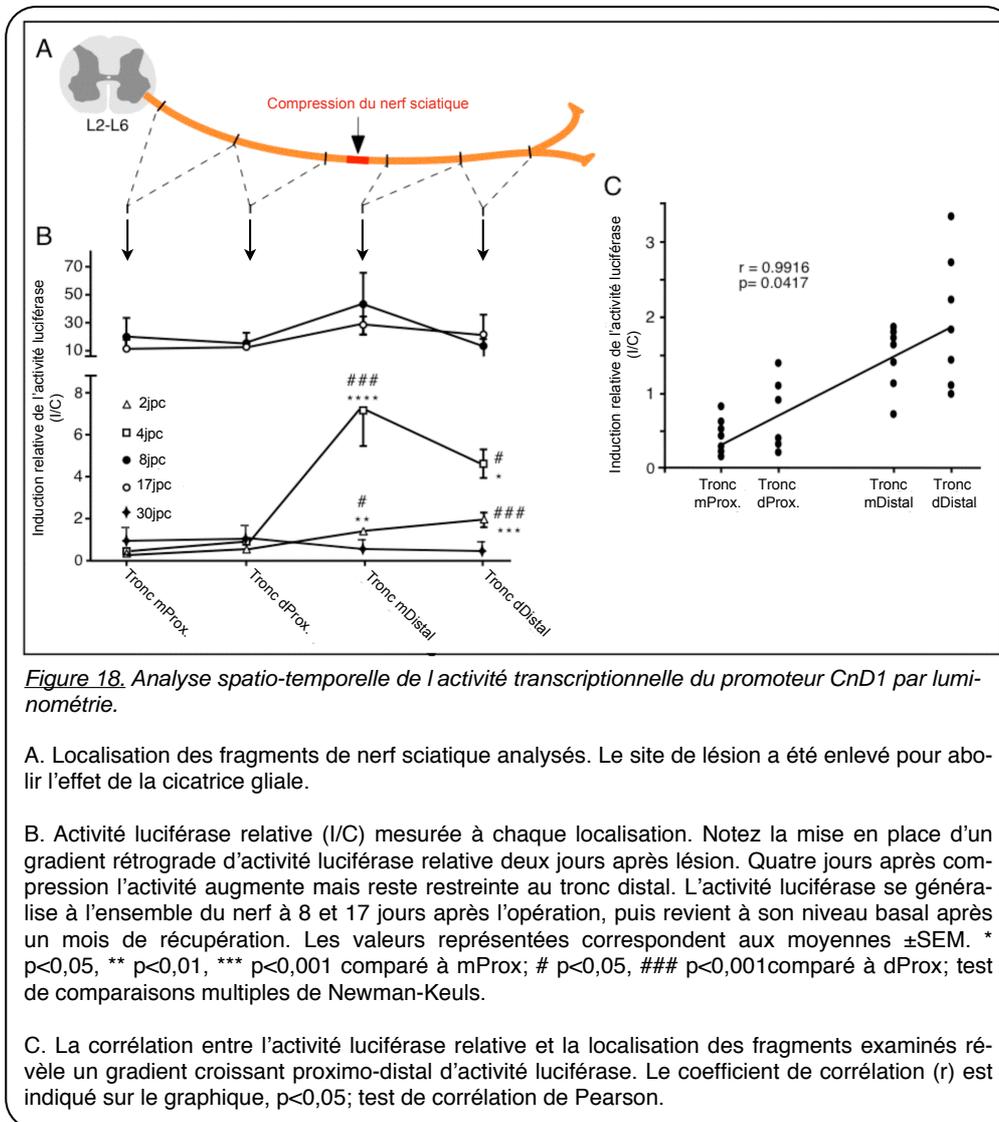
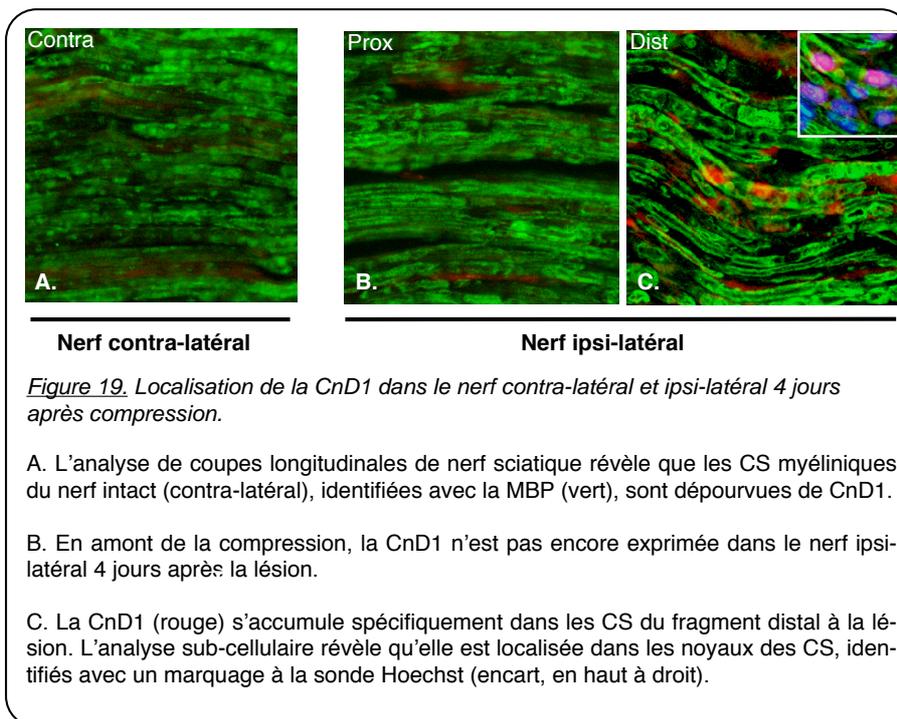


Figure 17 Effet de la compression nerveuse sur l'activité luciférase du nerf sciatique.

Cinétique d'induction relative de l'activité luciférase qui reflète l'activation transcriptionnelle du gène de la CnD1. Les données sont standardisées par rapport au nerf sciatique contra-latéral utilisé comme contrôle interne. Une légère augmentation de la luminescence apparaît 4 jours après la lésion, elle devient significative aux 8^{ème} et 17^{ème} jours. A ces deux temps, l'activité luciférase est 20 fois supérieure à celle du nerf intact, puis elle se normalise un mois après la compression. ** $p < 0,01$ comparé aux autres temps examinés; test de comparaisons multiples de Newman-Keuls.





s'intensifie dans les deux segments du tronc distal (environ 5 fois) alors quelle reste à son niveau basal en amont de la lésion (Fig. 18B).

- *Généralisation à l'ensemble du nerf puis normalisation.* L'activité luciférase, qui était restreinte au tronc distal, augmente de l'ordre de 20 fois et se généralise à l'ensemble du nerf à 8 et 17 jours post-lésion (Fig. 18B). L'activité luciférase diminue ensuite dans le nerf lésé pour revenir à des valeurs identiques à la normale 30 jours après la compression ($I/C=1,4\pm 0,7$).

5. Localisation cellulaire de la CnD1 dans les phases précoces de la dégénérescence Wallérienne

Afin de vérifier l'origine cellulaire de la CnD1 pendant la période de dégénérescence axonale, des immunomarquages contre la CnD1 et la MBP (un marqueur des CS myéliniques) ont été réalisés sur des coupes longitudinales de nerf sciatique 4 jours après compression (Fig. 19).

Le nerf contra-latéral à la lésion est dépourvu de CnD1 (Fig. 19A). Les marquages réalisés sur l'extrémité médullaire du nerf lésé sont similaires au nerf intact (Fig. 19B). Dans le tronc distal à la lésion la CnD1 est exprimée (Fig. 19C) mais est restreinte aux cellules immunoréactives pour la MBP. Pour vérifier la localisation sub-cellulaire de la CnD1, des marquages nucléaires avec la sonde Hoechst-33342 ont été réalisés. Les résultats obtenus indiquent que la CnD1 s'accumule dans les noyaux des CS localisées dans le tronc distal à la lésion (Fig. 19C). Pour résumer, quatre jours après compression la CnD1 est spécifiquement exprimée en aval de la lésion où elle est importée dans les noyaux des CS.

3. Discussion

Altérations fonctionnelles induites par la compression nerveuse

- *Phase de dénervation active.* Dans les deux jours qui suivent la compression, la force musculaire et la fonctionnalité du nerf sciatique sont totalement abolies (Fig. 15). Ces troubles sont liés à la dénervation des muscles distaux qui se traduit par une diminution massive des CMAP et par l'augmentation des ASD (Fig. 16). La compression provoque également une perte de contact entre les terminaisons des axones moteurs et les jonctions neuromusculaires (Magill et al., 2007), stimulant l'expression de gènes responsables d'activités électriques spontanées dans le muscle dénervé (Schaeffer et al., 2001). Ces mécanismes s'intensifient et atteignent un paroxysme une semaine après la compression (Fig. 16), durée nécessaire à la désafférentation de la majorité des jonctions neuromusculaires par dégénérescence Wallérienne (Magill et al., 2007).

- *Phase de régénération axonale.* Au cours de la deuxième semaine après la compression les fonctions motrices évaluées retournent à leurs valeurs initiales (Fig. 15). Ce délai coïncide avec la mise en place de processus régénératifs au sein des axones (Magill et al., 2007). A 17 jours post-lésion l'analyse du muscle gastrocnémien par EMG révèle de rares potentiels de dénervation (Fig. 16), indiquant que la plupart des axones régénératifs ont atteint leurs plaques motrices.

- *Phase de maturation tardive.* Un mois après la compression nerveuse la force musculaire, la fonctionnalité du nerf sciatique et l'examen électromyographique sont normaux, indiquant que l'innervation du muscle gastrocnémien est efficace (Fig. 15 & 16). Pourtant les CMAP enregistrés à 30 jours post-lésion sont polyphasiques et leur amplitude toujours inférieure aux valeurs initiales. Cette observation indique que les unités motrices sont faiblement synchronisées et suggèrent que la myélinisation est toujours en cours (Pot et al., 2002). Cette hypothèse pourrait également expliquer les déficits durables du réflexe d'extension observé dans notre modèle.

Activation transcriptionnelle et localisation de la cycline D1 dans le nerf sciatique lésé

- *L activation de la CnD1 précède la myélinisation.* Dans le nerf lésé, l'activité luciférase globale augmente à 8 jours, date à laquelle les processus de dégénérescence sont à leur apogée, et reste élevée pendant la première semaine de récupération fonctionnelle (17 jours post-lésion). Ces données révèlent une activation transcriptionnelle de la CnD1 et suggèrent l'existence d'une activité mitotique importante, stimulée par la perte des contacts CS-axones (Magill et al., 2007). Cette prolifération cellulaire se poursuit dans les premiers temps de la régénération nerveuse et, sous l'effet de la croissance axonale (Gupta et al., 1993), se normalise alors que la myélinisation a encore lieu (Fig. 16-17).

- *L augmentation de CnD1 est régulée par la perte de contact avec les axones.* Pour s'affranchir des effets de la cicatrice gliale (Romine et al., 1976) et pour déterminer l'influence de la perte des contacts CS-axones sur l'activation transcriptionnelle de la CnD1, nous avons analysé l'activité luciférase sur différents segments de nerf sciatique. Deux jours après la compression l'activité luciférase, restreinte au segment distal, est plus élevée vers la terminaison nerveuse. Cette régulation différentielle précoce génère un gradient proximo-distal croissant d'ARNm CnD1 dans le nerf sciatique qui progresse de manière rétrograde et se généralise à l'ensemble du nerf 8 jours après la compression : l'induction transcriptionnelle de la CnD1 évolue de la même manière que les axones dégénèrent (Beirowski et al., 2005). D'un point de vue chronologique, la cinétique de prolifération des CS et la cinétique de dégénérescence axonale sont tout à fait similaires. La comparaison des schémas spatio-temporels de ces deux événements sera détaillée dans la partie discussion de ce manuscrit. Finalement l'activité luciférase se normalise alors que les axones en régénération atteignent leur cible initiale.

- *Localisation de la cycline D1 et prolifération des cellules de Schwann.* La CnD1 est un acteur clé de l'entrée dans le cycle cellulaire, nécessaire à la transition G1/S. Les études initiales sur les souris invalidées pour la CnD1 ont montré la dépendance de CS pour la CnD1, en particulier pendant la régénération nerveuse après lésion (Kim et al., 2000). Dans des conditions pathologiques, l'induction de CnD1 (augmentation de l'ARNm et de la protéine) est restreinte aux CS prolifératives (Atanasoski et al., 2001; Atanasoski et al., 2002). A quatre jours après compression, nous avons vérifié que la CnD1 s'accumule dans le noyau des CS, phénomène indispensable à leur prolifération. De plus, la protéine n'est présente que dans les segments où l'activité luciférase est induite, suggérant qu'elle reflète exclusivement la prolifération de ces cellules.

Conclusions

Au cours de ces travaux, nous avons confirmé la fonctionnalité, l'efficacité et la sensibilité de la lignée transgénique CnD1-Luc *in vivo*.

Ce système rapide et peu coûteux est parfaitement adapté à l'étude de la compression nerveuse. Ce modèle expérimental s'accompagne d'une activation du promoteur de la CnD1 et de l'accumulation de la protéine dans le noyau des CS, aboutissant à leur prolifération. De cette manière nous avons mis en évidence pour la première fois que la prolifération des CS débute à l'extrémité distale du nerf lésé, et se généralise à l'ensemble du nerf en suivant la direction de dégénérescence axonale. Nos résultats indiquent que l'intensité de la prolifération cellulaire est stimulée par la repousse axonale. Cette étude montre également que le fragment en amont de la compression est le siège d'une multiplication active de CS, cellules qui contribueront à la régénération nerveuse après leur migration vers le site de lésion.

Pris dans leur ensemble, ces résultats confirment l'intérêt d'utiliser la lignée CnD1-Luc dans l'étude de la dégénérescence Wallérienne. Cet outil est parfaitement adapté à l'étude de la régulation de la prolifération par les interactions axone-CS ou encore à l'évaluation des effets de molécules sur le remodelage et la régénération nerveuse.

D.Utilisation de la lignée cycline D1-luciférase pour l'évaluation de propriétés neuroprotectrices dans un modèle de neuropathie diabétique

1.Contexte de travail et objectifs de l'étude

Contexte. Le diabète est couramment associé au développement de neuropathies sensorielles (Perkins and Bril, 2003). Bien que très étudié tant chez l'homme qu'à l'aide de nombreux modèles expérimentaux, sa séquence physiopathologique est encore incertaine. Il semble que cette neuropathie soit multifactorielle, faisant intervenir des facteurs métaboliques et vasculaires (Sima and Sugimoto, 1999) :

- l'hyperglycémie stimule l'activité enzymatique de l'aldose réductase aboutissant à l'accumulation de sorbitol et fructose, à la déplétion caractéristique de taurine et myo-inositol ainsi qu'à un déséquilibre des nucléotides nicotinamides ;
- l'auto-oxydation du glucose génère un stress oxydant par augmentation de produits oxygénés réactifs (ROS, reactive oxygen species) ;
- l'accumulation intracellulaire de protéines hautement glycosylées de manière non enzymatique ;
- une altération du neurotrophisme ;
- une hypovascularisation endoneurale médiée par la synthèse accrue de NO et de prostanoïdes.

Au niveau cellulaire, cette neuropathie s'exprime par une démyélinisation (Kato et al., 2000) associée à une prolifération active des CS (Almhanna et al., 2002). Dans la publication n°1 nous avons montré que l'intensité de ces mécanismes peut être évaluée à l'aide des souris CnD1-Luc, chez lesquelles l'activité luciférase reflète l'activité transcriptionnelle la CnD1.

De nombreux facteurs neurotrophiques ont été testés pour améliorer les neuropathies associées au diabète (Tredici et al., 1999; ter Laak et al., 2000; Ozturk et al., 2005). Néanmoins leur utilisation en thérapeutique est limitée par un certain nombre de désavantages, ils ne traversent pas la barrière hémato-encéphalique, sont rapidement dégradés par les peptidases et présentent des effets indésirables comme, par exemple, des réactions douloureuses. Pour ces raisons, le C1, un alcool gras à longue chaîne carbonée, nous a paru intéressant. C'est une molécule synthétique optimisée depuis des bio-molécules actives (alcool gras) extraites de la plante tropicale *Hygrophilia erecta* Hochr. (Girlanda-Junges et al., 2000). Cette molécule promeut la survie des neurones *in vivo* et *in vitro*, l'élongation neuritique (Gonzalez de Aguilar et al., 2001) et l'exocytose en stimulant l'influx calcique (Girlanda-Junges et al., 2000). Le C1 favorise également la repousse axonale par inhibition

de l'environnement répressif lié aux molécules d'inhibition de la croissance (sémaphorines, protéines inhibitrices de la myéline) (Hanbali et al., 2004).

Dans les modèles animaux de neuropathies diabétiques le traitement avec C1 améliore la cystopathie, les vitesses de conduction nerveuses et l'hypoalgésie associées au diabète (Watanabe and Miyagawa, 2002; Tamura et al., 2006). Ces observations nous ont conduit à tester le C1 sur la lignée de souris CnD1-Luc après induction d'un diabète.

Les souris CnD1-Luc permettent de suivre la survenue d'une neuropathie diabétique suite à l'injection de STZ. L'étude présentée dans la publication n°1 nous a conduit à proposer ces souris pour évaluer les effets bénéfiques de composés neuroprotecteurs dans des modèles de neuropathies.

Objectifs. L'objectif de cette étude a été de montrer que le traitement de souris diabétiques avec le C1 était capable de reverser l'induction de luciférase. Puis, par des mesures des vitesses de conduction, nous avons confirmé l'amélioration de l'état neuropathique, indiquant que le modèle transgénique développé est adapté pour des tests biologiques de composés neuroprotecteurs.

2. Résultats

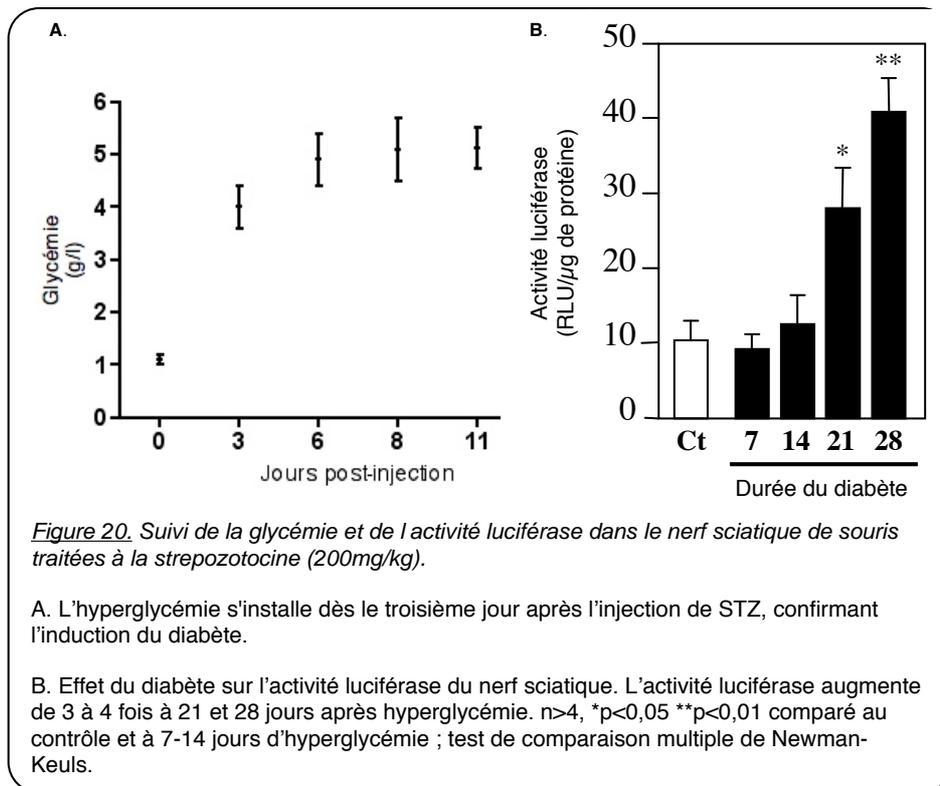
1. Cinétique d'induction de l'activité luciférase.

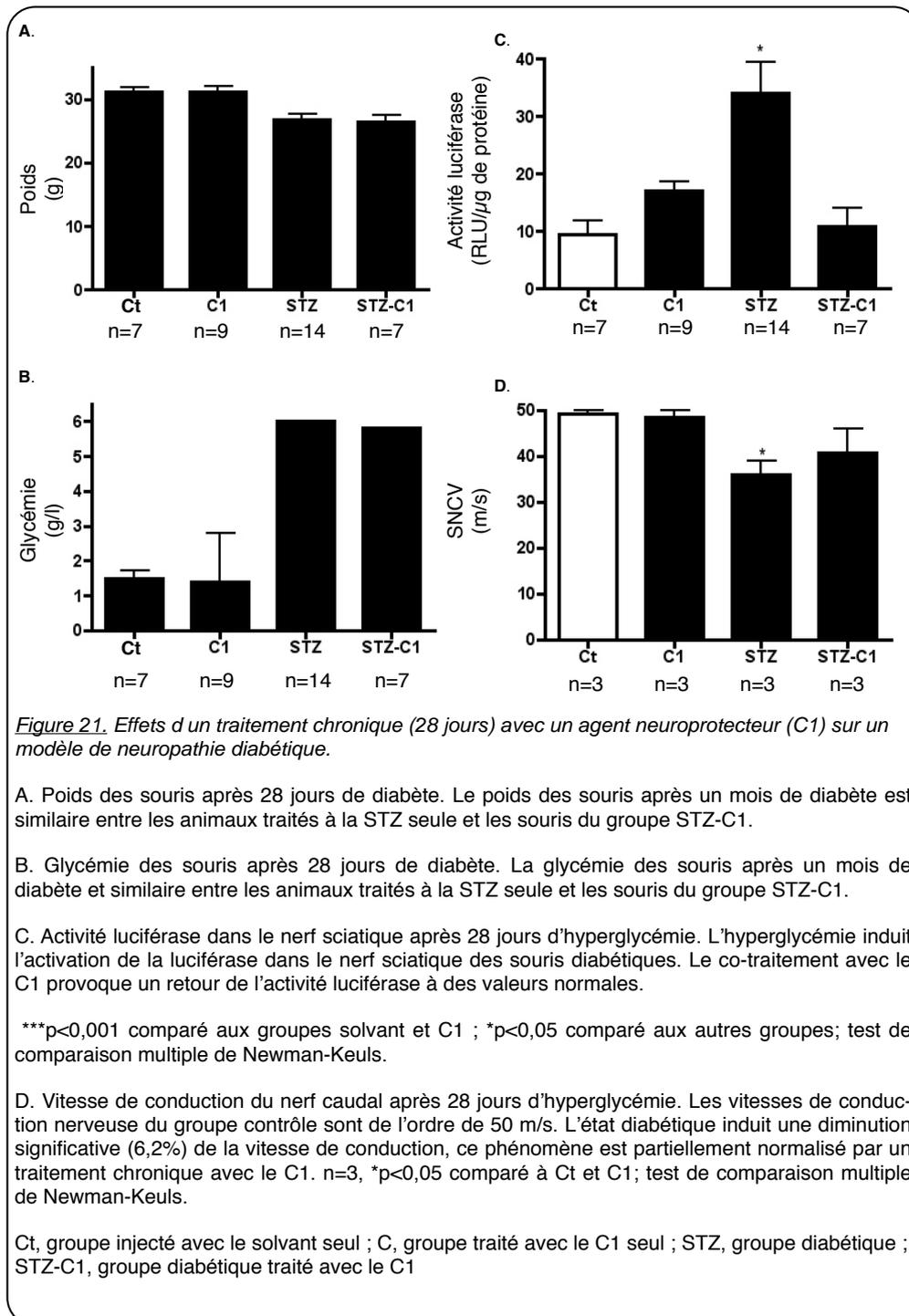
Après injection de STZ, l'hyperglycémie s'installe en moins de trois jours (4 fois supérieure à la normale) puis augmente progressivement pour atteindre des concentrations autour de 5 à 6 g/l durant toute la durée de l'étude (Fig. 20A et 21B).

Le diabète ainsi produit s'accompagne d'une augmentation d'activité luciférase dans les nerfs sciatiques de souris CnD1-Luc dès la 3^{ème} semaine. Cette induction atteint des valeurs quatre fois supérieures à la normale après 28 jours de diabète (Fig. 20B). L'analyse de l'activité luciférase dans les ganglions rachidiens à 28 jours de diabète tend à augmenter mais ne montre aucune différence significative (Ct=128±2 RLU/μg et STZ=230±48,8 RLU/μg ; non représenté).

2. Effet d'un traitement chronique de C1 sur l'activité luciférase et la vitesse de conduction nerveuse de souris diabétiques

- *Influence d'un traitement chronique de C1 sur l'activité luciférase lors d'une neuropathie diabétique.* L'activité luciférase dans le nerf sciatique est significativement augmentée chez des souris diabétiques depuis 3 semaines (Fig. 21C). Afin d'évaluer l'effet du C1 sur cette induction, des souris non diabétiques ont été traitées avec ce composé durant toute la durée de l'expérience. Les résultats





montrent que le C1 seul ne stimule pas l'activité luciférase. Quand ce composé est injecté à des souris diabétiques pour une période de 28 jours, l'activité luciférase se normalise à des valeurs identiques au groupe contrôle (Fig. 21C), sans modification de l'état diabétique (Fig. 21A-B).

- *Influence d'un traitement chronique de C1 sur les vitesses de conduction nerveuse lors d'une neuropathie diabétique.* Après trois semaines de traitement avec le solvant (Ct) ou le C1, les vitesses de conduction du nerf caudal enregistrées sont normales et indifférenciables ($SNCV^{Ct}=49,6\pm 0,8$; $SNCV^{C1}=48,5\pm 1$). Les souris traitées uniquement à la STZ présentent une réduction de la SNCV de plus de 6% par rapport à leur valeur initiale. Cette diminution est significative comparée aux deux groupes contrôles ($SNCV^{STZ}=35,8\pm 3$). Les souris du groupe STZ-C1 ont des vitesses de conduction intermédiaires ($SNCV^{STZ-C1}=40,8\pm 4,9$; Fig. 21D). L'analyse histologique des nerfs sciatiques ne révèle aucune anomalie de l'architecture structurale du nerf (Fig. 22).

3. Effet du C1 sur la perte de poids et la glycémie de souris diabétiques

Au cours de la durée de l'expérience (28 jours), la masse corporelle des animaux contrôles a augmenté d'environ 5%. Les animaux du groupe STZ et ceux du groupe STZ-C1 ont perdu respectivement 8 et 4% de leur poids. A l'issue de l'expérience leur masse corporelle sont comparables (Fig. 21A). La glycémie des animaux diabétiques n'est pas modifiée par le traitement (Fig. 21B).

4. Effet d'une semaine de traitement de C1 sur l'augmentation d'activité luciférase associée à la compression nerveuse

Chez les animaux traités avec le solvant, la compression nerveuse induit une augmentation de l'activité luciférase dans le nerf lésé à 8 jours post-lésion. Le traitement d'animaux avec du C1 durant la semaine qui suit la compression ne modifie pas l'activité luciférase liée à la dégénérescence Wallérienne (Fig. 23).

3. Discussion

Les neuropathies diabétiques sont associées à des processus de démyélinisation-remyélinisation intenses qui dépendent de la prolifération des CS (Almhanna et al., 2002). Après l'induction d'un diabète dans la lignée de souris transgénique CnD1-Luc, cette prolifération peut être suivie par des dosages luminométriques rapides, reflets de l'induction de CnD1 dans les CS.

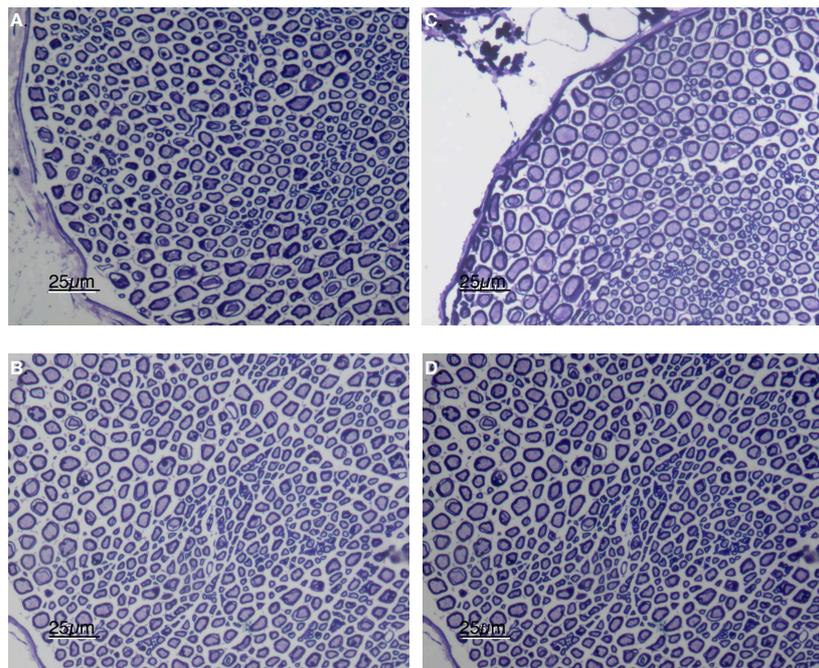


Figure 22. Analyse histologique de nerfs sciatiques d'animaux diabétiques traités ou non au C1 (28 jours).

L'analyse histologique de coupes transversales de nerf sciatique (400X) contre-colorées au bleu de toluidine ne révèle aucune différence flagrante entre les animaux contrôles (A.), traités au C1 (B.), diabétiques (C.) et diabétiques traités au C1 (D.)

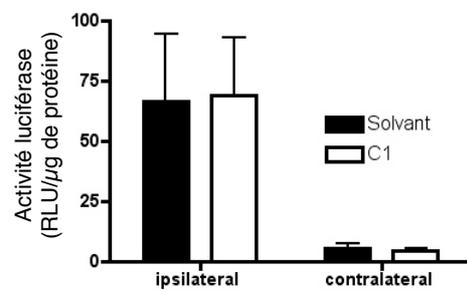


Figure 23 Effet d'un traitement chronique de C1 sur l'activité luciférase du nerf sciatique une semaine après compression nerveuse.

Influence d'une semaine de traitement au C1 sur l'induction de l'activité luciférase mesurée 8 jours après compression. La compression nerveuse induit une augmentation massive de l'activité luciférase dans le nerf lésé. Les valeurs obtenues sont comparables entre les deux groupes examinés. n=4, test-t de Student.

L'activité luciférase dans les nerfs de souris CnD1-Luc permet de tester des composés neuroprotecteurs

Le traitement de souris CnD1-Luc diabétiques avec le C1 normalise l'activité luciférase du nerf sciatique sans modifier ni le poids ni corriger l'hyperglycémie des souris (Fig. 21). Pour vérifier que la normalisation de l'activité luciférase est indicateur d'amélioration de l'état neuropathique, nous avons effectué des mesures de vitesse de conduction nerveuse, une technique classique d'évaluation des neuropathies diabétiques. De manière similaire à l'activité luciférase, le C1 normalise ce paramètre mais de manière plus modeste (Fig. 21). Ces résultats montrent que les souris CnD1-Luc sont utilisables pour tester des agents neuroprotecteurs et confirment les études antérieures décrivant un rôle bénéfique du C1 dans les neuropathies diabétiques (amélioration de l'hypoalgésie diabétique et diminution de la latence motrice distale du nerf sciatique) (Watanabe and Miyagawa, 2002; Tamura et al., 2006). Les résultats obtenus indiquent également que ce composé est efficace dans les phases précoces de la pathologie, alors qu'aucune modification flagrante de la structure du nerf n'est encore décelable (Fig. 22).

Influence du C1 sur la prolifération des CS

La diminution d'activité luciférase observée conjuguée à la normalisation des vitesses de conduction suggèrent que la prolifération des CS en réponse au diabète est inhibée par le traitement au C1. L'origine de cette normalisation pourrait provenir d'un effet inhibiteur du C1 sur la prolifération de ces cellules. Pour répondre à cette question nous avons réalisé une compression nerveuse, connue pour stimuler la division des CS. Suite à cette lésion l'activité mitotique des CS, qui atteint un maximum entre 8 et 17 jours (Atanasoski et al., 2001), n'est pas affectée par le C1 (Fig. 23). Ces données, conformément à une étude antérieure (Gonzalez de Aguilar et al., 2001), indiquent que le C1 n'a pas d'effet anti-prolifératif. Il est alors possible que ce phénomène soit lié à une atténuation des processus de démyélinisation.

Les mécanismes à l'origine de cette neuroprotection sont encore inconnus mais plusieurs hypothèses sont à envisager. Le C1 a des propriétés de type "neurotrophiques": il favorise la survie des neurones *in vivo* et *in vitro* et stimule l'élongation des neurites en culture (Borg et al., 1990; Gonzalez de Aguilar et al., 2001). Cet alcool gras à longue chaîne carbonée est capable de mobiliser les stocks de calcium du milieu extracellulaire et stimule l'exocytose (Girlanda-Junges et al., 2000; Gonzalez de Aguilar et al., 2001; Jover et al., 2005). L'hypothèse la plus vraisemblable émerge d'une étude récente montrant que le C1 possède des effets spécifiques pro-régénératifs sur les axones (Hanbali et al., 2004). La capacité du C1 à passer outre les effets des protéines inhibitrices de la croissance axonale (Hanbali et al., 2004) combinée à ses propriétés neurotrophiques pourraient expliquer les améliorations observées dans ce modèle de neuropathie diabétique.

Conclusion

Ce travail expérimental confirme que les souris CnD1-Luc sont d'un intérêt particulier pour évaluer les effets de molécules potentiellement neuroprotectrices. Cette étude souligne également la haute sensibilité de ce système d'évaluation en comparaison aux autres techniques d'évaluation. D'un point de vue mécanistique, cette étude suggère que la combinaison des propriétés neurotrophiques et pro-régénératives du C1 atténuent le degré de dégénérescence nerveuse (et la démyélinisation conséquente) induite par un diabète, aboutissant à une diminution de la prolifération des CS. Cette hypothèse nécessiterait d'être étoffée par des études morphologiques encore non disponibles en cours de réalisation.

IV. Expression de la cycline D1 dans les motoneurones adultes & apoptose neuronale

Contexte

L'élucidation des mécanismes fondamentaux de l'apoptose neuronale est de grande importance pour comprendre la physiopathologie de maladies neurodégénératives. Pour analyser ce processus de dégénérescence dans les MN, plusieurs paradigmes sont utilisés. L'axotomie ou la compression néonatale du nerf sciatique provoque une mort des MN spinaux à l'origine de ce nerf (Lowrie et al., 1994; Li et al., 1998). La caractérisation de cette mort cellulaire a révélé une apoptose neuronale associée à des mécanismes d'excitotoxicité glutamatergique (Lawson and Lowrie, 1998). En revanche, chez les animaux adultes, les neurones sont résistants à un tel stress (Lowrie et al., 1994), suggérant la mise en place de mécanismes de protection. L'avulsion, une lésion plus sévère, génère une mort de MN même chez l'animal adulte et ressemble fortement à l'apoptose (Martini et al., 1995). Dans le système nerveux, les neurones en différenciation terminale sont en phase de quiescence. De nombreuses études ont malgré tout révélé que la machinerie du cycle cellulaire, en particulier ses régulateurs précoces, peut être activée dans les neurones sujets à l'apoptose (Krantic et al., 2005). Parmi ces régulateurs, la CnD1 est une molécule d'intérêt. *In vivo*, l'activation transcriptionnelle de la CnD1 a été identifiée dans les neurones apoptotiques (Timsit et al., 1999) aboutissant à l'accumulation de la protéine, et à l'activation de sa sous-unité catalytique, la Cdk4 (Sakurai et al., 2000). En réponse, cette kinase phosphoryle Rb aboutissant à la dé-répression d'E2F initiant l'apoptose. Ces mécanismes sont activés dans les MN après ischémie médullaire (Sakurai et al., 2000) mais aussi chez les patients atteints de SLA (Ranganathan and Bowser, 2003) et dans un modèle murin de cette maladie (Nguyen et al., 2003).

Résultats

Disposant de la lignée de souris CnD1-Luc, nous avons souhaité nous intéresser à la régulation de la CnD1 dans la moelle épinière lombaire après une compression nerveuse. Tout d'abord nous avons réalisé une étude luminométrique qui a révélé une activation transcriptionnelle de la CnD1, restreinte au côté de moelle lombaire ipsilatéral à la lésion. Cette activation est transitoire et se produit entre 4 et 8 jours post-lésion, elle est accompagnée d'une accumulation de la protéine. Ensuite la localisation cellulaire de la CnD1 a été déterminée dans les segments de moelle épinière correspondants au nerf sciatique (L3-L5). La CnD1 est présente dans les noyaux de MN mais la quantification effectuée indique que ce phénomène n'est pas suffisant pour induire une perte de ces cellules, même 30 jours

après la compression nerveuse. Cette observation nous a conduit à vérifier si la CnD1 est fonctionnelle dans les MN grâce à sa liaison à la sous-unité catalytique Cdk4, qui en retour active la machinerie du cycle cellulaire. Pour cela, des immunomarquages ont été réalisés contre la forme phosphorylée de Rb, la CnD1 et la ChAT (Fig. 24). La colocalisation cellulaire entre la ChAT et la CnD1 confirment formellement que cette protéine est présente dans les MN. Ces résultats montrent également que la CnD1 et la forme phosphorylée de Rb sont colocalisés dans les noyaux d'un nombre conséquent de MN. Ces données prouvent pour la première fois que l'accumulation de CnD1 et l'activation des effecteurs de la phase G1 dans le noyau d'un neurone post-mitotique ne sont pas suffisant pour induire les phases d'exécution de l'apoptose.

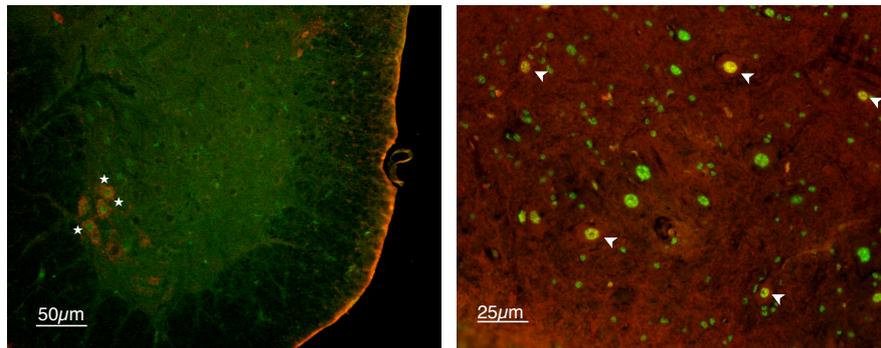


Figure 24. Localisation de la cycline D1 et de la forme phosphorylée de Rb dans la corne antérieure de moelle épinière de souris, 4 jours après compression nerveuse.

A. Immunomarquage dirigé contre la CnD1 et la ChAT dans la moelle épinière lombaire (L3-L5) de souris, quatre jours après compression nerveuse (200X). La CnD1 (vert) est exprimée dans la majorité des noyaux (★) des MN identifiés par la ChAT (rouge).

B. Localisation de la CnD1 (rouge) et de la forme phosphorylée de Rb (vert) dans la corne antérieure de la moelle épinière lombaire (L3-L5) de souris, quatre jours après compression nerveuse (400X). Les grosses cellules étoilées qui expriment la forme phosphorylée de Rb peuvent également exprimer la CnD1 (rouge). Dans ce cas, la co-localisation nucléaire est parfaite (tête de flèche).

Publication n°2 - Cyclin D1 expression is not sufficient to induce motor neuron death in adult mice after a sciatic nerve crush

Frédérique RENE*, Bastien FRICKER*, Jose-Luis GONZALEZ DE AGUILAR and Jean-Philippe LOEFFLER

*FR and BF contributed equally to this work.

Neurotoxicology research, *en révision*

**CyclinD1 expression is not sufficient to induce motor neuron death
in adult mice after sciatic nerve crush.**

René F. **, Fricker B. *, Gonzalez de Aguilar J.L. and Loeffler J.P.

INSERM, U-692, Laboratoire de Signalisations Moléculaires et Neurodégénérescence,
Strasbourg, F-67085, France

Université Louis Pasteur, Faculté de médecine, UMRS692, Strasbourg, F-67085, France

* RF and FB contributed equally to this work.

*Corresponding author: f_rene@neurochem.u-strasbg.fr, INSERM, U-692, Laboratoire de
Signalisations Moléculaires et Neurodégénérescence, Strasbourg, F-67085, France

Phone (+33)390243091

Fax (+33)390243065

Running Title: motor neurons and cyclin D1

Key Words: CyclinD1, sciatic nerve crush, motor neuron, cell death

ABSTRACT.

Neuronal apoptosis is considered as an aborted attempt of post-mitotic neurons to re-enter cell cycle. One of the cell-cycle proteins induced in this process is cyclin D1 (CD1), a key protein that allows progression through G1/S phase. However, the active participation of CD1 in neuronal apoptosis remains controversial. Since adult motor neurons are more resistant to apoptosis than post-natal motor neurons, we wondered whether a mild stress such as a transient sciatic nerve crush is sufficient to induce CD1 and apoptosis of adult motor neurons. By using reporter transgenic mice expressing the luciferase gene under control of CD1 promoter, we showed that in response to a transient nerve crush, CD1 is transcriptionally activated in spinal cord 4 and 8 days after crush in the side ipsilateral to the lesioned nerve. Increased transcription is associated with an increase in mRNA and CD1 protein. By using immunohistochemistry, we showed that CD1 immunoreactivity is mainly located in the nucleus of motor neurons and at a lower level in the cytoplasm. However, this strong activation of CD1 within motor neurons is not sufficient to induce motor neurons death in adult mice.

INTRODUCTION

Identifying the mediators and mechanisms responsible for neuronal death is critical to understand the pathogenesis of neurodegenerative diseases. In the nervous system, a distinctive property of terminally differentiated neurons is their irreversible escape from the cell cycle. However, a growing body of *in vitro* and *in vivo* evidence indicates that components of the cell-cycle machinery become activated in neurons subjected to apoptotic stimuli and play required roles in their death (Liu and Greene 2001, Krantic *et al.*, 2005). In many experimental paradigms as well as in human neurodegenerative diseases, the inappropriate expression or activation of cell cycle-related proteins is associated with neuron death (Greene *et al.*, 2004). Involvement of particular cell cycle proteins and the extent of progression into the cell cycle vary depending on the nature of the apoptotic stimulus and the maturity or type of neuron (Becker and Bonni 2004).

Amongst these cell cycle proteins, growing evidence suggests that cyclin D1 (CD1), an early regulator of the cell cycle progression, plays a pivotal role in the death of postmitotic neurons (reviewed by Liu and Greene, 2001). For instance, CD1 is induced in dying neurons in association with an increase of cyclin D1-dependent kinase activity. Furthermore, the inhibition of cyclin D-dependent kinase promotes the survival of primary sympathetic and cortical neurons as well as motor neurons (for review see Greene *et al.*, 2004, Appert-Collin *et al.*, 2006). It has been proposed that CD1 is associated with motor neuron death.

Motor neuron apoptosis occurs in humans with ALS and after spinal cord trauma but the underlying mechanisms are poorly understood. Recently, a technique of sciatic nerve avulsion has been developed to modelize motor neuron death in adult mice (Martin *et al.*, 1999). This peripheral axotomy leads to a slow gradual cell death of nerve-injured motor neurons. However the loss of motor neurons after a milder injury such as transient crush is still discussed. In order to study whether CD1 is activated in motor neurons after sciatic nerve crush and to see whether this lesion correlates with neuronal death, we generated a new transgenic model expressing the luciferase gene as reporter gene under control of the CD1 promoter. In association with histological approaches, we show a strong induction of CD1 in motor neurons at the

transcriptional and protein levels in response to a crush of the sciatic nerve. However, this robust induction is not sufficient *per se* to induce neuronal death, even a month after injury.

MATERIAL AND METHODS

Animals

All experimental procedures were carried out according to the current European Union rules for the care and the use of laboratory animals, and under control of authorized person.

Generation of *cd1-luc* transgenic mice

A 3.7 kb fragment containing the human cyclinD1 promoter fused to the firefly luciferase coding sequence was excised from the parental vector -1745CD1LUC (Albanese *et al.* 1995, kind gift of G. Pestell, USA) by BamH1 digestion to excise plasmid sequence. The linearized fragment was gel-purified and injected into pronuclei of FVB/N mice strain one cell embryos (Janvier, France). Founder and F1 animals were identified by southern-blot analysis. Offspring of the F2 generation and onward were genotyped by PCR analysis by using forward primer 5'-TTCCATCTTCCAGGGATACG-3' and reverse primer 5'-GTGTTCGTCTTCGTCCCAGT-3'. All experiments were performed on adult transgenic male mice (3-4 months old, 30-40g) maintained in animal facilities under controlled environment (23±2°C, 12-hours light/dark cycle, food and water *ad libitum*).

Sciatic nerve crush.

The right sciatic nerve of animals anaesthetized with ketamin/xylazin (5mg/kg-100mg/kg) was exposed at the mid-thigh level. Sciatic nerve was crushed for 30s with a fine forceps. Skin incision was sutured, and animals were allowed to recover. Left sciatic nerve served as internal control. Sham-operated mice served as control.

Luciferase Assay

Distal stumps of crushed nerve or spinal cord segments (L3-L5 lumbar segments dissected longitudinally to separate the side ipsi- from the contra-lateral side of the lesion, or total T3-T5 thoracic segments) were extracted on ice with 100µL of lysis buffer (Promega) and centrifuged at 15000rpm for 10 min. Protein concentration in the resultant supernatant was measured with a BCA-protein Assay Kit (Pierce, Rockford, IL, USA). Five µl of the supernatant was mixed with 50 µl of Luciferase Assay Reagent, and the amount of light product was measured with a

luminometer (Berthold, France). Luciferase activity was represented as a relative luminescence unit (RLU) per μg protein.

RT-PCR

Two micrograms of total RNA was reverse transcribed using 200U MoMuLV reverse transcriptase and 0.5 μg random primers (Promega, Charbonnières, France). After PCR amplification, products were separated with a 2% agarose gel, and visualized by ethidium bromide staining. 18S mRNA level was used as internal control. PCR primers were as follows: murine cyclin D1 reverse primer: 5'-ATGCTGGTTTTTGCCTGAAG-3'; forward primer 5'-TTGTCCCAATCTCCTTGTC-3'. 18S: reverse primer: 5'-CGTCTGCCCTATCAACTTTCG-3'; forward primer 5'-TCCTTGGATGTGGTAGCCG-3'.

Western-Blotting

Tissues were homogenized in PBS containing 1% igepal, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1%SDS, 0.5% aprotinin, 5mM DTT and 1mM PMSF. Homogenates were then boiled for 5 min and sonicated for 30s. After centrifugation, equal amount s of protein, according to BCA protein assay (Pierce), were electrophoresed through a 10% SDS-polyacrylamide gel. Separated proteins were then electrotransferred to nitrocellulose membrane (0.2 μm , Biorad). Gel loading and transfert onto nitrocellulose membrane were checked by red ponceau staining. Membranes were blocked for 1h at room temperature with blocking buffer (TBST: 100mMTris-HCl, 0.9% NaCl, 0.05% Tween20 pH 8 containing 5% non fat milk powder) and incubation with a mouse anti -cyclinD1 antibody (DCS6 clone, Sigma) diluted at 1/200 in blocking buffer was performed overnight at 4°C. Membranes were washed 3 times with TBST and incubated 2h at room temperature with a horseradish peroxydase-coupled anti-mouse antibody (Jackson laboratories) diluted 1/1000 in blocking buffer. After washing 3 times with TBST, detection was carried out with enhanced chemiluminescence detection.

Histological Analysis and immunohistochemistry.

Animals were deeply anesthetized and perfused with 4% buffered paraformaldehyde. Lumbar spinal cords were dissected, further fixed for 24 h at 4°C, and cryoprotected in a 20% sucrose solution or stored in PBS at 4°C. The lumbar spinal cord regions corresponding to segments L3–L5 were cut on a cryostat into 20 μm thick sections and stained with 1% toluidine blue in 5% sodium borate. Neuronal counts were performed at a magnification of x200 in the ventral

horns of 8-12 nonadjacent sections per animal (three to five mice per group). For the cyclinD1 staining, 40 μ m thick vibratome sections were performed. Free-floating sections were microwaved 3x5 min in citrate buffer 10mM pH6 and endogeneous peroxydase were inactivated 10 min in presence of 3% H_2O_2 in PBS. After 30 min permeabilization in PBS containing 1% triton X-100 followed by 30 min incubation in PBS containing 5% horse serum and 0.1% triton X-100, sections were incubated overnight at room temperature with a rabbit polyclonal antibody against CyclinD1 (AB16663, Abcam) 1/100 in PBS containing 0.1% triton X-100. After rinsing, sections were incubated for 1h at room temperature with a donkey anti-rabbit biotinylated (Jackson laboratories) and detected with ABC system (Vector).

Statistics

Data were expressed as means \pm SEM. Statistical significance was determined either by one-way ANOVA followed by Student's t test or by Neuman-Keuls test.

RESULTS.

Validation of transgene expression after sciatic nerve crush.

The CD1-Luc mice were generated by pronuclear injection of linearized BamH1 fragment obtained from the -1745CD1LUC parental vector (Albanese *et al.*, 1995). This fragment corresponded to the -1745 bp of human CD1 promoter driving the firefly luciferase gene (figure 1A). In this model, luciferase activity is correlated with the transcriptional activation of endogeneous CD1 gene. In order to verify the functionality of our transgene in this newly generated mice line, we used the well-characterized model of Wallerian degeneration observed in the distal stump of the sciatic nerve after a transient crush. In this model, Atanasoski *et al.* (2001) have previously shown by northern-blot analysis an increase of CD1 mRNA 4 days after crush. Based on this data, we have measured the luciferase activity in the distal stump of the sciatic nerve 4 days post-crush (DPC). As shown in figure 1, the luciferase activity is 3-4 fold increased in the distal stump of the crushed sciatic nerve compared to the contralateral unlesioned nerve, demonstrating the reliability of this system to measure rapidly the transcriptional activation of CD1 gene.

Evolution of Cyclin D1 expression in spinal cord after sciatic nerve crush.

To investigate the expression of CD1 in the spinal cord in this lesional model, we measured the luciferase activity (Figure 2A), as well as the mRNA (Figure 2B) and protein levels (Figure 2C) of CD1 in the L3-L5 lumbar spinal cord segment at different times after crush. As shown on figure 2A, a peak of transcriptional activity corresponding to a 4-fold increase is reached 4 days after crush in the side ipsilateral to the lesion compared to the contralateral side. During this period, an induction is also seen in the contralateral side compared to the control sham-operated mice. This induction probably reflected a more general modification of the global activity of the spinal cord in response to the injury. This high transcriptional activity of CD1 promoter is maintained until 8 days prior to return to basal level three weeks after crush. As expected, this transcriptional activation of the CD1 gene measured by luminometry is correlated with an increased level of CD1 mRNA (Figure 2B) and protein (Figure 2C).

Cellular localization of Cyclin D1 in spinal cord after sciatic nerve crush.

We next asked whether the induction of this cell-cycle gene was linked to motor neuron stress in response to sciatic nerve injury. To answer this question, we performed CD1 immunostaining. As shown in figure 3A, a basal nuclear staining of small cells is found in both sides of the spinal cord. However, one can noticed a strong increase of motor neuron immunoreactivity within the side of the crushed sciatic nerve compared to the unlesioned side. 4DPC, approximately half of the motor neurons in the contralateral side of the crush displayed a faint to moderate immunoreactivity to CD1, the other half being devoid of staining (Figure 3A2, B). In contrast, in the ipsilateral side of the crush, all motor neurons were CD1 positive and the immunoreactivity is strongly increased within the nucleus and cytoplasm compared to the contralateral side (Figure 3A3, B). As already suggested by the low level of luciferase activity one month after crush, the CD1 staining in motor neurons was not detectable anymore a month following crush (Figure 3B). We then wondered whether this increase of CD1 in motor neurons was sufficient to induce their death. To evaluate the potential loss of motor neurons in response of CD1 induction, motor neurons were counted in ipsi- and contralateral sides of L3-L5 spinal cord sections 30 days after crush. As shown on figure 3C, the number of motor neurons is unchanged in the ipsilateral side compared to the unlesioned side.

DISCUSSION

In this study, we have shown that a transient sciatic nerve crush in adult mice induced robust CD1 expression in motor neurons. Although CD1 was accumulated in the nucleus of these neurons, no motor neuronal loss was observed even one month after crush. Earlier studies had revealed that the apoptotic death of embryonic post-mitotic motor neurons maintained *in vitro*, or under pathological conditions, such as amyotrophic lateral sclerosis, is typically associated with induction of CD1 (Nguyen *et al.*, 2003, Appert-Collin *et al.*, 2006). This induction of CD1 at the transcriptional and protein levels has also been reported to occur in other neuronal cell types both *in vitro* and *in vivo* (Greene *et al.*, 2004).

The execution of the apoptotic program in motor neurons is of particular interest because these cells display different sensitivity to apoptosis depending on the age of the animal. Indeed, nerve crush or axotomy rapidly induce the death of newborn or young postnatal motor neurons. In contrast, adult motor neurons seem to have developed protective mechanisms that make them more resistant to injury and slow down the apoptotic process in response to axotomy generated after avulsion (Martin *et al.*, 1999). Because CD1 re-expression appears as a hallmark of apoptosis, we tested here whether a mild peripheral lesion to adult motor neurons could induce CD1 expression and subsequently cell death. We showed that CD1 was strongly re-expressed at the transcriptional and protein levels in adult motor neurons, and that this overexpression was associated with a clear nuclear accumulation. Several studies have reported that neuronal apoptosis is associated with a redistribution of CD1 from the cytoplasm to the nucleus (Padmanabham *et al.*, 1999, Ino and Shiba 2001). In addition, nuclear overexpression of CD1 provoked the death of cultured cortical neurons (Sumrejkanchanakij *et al.*, 2003). In our hands, the observed nuclear accumulation was not sufficient to induce motor neuron death as shown by identical numbers of motor neurons in the ipsilateral and contralateral side to the lesion. This holds true as long as one month after nerve crush, at a time when CD1 was not expressed anymore and the transcriptional activity of the CD1 promoter had returned to baseline. Thus, despite the transient re-expression of cyclin D1, and its nuclear localization, this resumption of the cell cycle in an adult motor neuron is not sufficient to induce the whole process of apoptosis.

The mechanisms whereby motor neurons can overcome the burst of CD1 expression occurring at one week post-crush and do not enter the apoptotic process remains to be elucidated. This is particularly important because a better understanding of such a protective mechanisms would be helpful to prevent neuronal apoptosis in neurodegenerative diseases. From an experimental point of view, this result shows that CD1 is not an obligatory histological marker of motor neuron death.

In this study, we have used a new reporter transgenic mouse line in which luciferase gene expression is under the control of the CD1 promoter. Thus, we can easily measure the transcriptional activation of CD1 in response to apoptotic stimuli, but also during the reactivation of Schwann cell proliferation occurring in Wallerian degeneration (figure 1B). This phenomenon, which strictly depends on CD1 expression, at least in the adult (Atanasoski *et al.*, 2001), is very common in most of peripheral neuropathies. Our model could therefore be useful to test the neurotoxic effects of chemical compounds, such as streptozotocin or cisplatin, on peripheral nerves. Preliminary studies from our laboratory support this view. Finally, these mice could also be used to study in a simple manner the neuroprotective potential of new drugs that could prevent Schwann cell proliferation, and hence axon pathology, in neuropathic processes.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr. G. Pestell for the generous gift of the -1745CD1-luc construct. BF was supported by a grant from the Ministère de l'Education Nationale, de la Recherche et de la Technologie. JPL's laboratory is supported by the Association Française contre les Myopathies (AFM, France), the Association pour la Recherche sur la Sclérose Latérale Amyotrophique (ARS, France) and AREMANE.

REFERENCES

- Albanese C, J Johnson, G Watanabe, N Eklund, D Vu, A Arnold, RG Pestell (1995) Transforming p21ras mutants and c-Ets-2 activate the cyclin D1 promoter through distinguishable regions. *J Biol Chem* **270**, 23589-23597.
- Appert-Collin A, B Hugel, R Levy, N Niederhoffer, G Coupin, Y Lombard, P Andre, P Poindron, JP Gies (2006) Cyclin dependent kinase inhibitors prevent apoptosis of postmitotic mouse

- motoneurons. *Life Sci* **79**, 484-490.
- Atanasoski S, S Shumas, C Dickson, SS Scherer, U Suter (2001) Differential cyclin D1 requirements of proliferating Schwann cells during development and after injury. *Mol Cell Neurosci* **18**, 581-592.
- Becker EB, A Bonni. (2004) Cell cycle regulation of neuronal apoptosis in development and disease. *Prog Neurobiol* **72**, 1-25.
- Greene LA, SC Biswas, DX Liu (2004) Cell cycle molecules and vertebrate neuron death: E2F at the hub. *Cell Death Differ* **11**, 49-60.
- Ino H, T Chiba (2001) Cyclin-dependent kinase 4 and cyclin D1 are required for excitotoxin-induced neuronal cell death in vivo. *J Neurosci* **21**, 6086-6094.
- Krantic S, N Mechawar, S Reix, R Quirion (2005) Molecular basis of programmed cell death involved in neurodegeneration. *Trends Neurosci* **28**, 670-676.
- Liu DX, LA Greene (2001) Neuronal apoptosis at the G1/S cell cycle checkpoint. *Cell Tissue Res* **305**, 217-228.
- Martin LJ, A Kaiser, AC Price (1999) Motor neuron degeneration after sciatic nerve avulsion in adult rat evolves with oxidative stress and is apoptosis. *J Neurobiol* **40**, 185-201.
- Nguyen MD, M Boudreau, J Kriz, S Couillard-Despres, DR Kaplan, JP Julien (2003) Cell cycle regulators in the neuronal death pathway of amyotrophic lateral sclerosis caused by mutant superoxide dismutase 1. *J Neurosci* **23**, 2131-2140.
- Padmanabhan J, DS Park, LA Greene, ML Shelanski (1999) Role of cell cycle regulatory proteins in cerebellar granule neuron apoptosis. *J Neurosci* **19**, 8747-8756.
- Sumrejkanchanakij P, M Tamamori-Adachi, Y Matsunaga, K Eto, MA Ikeda (2003) Role of cyclin D1 cytoplasmic sequestration in the survival of postmitotic neurons. *Oncogene* **22**, 8723-8730.

LEGENDS

Figure 1 : Validation of *CD1-luc* transgenic line.

A: Schematic representation of transgene used to generate the *CD1-Luc* mice.

B: Measurement of luciferase activity in the distal stump of sciatic nerve 4 days after crush. Note the 4-fold induction of luciferase activity in the distal fragment ipsilateral to the crush (iL) compared to the control corresponding to the same region of the unlesioned contralateral sciatic nerve (cL). Values are the means \pm SEM, n=8. ***p<0.001, Student's t test.

Figure 2: Induction of Cyclin D1 (CD1) at the transcriptional and protein levels in L3-L5 lumbar spinal cord segment after sciatic nerve crush.

A: Time course of luciferase activity reflecting the transcriptional activation of CD1 gene. Note the 5-6 fold induction of luciferase activity in the side ipsilateral to the crush (iL) compared to the contralateral side (cL) after 4 and 8 days post crush (DPC). Ct: control, T : thoracic segment. Values are the means \pm SEM. n are indicated in brackets. ### p<0.001 vs Ct, *** p<0.001 vs cL or T at the same time point, Anova-1, followed by Neuman-Keuls test .

B: RT-PCR detection of CD1 (top panel) or 18S (lower panel) mRNA in spinal cord of control (Ct) or crushed (C) mice 8 DPC. Note the induction of CD1 mRNA in L3-L5 lumbar spinal cord 8 days after sciatic nerve crush. Lower panel show the level of 18S mRNA as internal standard.

C : Western-blot analysis of CD1 protein level in the side ipsilateral to the crush (iL) compared to the contralateral side (cL) 8 DPC.

Figure 3 :

A: Immunohistochemical detection of CD1 in L3-L5 lumbar spinal cord 4 days after sciatic nerve crush. CD1 is strongly increased in motoneurons located at the side of the crush. A1: Low magnification of spinal cord section. A2-A3: Magnifications of the insets. Few motoneurons displayed a nuclear immunoreactivity to CD1 in the side contralateral to the lesion (A2) whereas all the motoneurons are immunoreactive to CD1 with a nuclear and cytoplasmic labelling in the side ipsilateral to the crush (A3). Bar: A: 200 μ m, B-C: 50 μ m.

B-C: Induction of CD1 in motoneurons is not correlated with motoneurons loss. B: Number of CD1 immunoreactive motoneurons 4 and 30 days post crush (DPC) in the L3-L5 lumbar spinal cord. Note the 2- fold increase of immunoreactive motoneurons in the side ipsilateral to the crush (iL) compared to the contralateral side (cL) 4 DPC. C: Number of motoneurons in each hemi-spinal cord (ipsilateral: iL, contralateral: cL). The sciatic nerve crush does not induce motoneuron loss in adult mice. Values are the mean \pm SEM, 8-12 sections/mice (n=3-5). *** p<0.001 vs cL at the same time point, student's t test.

Figure 1

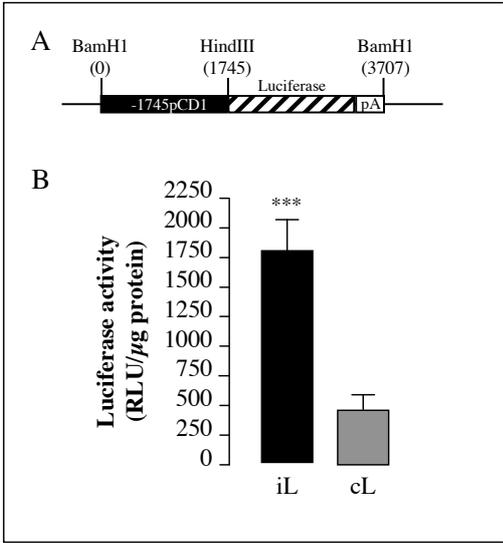


Figure 2

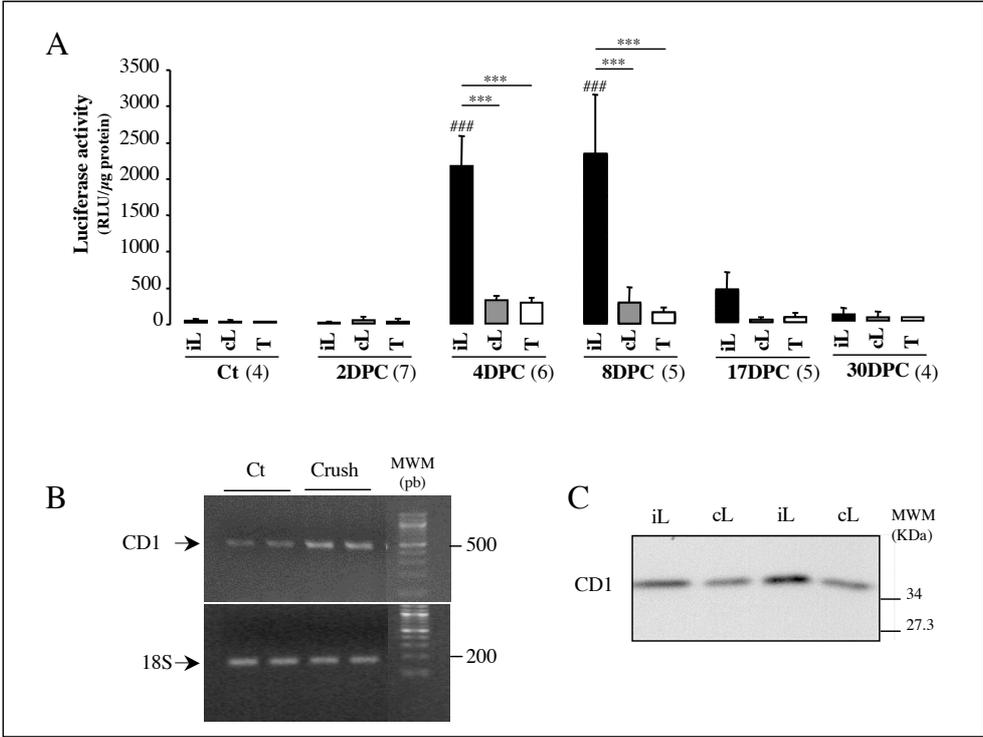
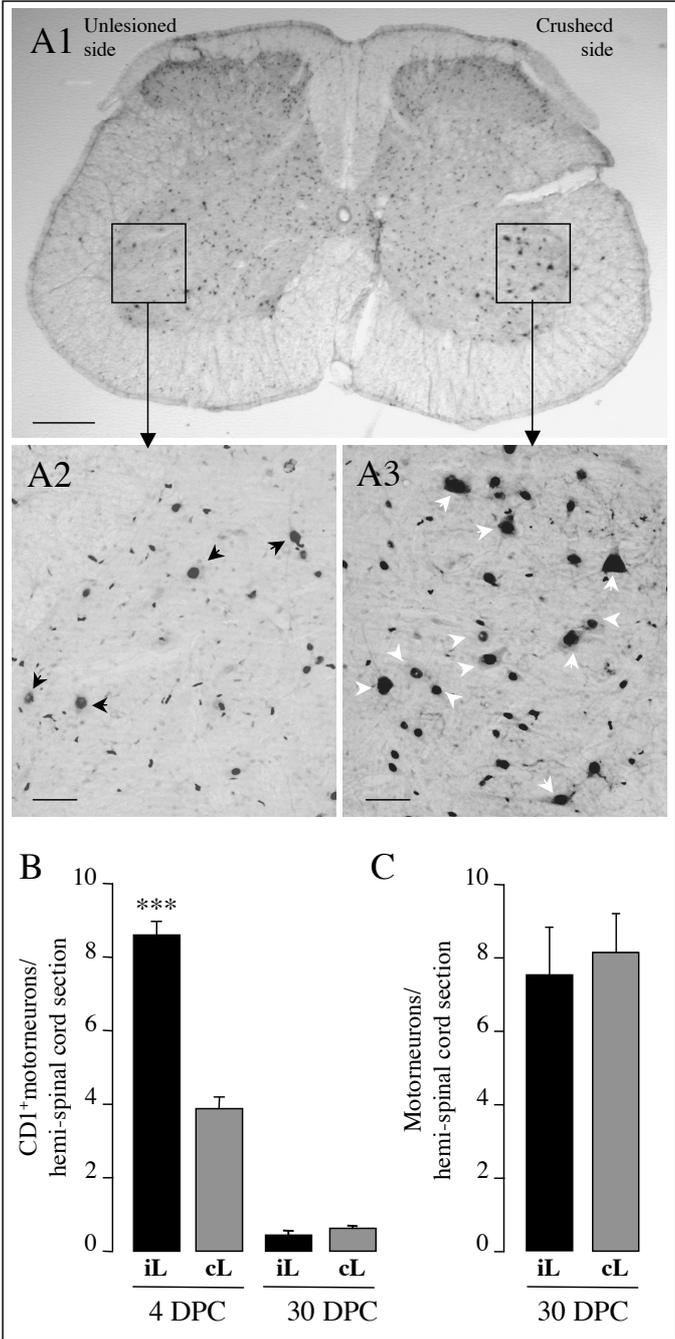


Figure 3



V. Aperçu des collaborations à d'autres projets

Publication n°3 - Mouse models with motor neurone defects as a tool for deciphering ALS : applications, limits and future challenges

Andoni ECHANIZ-LAGUNA, Bastien FRICKER, Anissa FERGANI, Jean-Philippe LOEFFLER & Frédérique RENE.

Book : New animal models of human neurological disease, "Biovalley Monographs".

Edited by P. Poindron and P. Piguet 2007, *sous presse*

Poindron P, Piguet P (eds): New Animal Models of Human Neurological Diseases.
BioValley Monogr. Basel, Karger, 2008, vol 2, pp 11–38

.....

Mouse Models with Motor Neuron Defects as a Tool for Deciphering Amyotrophic Lateral Sclerosis

Applications, Limits and Future Challenges

Andoni Echaniz-Laguna^{a, b}, Bastien Fricker^a, Anissa Fergani^a,
Jean-Philippe Loeffler^a, Frédérique René^a

^aLaboratoire de Signalisations Moléculaires et Neurodégénérescence,
INSERM U-692, Faculté de Médecine, Université Louis-Pasteur, et

^bDépartement de Neurologie, Hôpital Civil, Strasbourg, France

Abstract

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a neurodegenerative disorder of unknown origin affecting primarily motor neurons. The observation that point mutations in the copper/zinc superoxide dismutase (SOD1) gene are present in some patients with autosomal dominant familial ALS (FALS) has led to the generation of transgenic mice expressing various forms of *SOD1* mutants. The transgenic mouse models overexpressing high levels of mutant *SOD1* develop motor neuron disease, and the toxicity of mutant *SOD1* seems to be unrelated to copper-mediated catalysis but rather to the tendency of a fraction of mutant SOD1 proteins to form misfolded protein species and toxic aggregates. Involvement of cytoskeletal components in ALS pathogenesis is supported by several mouse models of motor neuron disease with neurofilament abnormalities and with genetic defects in microtubule-mediated transport. Implication of vascular factors in ALS is supported by mouse models of motor neuron disease with defects in the vascular endothelial growth factor gene. Mutations in the *ALS2* gene are responsible for autosomal recessive forms of FALS, and *Als2* knockout mice exhibit motor dysfunction and deficits in endosome trafficking. This review focuses on the applications, limits and prospects of mouse models with motor neuron defects as tools for understanding ALS.

Copyright © 2008 S. Karger AG, Basel

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a devastating adult-onset human disease of unknown origin in which degeneration of the spinal cord and cortical motoneurons leads to paralysis, respiratory depression and death. The causes for most cases of ALS are unknown, and the clinical course is highly variable, suggesting that multiple factors underlie the disease mechanism.

Publication n°4 - Increased peripheral lipid clearance in an animal model of amyotrophic lateral sclerosis

Anissa FERGANI, Hugues OUDART, Jose-Luis GONZALEZ DE AGUILAR, Bastien FRICKER, Frédérique RENE, Jean-François HOCQUETTE, Vincent MENINGER, Luc DUPUIS & Jean-Philippe LOEFFLER

April 2007,

Journal of Lipid Research

Increased peripheral lipid clearance in an animal model of amyotrophic lateral sclerosis

Anissa Fergani, Hugues Oudart, Jose-Luis Gonzalez De Aguilar, Bastien Fricker, Frédérique René, Jean-François Hocquette, Vincent Meininger, Luc Dupuis, Jean-Philippe Loeffler

Journal of lipid research, 2007, Vol. 48, Pages 1571-1580

Page 151 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Les utilisateurs peuvent consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://dx.doi.org/10.1194/jlr.M700017-JLR200>

La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services :

<http://www-sicd.u-strasbg.fr/services/peb/>

DISCUSSION

DISCUSSION & PERSPECTIVES

La littérature rapporte un nombre croissant de désordres neurologiques associés à une dégénérescence axonale précoce : maladie d'Alzheimer et de Parkinson, maladies à poly-glutamine, maladies du motoneurone et neuropathies périphériques (Raff et al., 2002). Cette dégénérescence axonale semble d'ailleurs mieux corrélée aux troubles que présentent les patients qu'à la perte des corps cellulaires. Cette idée est renforcée par les résultats décevants des démarches thérapeutiques (inhibiteurs d'apoptose, anti-glutamatergique, facteurs neurotrophiques), expérimentales et précliniques, qui ciblent la survie des corps cellulaires (Raff et al., 2002; Coleman, 2005). Quand cette destruction axonale prend place dans les nerfs périphériques, elle est associée à une séquence d'événements connue sous le nom de dégénérescence Wallérienne. Ce processus se traduit par l'élimination active des débris axonaux et myéliniques suivie d'une prolifération active des CS fournissant un environnement permissif pour la régénération nerveuse. Dans le cas des neuropathies périphériques, et quelle que soit leur origine (axonale, CS ou indéterminée), l'activation des CS semble être une constante. Parmi les molécules qui gouvernent la prolifération des CS, la CnD1 a un rôle essentiel dans l'initiation du cycle cellulaire. La stratégie mise en oeuvre au cours de cette thèse s'intéresse particulièrement à la régulation transcriptionnelle de cette protéine dans le contexte des neuropathies périphériques expérimentales, et secondairement à l'implication de ce régulateur du cycle cellulaire dans l'apoptose neuronale. Cette partie du manuscrit a pour objectifs :

- i.) de faire le point sur la régulation transcriptionnelle de la CnD1 et la prolifération des CS dans différents contextes de neuropathies périphériques,
- ii.) de discuter l'intérêt des souris CnD1-Luc pour évaluer l'intensité des processus pathologiques dans les nerfs périphériques,
- iii.) de modérer l'intervention des régulateurs du cycle cellulaire dans l'apoptose neuronale.

I. Expression de la CnD1 et prolifération des cellules de Schwann : un dénominateur commun aux neuropathies expérimentales

Avant que nous n'entreprenions nos travaux expérimentaux, l'analyse bibliographique des modèles animaux de neuropathies périphériques révélait l'importance des CS dans la pathogénie et dans la réponse cellulaire à ces différents contextes physiopathologiques. S'il est frappant de constater à quel point la prolifération des CS est commune à ces différentes situations pathologiques, cette observation suggère également l'importance de la CnD1 dans ce processus étroitement associé à l'activation du cycle cellulaire.

A.CnD1 et dégénérescence Wallérienne associée à la compression nerveuse

Depuis la description d'Auguste Waller, la nature précise de la dégénérescence Wallérienne a longtemps été débattue. Plusieurs facteurs ont compliqué l'étude de la dégénérescence axonale aboutissant à des résultats contradictoires. Le type de lésion pratiquée, la souche d'animaux utilisée, leur âge, la température et les critères examinés constituaient une première série de problèmes méthodologiques auxquels se heurtaient ces études. L'incapacité, principalement technique, de suivre individuellement un axone sur une longue distance était à la source d'un biais supplémentaire. Certains auteurs décrivaient une dégénérescence rétrograde, d'autres une progression antérograde ou encore une désintégration axonale non orientée (Malbouisson et al., 1984; Lunn et al., 1990; George and Griffin, 1994) et aucune étude précise n'existe à ce jour concernant la réponse proliférative des CS. Les travaux de cette thèse ont permis de suivre avec précision le phénomène d'activation des CS au cours de la dégénérescence Wallérienne, les principales informations obtenues sont discutées dans ce chapitre.

Prolifération progressive et orientée des CS dans les phases précoces de la dégénérescence Wallérienne.

- *La prolifération des cellules de Schwann progresse en direction centripète.* Au cours des travaux réalisés sur le nerf sciatique après une compression nerveuse nous avons mis en évidence un gradient croissant proximo-distal d'activité luciférase 48h après lésion. Quatre jours après la

compression, l'activité luciférase augmente et progresse en direction centripète pour atteindre une intensité homogène, restreinte au fragment distal du nerf (Fig. 18). Après avoir localisé la CnD1 spécifiquement dans les noyaux des CS (Fig. 19), nous suggérons que la compression nerveuse induit une prolifération précoce des CS qui débute à l'extrémité distale du nerf avant de s'intensifier et se généraliser à l'ensemble du tronc distal.

- *La réponse proliférative des cellules de Schwann, un reflet de la dégénérescence axonale.* Dans les modèles de lésion nerveuse il est admis que la dégénérescence axonale dépend de mécanismes intrinsèques suggérant que la réponse des cellules gliales est un événement secondaire lié aux interactions axone-glie (Glass et al., 1993). Cette observation suggère que la prolifération des CS ainsi évaluée reflète la progression de la dégénérescence axonale. Dans une étude récente, Beirowski et coll. ont utilisé la lignée de souris transgéniques Thy1-YFP comme outil expérimental pour déterminer la nature de la dégénérescence axonale (Beirowski et al., 2005). Ces souris expriment la protéine fluorescente YFP dans 3% des axones myélinisés, moteurs et sensoriels, permettant de suivre individuellement un prolongement sur de longues distances. L'utilisation de souris d'âge comparable et d'un protocole de compression similaire à notre étude nous permet de faire une comparaison qualitative entre les résultats. Beirowski et coll. montrent qu'à partir de 40h post-compression, la fragmentation axonale progresse comme une vague, localisée le long d'axones individuels, en direction rétrograde et de manière asynchrone. A 44h, la fragmentation axonale s'est uniformément généralisée dans le tronc distal.

Ces résultats et les nôtres indiquent que les CS prolifèrent selon le même schéma que l'axone qui dégénère. Le léger décalage cinétique de l'expression de la CnD1 (plus tardif) suggère que la prolifération des CS est régulée par la perte d'interaction neurone-glie, et dans ce cas précis la perte de contact entre l'axone qui dégénère et les CS qui l'entourent.

Expression soutenue de la CnD1 et régénération nerveuse après une compression

Les mécanismes de repousse axonale débutent dès la première semaine (Azzouz et al., 1996; Beirowski et al., 2005) et se poursuivent jusqu'à la réinnervation effective des plaques motrices, un mois après compression (Magill et al., 2007). Durant cette période, nos résultats indiquent que l'activité luciférase s'intensifie fortement et se généralise à l'ensemble du nerf (8 et 17 jours post-lésion) avant de revenir à un niveau basal (30 jours post-lésion, Fig. 18).

- *Augmentation d'activité luciférase dans le segment distal à la lésion.* Nous ne disposons pas encore des résultats qui permettent d'affirmer que la CnD1 est restreinte aux CS à 8 et 17 jours post-compression. Néanmoins de nombreuses informations de la littérature ainsi que nos résultats électrophysiologiques suggèrent fortement que là encore l'activité luciférase est corrélée à la prolifération des CS :

- i. nos données électrophysiologiques montrent que la réinnervation fonctionnelle des plaques motrices se produit entre 8 et 17 jours post-compression (Fig. 16),
- ii. l'axone en croissance stimule la division des CS par un cocktail de molécules prolifératives. La sécrétion de Nrg (GGF), de NGF et BDNF dans les nerfs lésés ainsi que l'expression de leur récepteur respectif sur les CS ont été rapportées (Stoll and Muller, 1999),
- iii. des études de microscopie indiquent également que la majorité des CS acquiert un phénotype indifférencié entre la 1^{ère} et la 2^{ème} semaine post-compression (Magill et al., 2007), phénomène indispensable à leur division.

La prolifération locale de cellules du système immunitaire est envisageable mais semble peu probable. La littérature indique que la plupart des cellules immunitaires impliquées dans la dégénérescence Wallérienne sont recrutées depuis les vaisseaux sanguins (Stoll and Muller, 1999; Avellino et al., 2004), écartant la possibilité d'une prolifération locale de ces cellules.

Le retour de l'activité luciférase à des valeurs normales (30 jours post-compression) coïncide avec la poursuite de la myélinisation alors que les axones ont atteint leur cibles (Fig. 16 et 18) (Magill et al., 2007).

- *Généralisation de l'activité luciférase au segment proximal.* Là encore nous ne disposons pas d'études immunohistologiques qui permettent de trancher formellement quant à la localisation cellulaire de la CnD1. Néanmoins ces résultats sont les premiers qui révèlent une induction soutenue de la CnD1 dans le fragment en amont du site de lésion (Fig. 18). Cette observation pourrait être expliquée par une prolifération des CS en amont de la lésion suivie de leur migration en direction distale (Torigoe et al., 1996; Yfanti et al., 2004), mécanisme que l'on observe lors du développement et indispensable à la myélinisation (Franz, 1990).

Si la localisation cellulaire de la CnD1 est encore incertaine dans la phase de régénération qui fait suite à la dégénérescence Wallérienne, il n'en reste pas moins que l'activation de la luciférase est liée à la prolifération des CS aux temps les plus précoces. Tout porte à croire que l'activité luciférase de 8 à 30 jours post-lésion est également le reflet d'une prolifération intense de ces cellules. Grâce à l'utilisation de la lignée CnD1-Luc, cette étude fournit une première description cinétique détaillée des mécanismes d'activation des CS, en accord avec les études contemporaines sur la dégénérescence Wallérienne. Ces résultats confirment également l'importance du dialogue réciproque axone-glie dans la régulation de la prolifération cellulaire et de la différenciation terminale.

B. La lignée de souris transgéniques CnD1-Luc : un outil d'évaluation des neuropathies périphériques

Ce chapitre discute de la stratégie développée au cours de cette thèse, fondée sur l'évaluation de l'intensité des processus pathologiques des nerfs périphériques par utilisation de la lignée de souris CnD1-Luc. Au-delà des résultats en partie déjà discutés, ce chapitre sera consacré :

- i.) aux apports des souris CnD1-Luc dans la physiopathologie de neuropathies périphériques,
- ii.) aux avantages techniques que présente ce modèle.

Apports de la lignée CnD1-Luc dans le neuropathies périphériques

La prolifération des CS, dépendante de la CnD1, qui participe au remodelage nerveux a déjà été discutée abondamment. Outre le suivi de l'activité mitotique induite par la perte de contacts axone-glie, la CnD1 est également surexprimée dans les neuropathies démyélinisantes d'origine diabétique. Cette observation est peu surprenante, les mécanismes de démyélinisation/remyélinisation sont déjà bien documentés (Kalichman et al., 1998). En revanche, l'étude que nous avons réalisée sur les ganglions rachidiens, toujours à 28 jours de diabète, ne révèle aucune induction d'activité luciférase. Si on considère l'activation de la CnD1 comme un marqueur de stress tissulaire, ces résultats portent à croire que les altérations fonctionnelles touchent le nerf avant les ganglions sensoriels. Cet argumentaire est renforcé par l'idée que dans le premier mois de diabète les modifications électrophysiologiques se mettent en place avant les premiers signes de dégénérescence nerveuse (Walker et al., 1999). Dans ce cas, l'activation transcriptionnelle de CnD1 ne dépend pas de la perte de contact axone-glie. L'augmentation précoce du contenu métabolique des nerfs (glucose, fructose et sorbitol) ainsi que la réponse proliférative exacerbée des CS en condition d'hyperglycémie nous permettent de proposer que l'augmentation de la CnD1 est associée à l'activation des CS en réponse aux altérations métaboliques précoces.

Si dans ces deux situations expérimentales l'augmentation d'activité luciférase n'est pas surprenante, ce pronostic est moins évident pour les neuropathies induites par les composés platinés où la prolifération des CS n'a pas encore été décrite. Les cellules à activité mitotique intense sont plus sensibles au *cis*-platine, il induit des dommages à l'ADN et oriente les cellules vers l'apoptose. Cette propriété est utilisée en chimiothérapie pour cibler les cellules tumorales. L'apoptose des CS induite par le *cis*-platine est un événement bien documenté. Cette observation révèle une prolifération préalable des CS, suggérant que l'activité luciférase pourrait y être corrélée. L'importance de ces cellules dans la pathogénie de ces neuropathies est soulignée par l'absence d'apoptose des neurones sensoriels aux doses utilisées (Ozturk et al., 2005). La mort de ces cellules, encore discutée, semble secondaire et se produit avec des traitements plus intenses (Fischer et al., 2001). Les traitements avec des molécules à activité trophique pour les CS (GGF, NGF et LIF) réduisent la sévérité des neuropathies au *cis*-platine (Ohtsubo et al., 1995; Tredici et al., 1999; ter Laak et al., 2000; Pradat et

al., 2002). Au regard de ces informations il semble que les CS soient une cible privilégiée des composés platinés, la perturbation de l'interaction avec l'axone pourrait en retour être à l'origine de la dystrophie axonale observée à des stades plus avancés.

Avantages techniques du système CnD1-Luc

La luciférase de ver luisant est une protéine à durée de vie courte (quelques minutes) idéale pour les études de régulation transcriptionnelle. Ce système rapporteur est capable de fournir une quantification linéaire précise sur une gamme de plusieurs Log. Il offre l'avantage de suivre des inductions massives aussi bien que très discrètes.

- *Seuil de détection.* Les souris CnD1-Luc permettent d'avoir accès à la régulation transcriptionnelle de la CnD1 dans des échantillons contenant peu de matériel biologique. D'un point de vue technique, l'extraction d'ARN depuis des fragments de nerf sciatique de souris n'est pas évidente. La dissection de nerf (fragment de 2-3mm) réalisée pour l'étude spatio-temporelle de l'expression de la luciférase indique que ce système est tout à fait propice à ce type d'études et encore loin de ses limites de détection.

- *Sensibilité, sélectivité et rapidité.*

In vitro, les études luminométriques sont beaucoup plus sensibles que la méthode de RT-PCR (Fig. 14). *In vivo*, l'activité luciférase utilisée comme index d'atteinte des nerfs semble plus sensible que les autres méthodes d'évaluation. Lors du développement des neuropathies périphériques, la diminution de SNCV 2 semaines après induction du diabète n'est pas encore significative ($SNCV^{ct}=52,5\pm 3,8$; $SNCV^{STZ}=45\pm 1,4$) alors que l'induction d'activité luciférase l'est déjà (Fig. 21). La sensibilité de cette méthode d'évaluation est renforcée par nos travaux sur les neuropathies médicamenteuses. La dose cumulée de *cis*-platine (20mg/kg) et la durée du traitement (3 semaines) sont, d'après la littérature, parmi les plus faibles étudiées. En clinique le carboplatine est utilisé à des doses au moins 3 fois plus élevées que le *cis*-platine (communication personnelle, JP.F. -*Centre régional de lutte contre le cancer*-) mais reconnu pour sa neurotoxicité modérée. Après un traitement de courte durée avec des doses faibles de *cis*-platine ou de carboplatine (dose cumulée adaptée depuis les pratiques cliniques), l'induction de luciférase est significative confirmant la capacité de ce système à détecter des dommages nerveux dans les phases les plus précoces (publication n°1). En accord avec la biodistribution des dérivés platinés, l'induction de luciférase reste restreinte au SNP et confirme la spécificité de ce système.

L'intérêt de ce modèle réside dans sa capacité d'identifier la mise en place de processus pathologiques de manière extrêmement précoce et spécifique des lésions tissulaires attendues, mais également dans sa capacité à fournir une alternative économe en temps et en coût aux études

histologiques. Le niveau d'expression extrêmement faible de CnD1 dans les tissus nerveux le rend particulièrement adapté pour les études des pathologies du SNP et SNC (De Falco, Fedele et al. 2004).

III. Actualisation du lien entre la cycline D1 et l'apoptose neuronale

L'identification des mécanismes fondamentaux de la mort neuronale est essentielle à la compréhension des maladies neurodégénératives. Il paraît évident à l'heure actuelle, qu'en réponse à un stress exogène, les neurones post-mitotiques en état de différenciation terminale peuvent activer la machinerie du cycle cellulaire aboutissant à la mort cellulaire (Krantic et al., 2005). Cette voie d'initiation de l'apoptose est impliquée dans plusieurs contextes pathologiques : apoptose des neurones des ganglions rachidiens après un traitement au *cis*-platine, des neurones moteurs dans la sclérose latérale amyotrophique, après un accident vasculaire cérébrale

Dans le cas de dommages mécaniques infligés aux nerfs périphériques, les neurones moteurs d'animaux nouveau-nés entrent en apoptose. La contribution des régulateurs du cycle cellulaire n'a jamais été analysée dans ce modèle classique d'apoptose moto-neuronale.

Lors de nos travaux sur la dégénérescence Wallérienne après compression nerveuse, nous avons mis en évidence une activation transcriptionnelle de la CnD1 restreinte au côté ipsi-latéral des segments de moelle épinière contenant les MN des membres inférieurs (L3-L5). En accord avec la littérature, nous avons vérifié que les MN sont résistants à un tel stress. De manière surprenante nous avons mis en évidence pour la première fois une translocation nucléaire de la CnD1 dans les MN (publication n°2), sans mort neuronale associée. L'identité de MN a également été confirmée par nos études récentes de double marquage ChAT-CnD1 (Fig. 24). Ainsi, l'expression nucléaire de la CnD1 *per se* est insuffisante pour induire la mort de MN adultes.

Mais si la localisation nucléaire de la CnD1 est indispensable à sa fonctionnalité, la progression du cycle cellulaire est limitée par d'autres régulateurs. En particulier, la progression à travers la phase G1 nécessite la phosphorylation de Rb par la Cdk-4. Cette étape limitante dans l'initiation de l'apoptose est sous le contrôle d'inhibiteurs endogènes de Cdk (CKI) (Katchanov et al., 2001). Pour vérifier que l'augmentation de CnD1 dans les MN active les effecteurs de la transition G1-S, nous avons récemment réalisé des immuno-marquages dirigés contre la forme phosphorylée de Rb. La figure 24

indique que toutes les cellules CnD1⁺ présentent une co-localisation nucléaire parfaite entre la CnD1 et la forme phosphorylée de Rb.

Ces résultats prouvent qu'en réponse à une lésion modérée du nerf sciatique (compression transitoire), la machinerie du cycle cellulaire est activée dans les MN correspondants. Ce stress est suffisant pour induire l'expression de CnD1 dans les MN, sa translocation nucléaire, son association avec ses sous-unités catalytiques (Cdk4-6) qui en retour permet la phosphorylation de Rb et aboutit à la dé-répression d'E2F, mais n'aboutit cependant pas à la mort des neurones.

L'ensemble de ces résultats suggère que les neurones adultes, contrairement aux stades précoces du développement post-natal, développent un "blocage" de l'apoptose en aval de la dé-répression d'E2F. Ce mécanisme, non identifié, permet de rendre les neurones plus résistants aux stress exogènes et à la mort cellulaire consécutive. Cette hypothèse est en accord avec l'idée que les neurones jeunes sont plus sensibles aux processus de mort cellulaire, mécanisme indispensable à l'élimination des neurones excédentaires lors de la maturation du système nerveux.

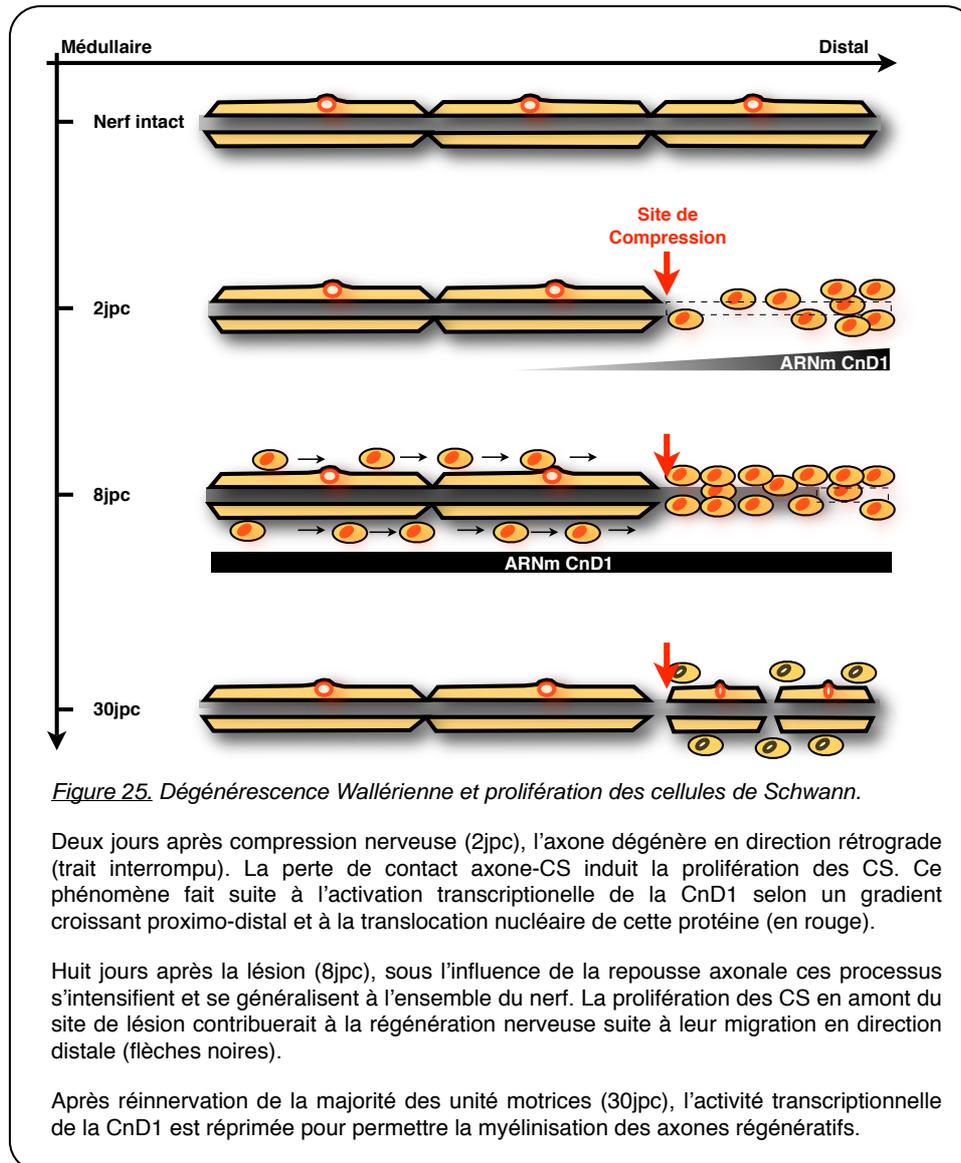
IV. Conclusion et perspectives

La compréhension des mécanismes qui sous-tendent la dégénérescence axonale pourrait avoir des retombées majeures dans le domaine des neuropathies périphériques et des maladies neurodégénératives. La dégénérescence Wallérienne est une situation biologique qui permet d'avoir accès aux mécanismes fondamentaux de la destruction axonale. Depuis la description qu'en avait fait A. Waller à l'aide de techniques histologiques classiques, il a fallu attendre plus d'un siècle pour identifier formellement la nature de la dégénérescence axonale. Cette clarification a nécessité l'avènement des techniques de génie génétique et l'utilisation de souris transgéniques permettant de visualiser la fragmentation axonale. A l'image de cette approche, la lignée de souris transgénique CnD1-Luc nous a permis d'établir avec précision la réponse proliférative des CS, étroitement dépendante d'un dialogue réciproque avec l'axone (Fig. 25). Cette lignée, combinée aux technologies d'imagerie à bas seuil, permettrait d'obtenir, non plus une image à un temps défini, mais la réponse dynamique d'un tissu vivant. La bio-imagerie transcutanée est d'ores et déjà développée pour visualiser les modifications morphologiques dans les nerfs superficiels.

Par ailleurs, le développement et l'optimisation de molécules à visée thérapeutique nécessite d'évaluer leur activité biologique *in vivo*. La conception de tests biologiques adéquats est un champ d'investigation important pour la recherche biomédicale, académique et industrielle. Les résultats obtenus indiquent que la lignée Cn1-Luc peut être utilisée à ces fins, en particulier pour le criblage

d'agents neuroprotecteurs sur des modèles de neuropathies périphériques. Ce modèle semble également adapté à l'évaluation d'effets secondaires sur le système nerveux. Qu'elle que soit l'utilisation envisagée, l'intérêt de ce modèle de "neurotoxicologie" réside clairement dans la rapidité et la sensibilité d'évaluation ainsi que dans la réduction des coûts (réactifs et appareillage).

Alors que l'activation de mécanismes intrinsèques à l'axone sont responsables de son auto-destruction après une lésion mécanique, une signalisation rétrograde peut induire la mort des neurones spinaux selon un schéma "dying-back", en particulier chez les animaux nouveau-nés. Grâce à l'aide de nos souris nous avons montré que dans les MN adultes, pourtant résistants à cette lésion, la CnD1 est exprimée (activation transcriptionnelle et translocation nucléaire de la protéine) et les régulateurs de la transition G1-S sont activés. Cette observation se heurte à la conception actuelle selon laquelle l'initiation du cycle cellulaire est une signalisation conflictuelle pour une cellule post-mitotique hautement différenciée, l'orientant vers l'apoptose neuronale. Ces données suggèrent la mise en place, en aval de la dé-répression de Rb, d'un blocage de l'apoptose ou d'un arrêt suffisamment précoce du cycle cellulaire, permettant peut-être sa re-différenciation.



REFERENCES

REFERENCES

- Adlkofer K, Martini R, Aguzzi A, Zielasek J, Toyka KV, Suter U (1995) Hypermyelination and demyelinating peripheral neuropathy in Pmp22-deficient mice. *Nat Genet* 11:274-280.
- Akkina SK, Patterson CL, Wright DE (2001) GDNF rescues nonpeptidergic unmyelinated primary afferents in streptozotocin-treated diabetic mice. *Exp Neurol* 167:173-182.
- Al Deeb S, Al Moutaery K, Arshaduddin M, Biary N, Tariq M (2000) Attenuation of acrylamide-induced neurotoxicity in diabetic rats. *Neurotoxicol Teratol* 22:247-253.
- Albanese C, Johnson J, Watanabe G, Eklund N, Vu D, Arnold A, Pestell RG (1995) Transforming p21ras mutants and c-Ets-2 activate the cyclin D1 promoter through distinguishable regions. *J Biol Chem* 270:23589-23597.
- Almhanna K, Wilkins PL, Bavis JR, Harwalkar S, Berti-Mattera LN (2002) Hyperglycemia triggers abnormal signaling and proliferative responses in Schwann cells. *Neurochem Res* 27:1341-1347.
- Apfel SC, Arezzo JC, Brownlee M, Federoff H, Kessler JA (1994) Nerve growth factor administration protects against experimental diabetic sensory neuropathy. *Brain Res* 634:7-12.
- Appert-Collin A, Hugel B, Levy R, Niederhoffer N, Coupin G, Lombard Y, Andre P, Poindron P, Gies JP (2006) Cyclin dependent kinase inhibitors prevent apoptosis of postmitotic mouse motoneurons. *Life Sci* 79:484-490.
- Arroyo EJ, Scherer SS (2000) On the molecular architecture of myelinated fibers. *Histochem Cell Biol* 113:1-18.
- Arthur-Farraj P, Mirsky R, Parkinson DB, Jessen KR (2006) A double point mutation in the DNA-binding region of Egr2 switches its function from inhibition to induction of proliferation: A potential contribution to the development of congenital hypomyelinating neuropathy. *Neurobiol Dis* 24:159-169.
- Atanasoski S, Scherer SS, Nave KA, Suter U (2002) Proliferation of Schwann cells and regulation of cyclin D1 expression in an animal model of Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *J Neurosci Res* 67:443-449.
- Atanasoski S, Shumas S, Dickson C, Scherer SS, Suter U (2001) Differential cyclin D1 requirements of proliferating Schwann cells during development and after injury. *Mol Cell Neurosci* 18:581-592.
- Atanasoski S, Notterpek L, Lee HY, Castagner F, Young P, Ehrenguber MU, Meijer D, Sommer L, Stavnezer E, Colmenares C, Suter U (2004) The protooncogene Ski controls Schwann cell proliferation and myelination. *Neuron* 43:499-511.
- Authier N, Gillet JP, Fialip J, Eschalier A, Coudore F (2003) An animal model of nociceptive peripheral neuropathy following repeated cisplatin injections. *Exp Neurol* 182:12-20.
- Avellino AM, Dailey AT, Harlan JM, Sharar SR, Winn RK, McNutt LD, Kliot M (2004) Blocking of up-regulated ICAM-1 does not prevent macrophage infiltration during Wallerian degeneration of peripheral nerve. *Exp Neurol* 187:430-444.

- Aybar MJ, Mayor R (2002) Early induction of neural crest cells: lessons learned from frog, fish and chick. *Curr Opin Genet Dev* 12:452-458.
- Azzouz M, Kenel PF, Warter JM, Poindron P, Borg J (1996) Enhancement of mouse sciatic nerve regeneration by the long chain fatty alcohol, N-Hexacosanol. *Exp Neurol* 138:189-197.
- Baker MD (2002) Electrophysiology of mammalian Schwann cells. *Prog Biophys Mol Biol* 78:83-103.
- Beirowski B, Adalbert R, Wagner D, Grumme DS, Addicks K, Ribchester RR, Coleman MP (2005) The progressive nature of Wallerian degeneration in wild-type and slow Wallerian degeneration (WldS) nerves. *BMC Neurosci* 6:6.
- Borg J, Kesslak PJ, Cotman CW (1990) Peripheral administration of a long-chain fatty alcohol promotes septal cholinergic neurons survival after fimbria-fornix transection. *Brain Res* 518:295-298.
- Boutillier AL, Kienlen-Campard P, Loeffler JP (1999) Depolarization regulates cyclin D1 degradation and neuronal apoptosis: a hypothesis about the role of the ubiquitin/proteasome signalling pathway. *Eur J Neurosci* 11:441-448.
- Boutillier AL, Trinh E, Loeffler JP (2000) Caspase-dependent cleavage of the retinoblastoma protein is an early step in neuronal apoptosis. *Oncogene* 19:2171-2178.
- Boyle JP, Honeycutt AA, Narayan KM, Hoerger TJ, Geiss LS, Chen H, Thompson TJ (2001) Projection of diabetes burden through 2050: impact of changing demography and disease prevalence in the U.S. *Diabetes Care* 24:1936-1940.
- Britsch S, Goerich DE, Riethmacher D, Peirano RI, Rossner M, Nave KA, Birchmeier C, Wegner M (2001) The transcription factor Sox10 is a key regulator of peripheral glial development. *Genes Dev* 15:66-78.
- Brown A (2000) Slow axonal transport: stop and go traffic in the axon. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1:153-156.
- Cambier J, Masson M, Dehen H (2004) *Neurologie*.
- Cata JP, Weng HR, Lee BN, Reuben JM, Dougherty PM (2006) Clinical and experimental findings in humans and animals with chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *Minerva Anesthesiol* 72:151-169.
- Cavaletti G, Fabbrica D, Minoia C, Frattola L, Tredici G (1998) Carboplatin toxic effects on the peripheral nervous system of the rat. *Ann Oncol* 9:443-447.
- 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.
- Changeux JP (1984) *L'Homme neuronal*.
- Charles P, Tait S, Faivre-Sarrailh C, Barbin G, Gunn-Moore F, Denisenko-Nehrbass N, Guennoc AM, Girault JA, Brophy PJ, Lubetzki C (2002) Neurofascin is a glial receptor for the paranodin/Caspr-contactin axonal complex at the axoglial junction. *Curr Biol* 12:217-220.
- Chen ZL, Yu WM, Strickland S (2007) Peripheral regeneration. *Annu Rev Neurosci* 30:209-233.
- Chevalier-Larsen E, Holzbaur EL (2006) Axonal transport and neurodegenerative disease. *Biochim Biophys Acta* 1762:1094-1108.

- Chies R, Nobbio L, Edomi P, Schenone A, Schneider C, Brancolini C (2003) Alterations in the Arf6-regulated plasma membrane endosomal recycling pathway in cells overexpressing the tetraspan protein Gas3/PMP22. *J Cell Sci* 116:987-999.
- Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159.
- Christianson JA, Riekhof JT, Wright DE (2003) Restorative effects of neurotrophin treatment on diabetes-induced cutaneous axon loss in mice. *Exp Neurol* 179:188-199.
- Coleman M (2005) Axon degeneration mechanisms: commonality amid diversity. *Nat Rev Neurosci* 6:889-898.
- Cote F, Collard JF, Julien JP (1993) Progressive neuronopathy in transgenic mice expressing the human neurofilament heavy gene: a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Cell* 73:35-46.
- Court FA, Sherman DL, Pratt T, Garry EM, Ribchester RR, Cottrell DF, Fleetwood-Walker SM, Brophy PJ (2004) Restricted growth of Schwann cells lacking Cajal bands slows conduction in myelinated nerves. *Nature* 431:191-195.
- D'Urso D, Ehrhardt P, Muller HW (1999) Peripheral myelin protein 22 and protein zero: a novel association in peripheral nervous system myelin. *J Neurosci* 19:3396-3403.
- DeFalco M, V Fedele, et al. (2004) Evaluation of cyclin D1 expression and its subcellular distribution in mouse tissues. *J Anat* 205: 405-12.
- de Medinaceli L, Freed WJ, Wyatt RJ (1982) An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. *Exp Neurol* 77:634-643.
- de Recondo J (1995) *Sémiologie du système nerveux: du symptôme au diagnostic*.
- Decosterd I, Woolf CJ (2000) Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. *Pain* 87:149-158.
- Decosterd I, Allchorne A, Woolf CJ (2002) Progressive tactile hypersensitivity after a peripheral nerve crush: non-noxious mechanical stimulus-induced neuropathic pain. *Pain* 100:155-162.
- Delaney CL, Russell JW, Cheng HL, Feldman EL (2001) Insulin-like growth factor-I and over-expression of Bcl-xL prevent glucose-mediated apoptosis in Schwann cells. *J Neuropathol Exp Neurol* 60:147-160.
- Dent EW, Gertler FB (2003) Cytoskeletal dynamics and transport in growth cone motility and axon guidance. *Neuron* 40:209-227.
- Diehl JA, Zindy F, Sherr CJ (1997) Inhibition of cyclin D1 phosphorylation on threonine-286 prevents its rapid degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev* 11:957-972.
- Dowdy SF, Hinds PW, Louie K, Reed SI, Arnold A, Weinberg RA (1993) Physical interaction of the retinoblastoma protein with human D cyclins. *Cell* 73:499-511.
- Dupin E, Real C, Glavieux-Pardanaud C, Vaigot P, Le Douarin NM (2003) Reversal of developmental restrictions in neural crest lineages: transition from Schwann cells to glial-melanocytic precursors in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:5229-5233.
- Dyson N (1998) The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev* 12:2245-2262.
- El-Khodor BF, Oo TF, Kholodilov N, Burke RE (2003) Ectopic expression of cell cycle markers in models of induced programmed cell death in dopamine neurons of the rat substantia nigra pars compacta. *Exp Neurol* 179:17-27.

- Evan GI, Brown L, Whyte M, Harrington E (1995) Apoptosis and the cell cycle. *Curr Opin Cell Biol* 7:825-834.
- Feltri ML, Wrabetz L (2005) Laminins and their receptors in Schwann cells and hereditary neuropathies. *J Peripher Nerv Syst* 10:128-143.
- Ferri CC, Bisby MA (1999) Improved survival of injured sciatic nerve Schwann cells in mice lacking the p75 receptor. *Neurosci Lett* 272:191-194.
- Finn JT, Weil M, Archer F, Siman R, Srinivasan A, Raff MC (2000) Evidence that Wallerian degeneration and localized axon degeneration induced by local neurotrophin deprivation do not involve caspases. *J Neurosci* 20:1333-1341.
- Fischer SJ, McDonald ES, Gross L, Windebank AJ (2001) Alterations in cell cycle regulation underlie cisplatin induced apoptosis of dorsal root ganglion neurons in vivo. *Neurobiol Dis* 8:1027-1035.
- Franz T (1990) Defective ensheathment of motoric nerves in the Splotch mutant mouse. *Acta Anat (Basel)* 138:246-253.
- Freeman RS, Estus S, Johnson EM, Jr. (1994) Analysis of cell cycle-related gene expression in postmitotic neurons: selective induction of Cyclin D1 during programmed cell death. *Neuron* 12:343-355.
- Gao WQ, Dybdal N, Shinsky N, Murnane A, Schmelzer C, Siegel M, Keller G, Hefti F, Phillips HS, Winslow JW (1995) Neurotrophin-3 reverses experimental cisplatin-induced peripheral sensory neuropathy. *Ann Neurol* 38:30-37.
- Garratt AN, Voiculescu O, Topilko P, Charnay P, Birchmeier C (2000) A dual role of erbB2 in myelination and in expansion of the schwann cell precursor pool. *J Cell Biol* 148:1035-1046.
- George R, Griffin JW (1994) The proximo-distal spread of axonal degeneration in the dorsal columns of the rat. *J Neurocytol* 23:657-667.
- Gerbi A, Maixent JM, Barbey O, Jamme I, Pierlovisi M, Coste T, Pieroni G, Nouvelot A, Vague P, Raccach D (1999) Neuroprotective effect of fish oil in diabetic neuropathy. *Lipids* 34 Suppl:S93-94.
- Giambonini-Brugnoli G, Buchstaller J, Sommer L, Suter U, Mantei N (2005) Distinct disease mechanisms in peripheral neuropathies due to altered peripheral myelin protein 22 gene dosage or a Pmp22 point mutation. *Neurobiol Dis* 18:656-668.
- Gill JS, Windebank AJ (1998) Cisplatin-induced apoptosis in rat dorsal root ganglion neurons is associated with attempted entry into the cell cycle. *J Clin Invest* 101:2842-2850.
- Giovanni A, Wirtz-Brugger F, Keramaris E, Slack R, Park DS (1999) Involvement of cell cycle elements, cyclin-dependent kinases, pRb, and E2F x DP, in B-amyloid-induced neuronal death. *J Biol Chem* 274:19011-19016.
- Giovanni A, Keramaris E, Morris EJ, Hou ST, O'Hare M, Dyson N, Robertson GS, Slack RS, Park DS (2000) E2F1 mediates death of B-amyloid-treated cortical neurons in a manner independent of p53 and dependent on Bax and caspase 3. *J Biol Chem* 275:11553-11560.
- Girlanda-Junges C, Lutz-Bucher B, Gonzalez de Aguilar JL, Loeffler JP, Luu B (2000) 3-(15-Hydroxypentadecyl)-2,4,4-trimethyl-2-cyclohexen-1-one and its effect on neuropeptide secretion. *Bioorg Med Chem Lett* 10:2537-2539.
- Glass JD, Brushart TM, George EB, Griffin JW (1993) Prolonged survival of transected nerve fibres in C57BL/Ola mice is an intrinsic characteristic of the axon. *J Neurocytol* 22:311-321.

- Gold R, Hartung HP, Toyka KV (2000) Animal models for autoimmune demyelinating disorders of the nervous system. *Mol Med Today* 6:88-91.
- Gonzalez de Aguilar JL, Girlanda-Junges C, Coowar D, Duportail G, Loeffler JP, Luu B (2001) Neurotrophic activity of 2,4,4-trimethyl-3-(15-hydroxypentadecyl)-2-cyclohexen-1-one in cultured central nervous system neurons. *Brain Res* 920:65-73.
- Groves MJ, Schanzer A, Simpson AJ, An SF, Kuo LT, Scaravilli F (2003) Profile of adult rat sensory neuron loss, apoptosis and replacement after sciatic nerve crush. *J Neurocytol* 32:113-122.
- Gupta SK, Pringle J, Poduslo JF, Mezei C (1993) Induction of myelin genes during peripheral nerve remyelination requires a continuous signal from the ingrowing axon. *J Neurosci Res* 34:14-23.
- Hanbali M, Bernard F, Berton C, Gatineau G, Perraut M, Aunis D, Luu B, Bagnard D (2004) Counteraction of axonal growth inhibitory properties of Semaphorin 3A and myelin-associated proteins by a synthetic neurotrophic compound. *J Neurochem* 90:1423-1431.
- Hartwell LH, Weinert TA (1989) Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 246:629-634.
- Hirata H, Hibasami H, Yoshida T, Ogawa M, Matsumoto M, Morita A, Uchida A (2001) Nerve growth factor signaling of p75 induces differentiation and ceramide-mediated apoptosis in Schwann cells cultured from degenerating nerves. *Glia* 36:245-258.
- Hirokawa N, Takemura R (2004) Molecular motors in neuronal development, intracellular transport and diseases. *Curr Opin Neurobiol* 14:564-573.
- Hoozemans JJ, Bruckner MK, Rozemuller AJ, Veerhuis R, Eikelenboom P, Arendt T (2002) Cyclin D1 and cyclin E are co-localized with cyclo-oxygenase 2 (COX-2) in pyramidal neurons in Alzheimer disease temporal cortex. *J Neuropathol Exp Neurol* 61:678-688.
- Hughes RA, Cornblath DR (2005) Guillain-Barre syndrome. *Lancet* 366:1653-1666.
- Hunter T, Pines J (1994) Cyclins and cancer. II: Cyclin D and CDK inhibitors come of age. *Cell* 79:573-582.
- Iacovelli J, Lopera J, Bott M, Baldwin E, Khaled A, Uddin N, Fernandez-Valle C (2007) Serum and forskolin cooperate to promote G1 progression in Schwann cells by differentially regulating cyclin D1, cyclin E1, and p27(Kip) expression. *Glia*.
- Ino H, Chiba T (2001) Cyclin-dependent kinase 4 and cyclin D1 are required for excitotoxin-induced neuronal cell death in vivo. *J Neurosci* 21:6086-6094.
- Jessen KR, Mirsky R (2005) The origin and development of glial cells in peripheral nerves. *Nat Rev Neurosci* 6:671-682.
- Jordan-Sciutto KL, Dorsey R, Chalovich EM, Hammond RR, Achim CL (2003) Expression patterns of retinoblastoma protein in Parkinson disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 62:68-74.
- Jover E, Gonzalez de Aguilar JL, Luu B, Lutz-Bucher B (2005) Effect of a cyclohexenonic long-chain fatty alcohol on calcium mobilization. *Eur J Pharmacol* 516:197-203.
- Kahle W, Leonhardt H, Platzer W (1981) Anatomie, Système nerveux et organes de sens. 3.
- Kalichman MW, Powell HC, Mizisin AP (1998) Reactive, degenerative, and proliferative Schwann cell responses in experimental galactose and human diabetic neuropathy. *Acta Neuropathol (Berl)* 95:47-56.
- Kalil K, Dent EW (2005) Touch and go: guidance cues signal to the growth cone cytoskeleton. *Curr Opin Neurobiol* 15:521-526.

- Karsidag S, Morali S, Sargin M, Salman S, Karsidag K, Us O (2005) The electrophysiological findings of subclinical neuropathy in patients with recently diagnosed type 1 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 67:211-219.
- Katchanov J, Harms C, Gertz K, Hauck L, Waeber C, Hirt L, Priller J, von Harsdorf R, Bruck W, Hortnagl H, Dirnagl U, Bhide PG, Endres M (2001) Mild cerebral ischemia induces loss of cyclin-dependent kinase inhibitors and activation of cell cycle machinery before delayed neuronal cell death. *J Neurosci* 21:5045-5053.
- Kato N, Mizuno K, Makino M, Suzuki T, Yagihashi S (2000) Effects of 15-month aldose reductase inhibition with fidarestat on the experimental diabetic neuropathy in rats. *Diabetes Res Clin Pract* 50:77-85.
- Kennedy JM, Zochodne DW (2000) The regenerative deficit of peripheral nerves in experimental diabetes: its extent, timing and possible mechanisms. *Brain* 123 (Pt 10):2118-2129.
- Kennedy JM, Zochodne DW (2005) Impaired peripheral nerve regeneration in diabetes mellitus. *J Peripher Nerv Syst* 10:144-157.
- Kim HA, Ratner N, Roberts TM, Stiles CD (2001) Schwann cell proliferative responses to cAMP and Nf1 are mediated by cyclin D1. *J Neurosci* 21:1110-1116.
- Kim HA, Pomeroy SL, Whoriskey W, Pawlitzky I, Benowitz LI, Sicinski P, Stiles CD, Roberts TM (2000) A developmentally regulated switch directs regenerative growth of Schwann cells through cyclin D1. *Neuron* 26:405-416.
- Klann E, Dever TE (2004) Biochemical mechanisms for translational regulation in synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* 5:931-942.
- Kolta MG, Ngong JM, Rutledge LP, Pierzchala K, Van Loon GR (1996) Endogenous opioid peptide mediation of hypoalgesic response in long-term diabetic rats. *Neuropeptides* 30:335-344.
- Kranenburg O, van der Eb AJ, Zantema A (1996) Cyclin D1 is an essential mediator of apoptotic neuronal cell death. *Embo J* 15:46-54.
- Krantic S, Mechawar N, Reix S, Quirion R (2005) Molecular basis of programmed cell death involved in neurodegeneration. *Trends Neurosci* 28:670-676.
- Krarup-Hansen A, Fugleholm K, Helweg-Larsen S, Hauge EN, Schmalbruch H, Trojaborg W, Krarup C (1993) Examination of distal involvement in cisplatin-induced neuropathy in man. An electrophysiological and histological study with particular reference to touch receptor function. *Brain* 116 (Pt 5):1017-1041.
- LaBaer J, Garrett MD, et al. (1997) New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors. *Genes Dev* 11: 847-62.
- Lawson SJ, Lowrie MB (1998) The role of apoptosis and excitotoxicity in the death of spinal motoneurons and interneurons after neonatal nerve injury. *Neuroscience* 87:337-348.
- Lee MK, Marszalek JR, Cleveland DW (1994) A mutant neurofilament subunit causes massive, selective motor neuron death: implications for the pathogenesis of human motor neuron disease. *Neuron* 13:975-988.
- Lee MK, Xu Z, Wong PC, Cleveland DW (1993) Neurofilaments are obligate heteropolymers in vivo. *J Cell Biol* 122:1337-1350.
- Lee PG, Hohman TC, Cai F, Regalia J, Helke CJ (2001) Streptozotocin-induced diabetes causes metabolic changes and alterations in neurotrophin content and retrograde transport in the cervical vagus nerve. *Exp Neurol* 170:149-161.

- Li L, Houenou LJ, Wu W, Lei M, Prevette DM, Oppenheim RW (1998) Characterization of spinal motoneuron degeneration following different types of peripheral nerve injury in neonatal and adult mice. *J Comp Neurol* 396:158-168.
- Liegeois F, Connelly A, Cross JH, Boyd SG, Gadian DG, Vargha-Khadem F, Baldeweg T (2004) Language reorganization in children with early-onset lesions of the left hemisphere: an fMRI study. *Brain* 127:1229-1236.
- Liu DX, Zhang LC, Wang Q, Da CS, Xin ZQ, Wang R, Choi MC, Chan AS (2001) The application of chiral aminonaphthols in the enantioselective addition of diethylzinc to aryl aldehydes. *Org Lett* 3:2733-2735.
- Lowrie MB, Lawson SJ (2000) Cell death of spinal interneurons. *Prog Neurobiol* 61:543-555.
- Lowrie MB, Lavalette D, Davies CE (1994) Time course of motoneurone death after neonatal sciatic nerve crush in the rat. *Dev Neurosci* 16:279-284.
- Lukas J, Bartkova J, Bartek J (1996) Convergence of mitogenic signalling cascades from diverse classes of receptors at the cyclin D-cyclin-dependent kinase-pRb-controlled G1 checkpoint. *Mol Cell Biol* 16:6917-6925.
- Lunn ER, Brown MC, Perry VH (1990) The pattern of axonal degeneration in the peripheral nervous system varies with different types of lesion. *Neuroscience* 35:157-165.
- Lustig M, Zanazzi G, Sakurai T, Blanco C, Levinson SR, Lambert S, Grumet M, Salzer JL (2001) Nr-CAM and neurofascin interactions regulate ankyrin G and sodium channel clustering at the node of Ranvier. *Curr Biol* 11:1864-1869.
- Magill CK, Tong A, Kawamura D, Hayashi A, Hunter DA, Parsadanian A, Mackinnon SE, Myckatyn TM (2007) Reinnervation of the tibialis anterior following sciatic nerve crush injury: A confocal microscopic study in transgenic mice. *Exp Neurol* 207:64-74.
- Malbouisson AM, Ghabriel MN, Allt G (1984) The non-directional pattern of axonal changes in Wallerian degeneration: a computer-aided morphometric analysis. *J Anat* 139 (Pt 1):159-174.
- Malik RA, Veves A, Walker D, Siddique I, Lye RH, Schady W, Boulton AJ (2001) Sural nerve fibre pathology in diabetic patients with mild neuropathy: relationship to pain, quantitative sensory testing and peripheral nerve electrophysiology. *Acta Neuropathol (Berl)* 101:367-374.
- Martini R, Zielasek J, Toyka KV, Giese KP, Schachner M (1995) Protein zero (P0)-deficient mice show myelin degeneration in peripheral nerves characteristic of inherited human neuropathies. *Nat Genet* 11:281-286.
- Matsushime H, Roussel MF, Ashmun RA, Sherr CJ (1991) Colony-stimulating factor 1 regulates novel cyclins during the G1 phase of the cell cycle. *Cell* 65:701-713.
- Matsushime H, Ewen ME, Strom DK, Kato JY, Hanks SK, Roussel MF, Sherr CJ (1992) Identification and properties of an atypical catalytic subunit (p34PSK-J3/cdk4) for mammalian D type G1 cyclins. *Cell* 71:323-334.
- Maurel P, Salzer JL (2000) Axonal regulation of Schwann cell proliferation and survival and the initial events of myelination requires PI 3-kinase activity. *J Neurosci* 20:4635-4645.
- McDonald ES, Windebank AJ (2002) Cisplatin-induced apoptosis of DRG neurons involves bax redistribution and cytochrome c release but not fas receptor signaling. *Neurobiol Dis* 9:220-233.

- McDonald ES, Randon KR, Knight A, Windebank AJ (2005) Cisplatin preferentially binds to DNA in dorsal root ganglion neurons in vitro and in vivo: a potential mechanism for neurotoxicity. *Neurobiol Dis* 18:305-313.
- Michailov GV, Sereda MW, Brinkmann BG, Fischer TM, Haug B, Birchmeier C, Role L, Lai C, Schwab MH, Nave KA (2004) Axonal neuregulin-1 regulates myelin sheath thickness. *Science* 304:700-703.
- Migheli A, Piva R, Casolino S, Atzori C, Dlouhy SR, Ghetti B (1999) A cell cycle alteration precedes apoptosis of granule cell precursors in the weaver mouse cerebellum. *Am J Pathol* 155:365-373.
- Minshull J, Sun H, Tonks NK, Murray AW (1994) A MAP kinase-dependent spindle assembly checkpoint in *Xenopus* egg extracts. *Cell* 79:475-486.
- Muller H, Lukas J, Schneider A, Warthoe P, Bartek J, Eilers M, Strauss M (1994) Cyclin D1 expression is regulated by the retinoblastoma protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:2945-2949.
- Nave KA, Salzer JL (2006) Axonal regulation of myelination by neuregulin 1. *Curr Opin Neurobiol* 16:492-500.
- Nguyen MD, Boudreau M, Kriz J, Couillard-Despres S, Kaplan DR, Julien JP (2003) Cell cycle regulators in the neuronal death pathway of amyotrophic lateral sclerosis caused by mutant superoxide dismutase 1. *J Neurosci* 23:2131-2140.
- Ohtsubo M, Theodoras AM, Schumacher J, Roberts JM, Pagano M (1995) Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1-to-S phase transition. *Mol Cell Biol* 15:2612-2624.
- Osuga H, Osuga S, Wang F, Fetni R, Hogan MJ, Slack RS, Hakim AM, Ikeda JE, Park DS (2000) Cyclin-dependent kinases as a therapeutic target for stroke. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:10254-10259.
- Ozturk G, Erdogan E, Anlar O, Kosem M, Taspinar M (2005) Effect of leukemia inhibitory factor in experimental cisplatin neuropathy in mice. *Cytokine* 29:31-41.
- Pagano M, Pepperkok R, Verde F, Ansorge W, Draetta G (1992) Cyclin A is required at two points in the human cell cycle. *Embo J* 11:961-971.
- Pambianco G, Costacou T, Ellis D, Becker DJ, Klein R, Orchard TJ (2006) The 30-year natural history of type 1 diabetes complications: the Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study experience. *Diabetes* 55:1463-1469.
- Pardee AB (1974) A restriction point for control of normal animal cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71:1286-1290.
- Park DS, Obeidat A, Giovanni A, Greene LA (2000) Cell cycle regulators in neuronal death evoked by excitotoxic stress: implications for neurodegeneration and its treatment. *Neurobiol Aging* 21:771-781.
- Perea J, Robertson A, Tolmachova T, Muddle J, King RH, Ponsford S, Thomas PK, Huxley C (2001) Induced myelination and demyelination in a conditional mouse model of Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Hum Mol Genet* 10:1007-1018.
- Pereon Y, Nguyen The Tich S, Guiheneuc P (2003) Peripheral neuropathy: a picture is worth a thousand words. *Neurophysiol Clin* 33:31-32.
- Perkins BA, Brill V (2003) Diabetic neuropathy: a review emphasizing diagnostic methods. *Clin Neurophysiol* 114:1167-1175.

- Petzold A (2005) Neurofilament phosphoforms: surrogate markers for axonal injury, degeneration and loss. *J Neurol Sci* 233:183-198.
- Pines J, Hunter T (1994) The differential localization of human cyclins A and B is due to a cytoplasmic retention signal in cyclin B. *Embo J* 13:3772-3781.
- Pirart J (1978) Why don't we teach and treat diabetic patients better? *Diabetes Care* 1:139-140.
- Poliak S, Peles E (2003) The local differentiation of myelinated axons at nodes of Ranvier. *Nat Rev Neurosci* 4:968-980.
- Pop-Busui R, Marinescu V, Van Huysen C, Li F, Sullivan K, Greene DA, Larkin D, Stevens MJ (2002) Dissection of metabolic, vascular, and nerve conduction interrelationships in experimental diabetic neuropathy by cyclooxygenase inhibition and acetyl-L-carnitine administration. *Diabetes* 51:2619-2628.
- Pot C, Simonen M, Weinmann O, Schnell L, Christ F, Stoeckle S, Berger P, Rulicke T, Suter U, Schwab ME (2002) Nogo-A expressed in Schwann cells impairs axonal regeneration after peripheral nerve injury. *J Cell Biol* 159:29-35.
- Pradat PF (2003) [Treatment of peripheral neuropathies with neurotrophic factors: animal models and clinical trials]. *Rev Neurol (Paris)* 159:147-161.
- Pradat PF, Kennel P, Naimi-Sadaoui S, Finiels F, Scherman D, Orsini C, Delaere P, Mallet J, Revah F (2002) Viral and non-viral gene therapy partially prevents experimental cisplatin-induced neuropathy. *Gene Ther* 9:1333-1337.
- Qiang X, Satoh J, Sagara M, Fukuzawa M, Masuda T, Sakata Y, Muto G, Muto Y, Takahashi K, Toyota T (1998) Inhibitory effect of troglitazone on diabetic neuropathy in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetologia* 41:1321-1326.
- Quasthoff S, Hartung HP (2002) Chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *J Neurol* 249:9-17.
- Raff MC, Whitmore AV, Finn JT (2002) Axonal self-destruction and neurodegeneration. *Science* 296:868-871.
- Rambukkana A (2004) Mycobacterium leprae-induced demyelination: a model for early nerve degeneration. *Curr Opin Immunol* 16:511-518.
- Rambukkana A, Yamada H, Zanazzi G, Mathus T, Salzer JL, Yurchenco PD, Campbell KP, Fischetti VA (1998) Role of alpha-dystroglycan as a Schwann cell receptor for Mycobacterium leprae. *Science* 282:2076-2079.
- Ranganathan S, Bowser R (2003) Alterations in G(1) to S phase cell-cycle regulators during amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Pathol* 162:823-835.
- Rashidian J, Iyirhiaro GO, Park DS (2007) Cell cycle machinery and stroke. *Biochim Biophys Acta* 1772:484-493.
- Rashidian J, Iyirhiaro G, Aleyasin H, Rios M, Vincent I, Callaghan S, Bland RJ, Slack RS, During MJ, Park DS (2005) Multiple cyclin-dependent kinases signals are critical mediators of ischemia/hypoxic neuronal death in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:14080-14085.
- Ratcliffe CF, Westenbroek RE, Curtis R, Catterall WA (2001) Sodium channel beta1 and beta3 subunits associate with neurofascin through their extracellular immunoglobulin-like domain. *J Cell Biol* 154:427-434.
- Rechsteiner M, Rogers SW (1996) PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem Sci* 21:267-271.

- Riethmacher D, Sonnenberg-Riethmacher E, Brinkmann V, Yamaai T, Lewin GR, Birchmeier C (1997) Severe neuropathies in mice with targeted mutations in the ErbB3 receptor. *Nature* 389:725-730.
- Ritchie JM, Rogart RB (1977) Density of sodium channels in mammalian myelinated nerve fibers and nature of the axonal membrane under the myelin sheath. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:211-215.
- Robertson AM, Perea J, McGuigan A, King RH, Muddle JR, Gabreels-Festen AA, Thomas PK, Huxley C (2002) Comparison of a new pmp22 transgenic mouse line with other mouse models and human patients with CMT1A. *J Anat* 200:377-390.
- Romine JS, Bray GM, Aguayo AJ (1976) Schwann cell multiplication after crush injury of unmyelinated fibers. *Arch Neurol* 33:49-54.
- Russell JW, Windebank AJ, McNiven MA, Brat DJ, Brimijoin WS (1995) Effect of cisplatin and ACTH4-9 on neural transport in cisplatin induced neurotoxicity. *Brain Res* 676:258-267.
- Russell JW, Sullivan KA, Windebank AJ, Herrmann DN, Feldman EL (1999) Neurons undergo apoptosis in animal and cell culture models of diabetes. *Neurobiol Dis* 6:347-363.
- Said G (1995) *Neuropathies métaboliques*. Paris.
- Said G, Goulon-Goeau C, Slama G, Tchobroutsky G (1992) Severe early-onset polyneuropathy in insulin-dependent diabetes mellitus. A clinical and pathological study. *N Engl J Med* 326:1257-1263.
- Sakurai M, Hayashi T, Abe K, Itoyama Y, Tabayashi K, Rosenblum WI (2000) Cyclin D1 and Cdk4 protein induction in motor neurons after transient spinal cord ischemia in rabbits. *Stroke* 31:200-207.
- Sanchez I, Dynlacht BD (2005) New insights into cyclins, CDKs, and cell cycle control. *Semin Cell Dev Biol* 16:311-321.
- Saredi S, Patte-Mensah C, Melcangi RC, Mensah-Nyagan AG (2005) Effect of streptozotocin-induced diabetes on the gene expression and biological activity of 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the rat spinal cord. *Neuroscience* 135:869-877.
- Sayers NM, Beswick LJ, Middlemas A, Calcutt NA, Mizisin AP, Tomlinson DR, Fernyhough P (2003) Neurotrophin-3 prevents the proximal accumulation of neurofilament proteins in sensory neurons of streptozocin-induced diabetic rats. *Diabetes* 52:2372-2380.
- Schaeffer L, de Kerchove d'Exaerde A, Changeux JP (2001) Targeting transcription to the neuromuscular synapse. *Neuron* 31:15-22.
- Schmidt RE, Dorsey DA, Beaudet LN, Parvin CA, Zhang W, Sima AA (2004) Experimental rat models of types 1 and 2 diabetes differ in sympathetic neuroaxonal dystrophy. *J Neuropathol Exp Neurol* 63:450-460.
- Scott RH, Woods AJ, Lacey MJ, Fernando D, Crawford JH, Andrews PL (1995) An electrophysiological investigation of the effects of cisplatin and the protective actions of dexamethasone on cultured dorsal root ganglion neurones from neonatal rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 352:247-255.
- Screnci D, McKeage MJ (1999) Platinum neurotoxicity: clinical profiles, experimental models and neuroprotective approaches. *J Inorg Biochem* 77:105-110.
- Serrano M, Hannon GJ, Beach D (1993) A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 366:704-707.

- Shapiro L, Doyle JP, Hensley P, Colman DR, Hendrickson WA (1996) Crystal structure of the extracellular domain from P0, the major structural protein of peripheral nerve myelin. *Neuron* 17:435-449.
- Sherman DL, Brophy PJ (2005) Mechanisms of axon ensheathment and myelin growth. *Nat Rev Neurosci* 6:683-690.
- Sherr CJ (1994) The ins and outs of RB: coupling gene expression to the cell cycle clock. *Trends Cell Biol* 4:15-18.
- Sherr CJ, Roberts JM (1995) Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* 9:1149-1163.
- Sima AA, Sugimoto KV, 1999 #65; (1999) Experimental diabetic neuropathy: an update. *Diabetologia* 42:773-788.
- Simmons Z, Feldman EL (2002) Update on diabetic neuropathy. *Curr Opin Neurol* 15:595-603.
- Sorensen B, Tandrup T, Koltzenburg M, Jakobsen J (2003) No further loss of dorsal root ganglion cells after axotomy in p75 neurotrophin receptor knockout mice. *J Comp Neurol* 459:242-250.
- Stevens B, Porta S, Haak LL, Gallo V, Fields RD (2002) Adenosine: a neuron-glial transmitter promoting myelination in the CNS in response to action potentials. *Neuron* 36:855-868.
- Stoffel W, Bosio A (1997) Myelin glycolipids and their functions. *Curr Opin Neurobiol* 7:654-661.
- Stoll G, Muller HW (1999) Nerve injury, axonal degeneration and neural regeneration: basic insights. *Brain Pathol* 9:313-325.
- Stoll G, Jander S, Myers RR (2002) Degeneration and regeneration of the peripheral nervous system: from Augustus Waller's observations to neuroinflammation. *J Peripher Nerv Syst* 7:13-27.
- Suter U, Scherer SS (2003) Disease mechanisms in inherited neuropathies. *Nat Rev Neurosci* 4:714-726.
- Ta LE, Espeset L, Podratz J, Windebank AJ (2006) Neurotoxicity of oxaliplatin and cisplatin for dorsal root ganglion neurons correlates with platinum-DNA binding. *Neurotoxicology*.
- Tamura Y, Monden M, Suzuki H, Yamada M, Koyama K, Shiomi H (2006) Beneficial action of 2,4,4-trimethyl-3-(15-hydroxypentadecyl)-2-cyclohexen-1-one, a novel long-chain fatty alcohol, on diabetic hypoalgesia and neuropathic hyperalgesia. *J Pharmacol Sci* 102:248-252.
- Tantuwaya VS, Bailey SB, Schmidt RE, Villadiego A, Tong JX, Rich KM (1997) Peripheral nerve regeneration through silicone chambers in streptozocin-induced diabetic rats. *Brain Res* 759:58-66.
- ten Asbroek AL, Verhamme C, van Groenigen M, Wolterman R, de Kok-Nazaruk MM, Baas F (2005) Expression profiling of sciatic nerve in a Charcot-Marie-Tooth disease type 1a mouse model. *J Neurosci Res* 79:825-835.
- ter Laak MP, Hamers FP, Kirk CJ, Gispen WH (2000) rhGGF2 protects against cisplatin-induced neuropathy in the rat. *J Neurosci Res* 60:237-244.
- Timsit S, Rivera S, Ouaghi P, Guischart F, Tremblay E, Ben-Ari Y, Khrestchatsky M (1999) Increased cyclin D1 in vulnerable neurons in the hippocampus after ischaemia and epilepsy: a modulator of in vivo programmed cell death? *Eur J Neurosci* 11:263-278.
- Tolwani RJ, Cosgaya JM, Varma S, Jacob R, Kuo LE, Shooter EM (2004) BDNF overexpression produces a long-term increase in myelin formation in the peripheral nervous system. *J Neurosci Res* 77:662-669.

- Toni N, Buchs PA, Nikonenko I, Bron CR, Muller D (1999) LTP promotes formation of multiple spine synapses between a single axon terminal and a dendrite. *Nature* 402:421-425.
- Torigoe K, Tanaka HF, Takahashi A, Awaya A, Hashimoto K (1996) Basic behavior of migratory Schwann cells in peripheral nerve regeneration. *Exp Neurol* 137:301-308.
- Toyka KV (1999) Eighty three years of the Guillain-Barre syndrome: clinical and immunopathologic aspects, current and future treatments. *Rev Neurol (Paris)* 155:849-856.
- Tredici G, Braga M, Nicolini G, Miloso M, Marmiroli P, Schenone A, Nobbio L, Frattola L, Cavaletti G (1999) Effect of recombinant human nerve growth factor on cisplatin neurotoxicity in rats. *Exp Neurol* 159:551-558.
- Uehara K, Yamagishi S, Otsuki S, Chin S, Yagihashi S (2004) Effects of polyol pathway hyperactivity on protein kinase C activity, nociceptive peptide expression, and neuronal structure in dorsal root ganglia in diabetic mice. *Diabetes* 53:3239-3247.
- Varejao AS, Cabrita AM, Meek MF, Bulas-Cruz J, Filipe VM, Gabriel RC, Ferreira AJ, Geuna S, Winter DA (2003) Ankle kinematics to evaluate functional recovery in crushed rat sciatic nerve. *Muscle Nerve* 27:706-714.
- Vigo T, Nobbio L, Hummelen PV, Abbruzzese M, Mancardi G, Verpoorten N, Verhoeven K, Sereda MW, Nave KA, Timmerman V, Schenone A (2005) Experimental Charcot-Marie-Tooth type 1A: a cDNA microarrays analysis. *Mol Cell Neurosci* 28:703-714.
- Vincent AM, Brownlee M, Russell JW (2002) Oxidative stress and programmed cell death in diabetic neuropathy. *Ann N Y Acad Sci* 959:368-383.
- Walker D, Carrington A, Cannan SA, Sawicki D, Sredy J, Boulton AJ, Malik RA (1999) Structural abnormalities do not explain the early functional abnormalities in the peripheral nerves of the streptozotocin diabetic rat. *J Anat* 195 (Pt 3):419-427.
- Wang H, Kunkel DD, Martin TM, Schwartzkroin PA, Tempel BL (1993) Heteromultimeric K⁺ channels in terminal and juxtaparanodal regions of neurons. *Nature* 365:75-79.
- Wang LX, Wang ZJ (2003) Animal and cellular models of chronic pain. *Adv Drug Deliv Rev* 55:949-965.
- Watanabe T, Miyagawa I (2002) Effects of long-chain fatty alcohol on peripheral nerve conduction and bladder function in diabetic rats. *Life Sci* 70:2215-2224.
- Waxman SG, Ritchie JM (1993) Molecular dissection of the myelinated axon. *Ann Neurol* 33:121-136.
- Willis DE, Twiss JL (2006) The evolving roles of axonally synthesized proteins in regeneration. *Curr Opin Neurobiol* 16:111-118.
- Wolthers M, Moldovan M, Binderup T, Schmalbruch H, Krarup C (2005) Comparative electrophysiological, functional, and histological studies of nerve lesions in rats. *Microsurgery* 25:508-519.
- Yfanti E, Sidera K, Margaritis LH, Patsavoudi E (2004) The 4C5 antigen is associated with Schwann cell migration during development and regeneration of the rat peripheral nervous system. *Glia* 45:39-53.
- Zhao C, Takita J, Tanaka Y, Setou M, Nakagawa T, Takeda S, Yang HW, Terada S, Nakata T, Takei Y, Saito M, Tsuji S, Hayashi Y, Hirokawa N (2001) Charcot-Marie-Tooth disease type 2A caused by mutation in a microtubule motor KIF1Bbeta. *Cell* 105:587-597.
- Zito K, Knott G, Shepherd GM, Shenolikar S, Svoboda K (2004) Induction of spine growth and synapse formation by regulation of the spine actin cytoskeleton. *Neuron* 44:321-334.

Utilisation de la lignée de souris transgéniques Cycline D1-Luciférase pour l'analyse des mécanismes de dégénérescence du système nerveux

RESUME. Sous le terme de neuropathies périphériques, les neurologues regroupent toutes pathologies caractérisées par une altération de la structure ou de la fonction des nerfs périphériques. D'étiologies très diverses, les mécanismes initiateurs peuvent prendre place dans l'axone et/ou le corps cellulaire des neurones ou encore au sein de cellules de Schwann.

La lignée de souris transgéniques Cycline D1-Luciférase qui a été générée au laboratoire, exprime la luciférase sous contrôle du promoteur de la cycline D1. Elle permet de suivre par luminométrie la régulation transcriptionnelle de la cycline. Son intérêt est double :

- i. la cycline D1 est une molécule clé du cycle cellulaire indispensable pour le passage de la phase G1 à la phase S. A l'aide de ce modèle transgénique, on peut aisément évaluer la régulation transcriptionnelle de ce gène, reflet de la prolifération cellulaire dans un tissu cible (par exemple les cellules de Schwann dans le nerf).
- ii. les études portant sur la mort neuronale ont mis en évidence que l'activation du cycle cellulaire dans les neurones post-mitotiques, médiée par la cycline D1, est interprétée comme une information conflictuelle par ces cellules. Cette signalisation aberrante initie les phases exécutrices de l'apoptose et peut être identifiée à l'aide de souris Cycline D1-Luciférase.

L'objectif de cette thèse était d'abord de caractériser la lignée transgénique CnD1-Luc, puis de l'appliquer à l'étude des mécanismes de dégénérescence associés à différents modèles de neuropathies périphériques : compression nerveuse, traitement au *cis*-platine et complications neurologiques du diabète.

La compression nerveuse est un modèle qui permet l'étude de la dégénérescence Wallérienne. D'un point de vue cellulaire, les axones dégèrent de manière rétrograde du côté distal au site de lésion. Cependant, la direction et la chronologie de la prolifération des cellules de Schwann nécessaire à la régénération restent inconnues. En utilisant les souris Cycline D1-Luciférase nous avons montré avec précision que, dans le nerf sciatique lésé, les cellules de Schwann prolifèrent selon un schéma spatial et temporel identique à la dégénérescence axonale.

Au niveau médullaire, l'activité transcriptionnelle du promoteur de la cycline D1 augmente et la protéine s'accumule dans les noyaux des motoneurones après compression nerveuse. L'absence de mort neuronale indique que chez l'animal adulte, l'activation de cycline D1 dans les neurones moteurs n'est pas suffisante pour initier l'apoptose et suggère la mise en place d'un mécanisme de blocage de l'apoptose dans ces neurones adultes.

Afin d'élargir le champ d'applications de cette lignée transgénique à d'autres neuropathies périphériques, nous avons vérifié que l'activité luciférase, associée la réponse proliférative des cellules de Schwann, peut être vue comme un index d'atteinte du nerf périphérique d'étiologies différentes (neuropathies au *cis*-platine et neuropathies diabétiques).

Nous avons également montré que cette lignée constitue un outil expérimental avantageux pour le criblage d'agents neuroprotecteurs.