



HAL
open science

Etude des conséquences fonctionnelles des mutations du facteur eIF2B sur la maturation gliale

Aurélia Huyghe

► **To cite this version:**

Aurélia Huyghe. Etude des conséquences fonctionnelles des mutations du facteur eIF2B sur la maturation gliale. Médecine humaine et pathologie. Université d'Auvergne - Clermont-Ferrand I, 2011. Français. NNT : 2011CLF1MM23 . tel-00855794

HAL Id: tel-00855794

<https://theses.hal.science/tel-00855794>

Submitted on 30 Aug 2013

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

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

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Thèse

Pour l'obtention du grade de
DOCTEUR D'UNIVERSITE
Biologie moléculaire et cellulaire

Présentée et soutenue publiquement par

Aurélia HUYGHE

le 05 décembre 2011

**ETUDE DES CONSEQUENCES FONCTIONNELLES DES
MUTATIONS DU FACTEUR EIF2B SUR LA MATURATION
GLIALE**

Directeur de thèse : Madame le Professeur Odile Boespflug-Tanguy (Université Paris 7, Paris)

Rapporteurs : Madame le Professeur Jacqueline Trotter (Université Johannes Gutenberg, Mainz, Allemagne)

Madame le Docteur Hélène Bœuf (Université Bordeaux 2, Bordeaux)

Examineurs : Monsieur le Docteur Pierre Fafournoux (Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand)

Madame le Professeur Diana Rodriguez (Université Paris 6, Paris)

Monsieur le Docteur Bertrand Pain (Université Lyon 1, Lyon)

Madame le Docteur Anne Fogli (Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand)

Remerciements

Je voudrais tout d'abord exprimer ma reconnaissance au Professeur Jacqueline Trotter ainsi qu'au Docteur Hélène Bœuf pour avoir gentiment accepté d'être les rapporteurs de cette thèse.

Je remercie également le Professeur Diana Rodriguez et le Docteur Pierre Fafournoux pour avoir pris le temps de juger ce travail et accepté d'être membres du jury.

Je tiens particulièrement à remercier le Professeur Odile Boespflug-Tanguy pour m'avoir accueillie au sein de son équipe et encadrée durant ces trois années de thèse. Vous avez su me faire partager votre passion pour la recherche sur ces maladies rares que sont les leucodystrophies. Malgré un emploi du temps très chargé et votre récent départ à Paris, vous avez su être disponible pour discuter de mes problèmes scientifiques, me guider dans mes travaux de recherche et corriger des manuscrits (à toute heure du jour et de la nuit !).

Je tiens à remercier vivement les Docteurs Anne Fogli et Bertrand Pain pour leur confiance ainsi que pour les précieux moments scientifiques qu'ils ont pu m'accorder. Anne, merci pour ton dynamisme, ton investissement, ta gentillesse, ton écoute et tes conseils avisés. Bertrand, vous m'avez fait découvrir le monde des cellules souches, merci pour votre esprit critique et votre très grande disponibilité durant ces années.

Un très grand merci à Laetitia Horzinski qui m'a en partie encadrée lors de mon stage de M2 et au début de cette thèse. Tu m'as prodigué de très nombreuses connaissances sur le CACH et m'a passée le flambeau de la passionnante étude transcriptomique (vive l'équipe CACH !).

Merci à Céline Gonthier et Cécile Aube qui ont grandement participé à l'étude sur le modèle des cellules souches et ont notamment passé de nombreuses heures en salle de culture (ne pourront compatir que ceux ayant passé des journées entières à faire des corps embryoides... !).

Un grand merci à ma Kiki préférée. Sans toi ces longues journées de rédaction passées dans notre bocal (aux magnifiques murs sapin !) auraient parfois été bien moroses. Je crois que nous sommes devenues copines de galères, pouvoir nous raconter mutuellement nos malheurs durant ces trois années et nos parties de rigolade ont été pour moi d'une grande aide. Et enfin, merci ton aide précieuse avec ces foutus ordinateurs dont le fonctionnement reste complètement obscure pour moi et contre qui j'ai perdu la bataille plus d'une fois lors de la rédaction de ce manuscrit (oups, je crois que j'ai désinstallé Microsoft office... !!! à ne pas confondre avec Open office...).

Je remercie également tous les autres membres de l'équipe « myéline ». Catherine, Cathy, Geneviève, Imen, Samia, Céline, Marina, Mélina, Robert et Fabrice, merci pour votre soutien et votre bonne humeur au quotidien.

Je remercie les membres des autres équipes du GReD auprès desquels j'ai pu être amenée à demander conseil ou simplement partager des moments agréables.

Un grand merci aux patients et à leur famille pour leur confiance.

Je tiens finalement à remercier ceux qui occupent une place très importante dans ma vie : ma famille et mes amis.

Tout d'abord, un très grand merci à ma maman et à Didier. Vous avez toujours été là pour moi et pour supporter mon sale caractère. Vous me soutenez depuis le début de cette aventure et avez toujours cru en moi (même quand parfois je n'y croyais plus moi-même). Maman tu as toujours été présente et à mon écoute pour me guider dans mes choix « existentiels », merci d'avoir toujours été là pour moi malgré les difficultés de la vie. Vous comptez énormément pour moi et j'espère que vous serez toujours fiers de moi.

Merci à Vincent pour son soutien, son réconfort dans les moments durs et pour avoir supporté mes humeurs après les journées difficiles.

Merci à mes amis et notamment ma grande copine Charlotte. Nos soirées du vendredi et nos sorties salsa m'ont été d'un grand soutien moral.

A toutes ces personnes, je veux que vous sachiez combien je vous suis reconnaissante et combien je vous aime.

RESUME

Les eIF2B-pathies représentent un groupe de leucodystrophies de transmission autosomique récessive du à des mutations du facteur ubiquitaire eIF2B. Celui-ci intervient dans l'initiation de la traduction et ses régulations, particulièrement en cas de stress cellulaires, grâce à son activité d'échange de guanine (GEF). Un large spectre clinique et mutationnel a été décrit pour cette pathologie.

La diminution de l'activité GEF a pu être validée comme marqueur diagnostique spécifique des eIF2B-pathies dans les lymphoblastes de patients atteints avec un seuil d'activité à 77,5% pour une spécificité de 100% et une sensibilité de 89%.

La compréhension des mécanismes moléculaires en cause a ensuite été recherchée selon trois approches :

- une première focalisée sur l'étude de la réponse au stress du réticulum endoplasmique (RE) dans les lymphoblastes de patients eIF2B-mutés. L'hyper-activation transcriptionnelle et traductionnelle des gènes de la réponse au stress du RE, observée dans d'autres études et sur d'autres types cellulaires n'a pas été retrouvée dans cette étude.

- une approche globale d'étude transcriptomique différentielle dans des fibroblastes primaires de patients eIF2B-mutés soumis ou non à un stress cellulaire. La comparaison du transcriptome avec celui de contrôles sains et de patients porteurs d'une autre leucodystrophie n'a pas permis de mettre en évidence un effet spécifique du stress dans les fibroblastes eIF2B-mutés. En revanche, il a pu être montré une dérégulation de l'expression de 70 gènes spécifiquement dans ces fibroblastes ainsi que l'implication de voies métaboliques telles que l'épissage et la stabilité des ARNm, importantes au cours du développement du système nerveux central. Ces gènes trouvés dérégulés dans les fibroblastes, appartenant notamment à la famille des hnRNP, ont été ensuite validés dans les cerveaux de patients eIF2B-mutés et une anomalie d'épissage de certains transcrits importants pour les cellules gliales a également été identifiée.

- enfin, pour valider l'hypothèse d'une anomalie développementale des cellules gliales, le modèle des cellules souches embryonnaires (ESC) a été utilisé et un défaut génétique a été introduit dans ces cellules afin de mimer les mutations eIF2B. Une anomalie de différenciation de ces ESC en cellules gliales a pu être mise en évidence dans ce modèle qui pourrait alors constituer un outil de choix pour tester des molécules pouvant potentiellement améliorer la différenciation de ces cellules, principales en cause dans cette pathologie.

MOTS CLES : eIF2B-pathies, activité GEF, stress, transcriptome, épissage, cellules gliales, cellules souches embryonnaires.

ABSTRACT

eIF2B-related disorders are an autosomal recessive leukodystrophy caused by mutations in the ubiquitary eIF2B factor. This one is involved in the translation initiation step and its regulation, particularly upon cellular stresses, thanks to its guanine nucleotide exchange factor (GEF) activity. A wide continuum clinical and mutational spectrum has been described for this pathology.

The decrease of eIF2B GEF activity has been validated as an eIF2B-pathies specific biomarker in affected patients' lymphoblasts with 100% specificity and 89% sensibility using a threshold at 77.5%.

Functional molecular mechanisms involved in the physiopathology of eIF2B-related disorders have been searched by three approaches:

- the first one focalized on the study of the endoplasmic reticulum stress response in lymphoblasts from eIF2B-mutated patients. The translational hyper-induction of specific genes involved in the unfolded protein response, identified in other cell types, was not observed in this study.
- a global approach using a differential transcriptomic study of primary fibroblasts from eIF2B-mutated patients submitted or not to a cellular stress. The comparison with the transcriptomic profile of fibroblasts from healthy controls and patients presenting with other types of leukodystrophies not allowed us to identify a specific stress effect in eIF2B-mutated fibroblasts. On the other hand, it has been shown 70 genes specifically differentially deregulated in eIF2B-mutated fibroblasts as well as metabolic pathways implication, like splicing and mRNA stability, that are critical during the central nervous system development. We then validated that these genes, belonging the the hnRNP family, were also deregulated in brains from eIF2B-mutated patients and a splice abnormality of genes implicated in glial cells network has also been identified.
- finally, in order to validate the hypothesis of an abnormal glial cell development, the embryonic stem cells (ESC) model has been used and a genetic default has been introduced in these cells to mimic eIF2B mutations. We identified an abnormal differentiation of these ESC into glial cells. Therefore, this model would provide a unique tool to search therapeutic agents that would improve glial cell differentiation, the major cells implicated in this pathology.

KEY WORDS : eIF2B-related disorders, GEF activity, stress, transcriptomic analysis, mRNA splicing, glial cells, embryonic stem cells.

LISTE DES ABBREVIATIONS

4OHT	4-Hydroxy-Tamoxifène
A2RE	hnRNPA2 Response Element
ABC	transporteurs ATP-Binding Cassette
ABCD1	ATP-Binding Cassette D1
AD	Autosomique Dominant
ADLD	Adult-onset autosomal Dominant Leukodystrophy
AGS	Aicardi-Goutieres Syndrome
ALD	Adrénoleucodystrophie
ALDH3A2	Aldéhyde Déshydrogénase 3 A2
AMN	Adrénomyéloneuropathie
AR	Autosomique Récessif
ARNm	ARN messenger
ARNt _i ^{Met}	ARN de transfert initiateur-Méthionine
ARSA	Arylsulfatase A
ASNS	Asparagine Synthétase
ASPA	Asparto-Acylase
ATF	Activating Transcription Factor
ATP	Adénosine Triphosphate
AUC	Area Under Curve
AxD	Alexander Disease
BHE	Barrière Hémato-Encéphalique
BMP	Bone Morphogenic Protein
CACH	Childhood Ataxia with Central Hypomyelination
CADASIL	Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy
CAT1	Cationic Amino acid Transporter 1
CC	Corps Calleux
cCR	couche de Cajal-Retzius
Cdx2	Caudal type homeobox 2
CHOP	C/EBP Homologous Protein
CK	Caséine Kinase
cKO	conditional Knock-Out
CLE	Cree Leukoencephalopathy
CMTX	maladie de Charcot-Marie-Tooth liée à l'X
CNP	2',3'-Cyclic Nucleotide 3'-Phosphodiésterase
CNTF	Ciliary Neurotrophic Factor
COL4A1	Collagène 4 A1
CREB	cAMP Response Element-Binding
Cx	Connexine
DARS2	aspartyl-tRNA synthetase 2
DIAPH3	Diaphanous Homolog 3

DMSO	Dyméthyl-Sulfoxyde
DRCTNNB1A	Down Regulated by CTNNB1 protein A
DYRK	Dual-specificity tyrosine phosphorylated and Regulated Kinase
EB	Embryoid Body
EBV	Epstein-Barr Virus
eEF	eukaryotic Elongation Factor
EGF	Epidermal Growth Factor
eIF	eukaryotic Initiation Factor
eIF2B	eukaryotic Initiation Factor 2B
Epi	Epiblaste
EpiSC	Epiblaste Stem Cell
Epr	Endoderme primitif
ERAD	Endoplasmic Reticulum-Associated protein Degradation
ERSE	Endoplasmic Reticulum Stress response Element
ESC	Embryonic Stem Cell
Fb	Fibroblaste
FDR	False Discovery Rate
FGF	Fibroblast Growth Factor
FLAIR	Fluid Attenuation Inversion Recovery
FR	Fibre de Rosenthal
GABA	Acide Gamma-Aminobutyrique
GADD34	Growth Arrest and DNA Damage induced gene 34
GalC	Galactocérébroside
GCN	General Control Non-derepressible
GDP	Guanosine Diphosphate
GEF	Guanine Exchange Factor
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
GJB1	Gap Junction Beta 1
GJC2	Gap Junction Gamma 2
GRP78/BiP	Glucose-Regulated Protein 78 kDa/Binding Protein
GRP94	Glucose-Regulated Protein 94 kDa
GSK3	Glycogen Synthase Kinase 3
GTP	Guanosine Triphosphate
HCC	Hypomyélinisation et Cataracte Congénitale
HCCS	Holocytochrome C Synthase
hGPC	human Glial Progenitor Cell
HLD	Hypomyelinating Leukodystrophy
hnRNP	heterogeneous nuclear Ribonucleoprotein
HRI	Heme-Regulated Inhibitor of translation
HSP	Heat Shock Protein
ICM	Inner Cell Mass
IGF1	Insulin-like Growth Factor 1
IP ₃	Inositol triphosphate
iPSC	induced Pluripotent Stem Cells
IRE1	Inositol-Requiring protein 1
IRES	Internal Ribosome Entry Site

IRM	Imagerie par Resonance Magnétique
ITAF	IRES Trans Acting Factor
KI	Knock-In
KIF5B	Kinesin Family 5B
KO	Knock-Out
L1-CAM	L1-Cell Adhesion Molecule
LBD	Ligand-Binding Domain
LBSL	Leukoencephalopathy with Brain Stem and spinal cord involvement and high Lactate
LC-MS	chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse
LCR	Liquide Céphalo-Rachidien
LD	Leucodystrophie
LIF	Leukemia Inhibitory Factor
LINGO-1	Nogo receptor-interacting protein
llb	lymphoblaste
LMNB1	Lamine B1
MAG	Myelin Associated Glycoprotein
MAP2	Microtubule-Associated Protein 2
MBP	Myelin Basic Protein
MCD	Myelinosclerosis Centralis Diffusa
MCT8	Monocarboxylate Transporter 8
MEC	Matrice Extracellulaire
mESC	murine Embryonic Stem Cell
miARN	micro ARN
MLC	Megalencephalic Leukoencephalopathy with subcortical Cysts
MLD	Metachromatic Leukodystrophy
MOBP	Myelin Oligodendrocyte Basic Protein
MOG	Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein
MRPL28	Mitochondrial Ribosomal Protein L28
MRPS26	Mitochondrial Ribosomal Protein S26
MSI1	Musashi homolog 1
mtAspRS	protéine mitochondriale aspartyl-tRNA synthetase
NAA	acide N-Acétyl-Aspartique
NAAG	N-Acétyl-Aspartyl Glutamate
NAD	Nicotinamide Adenine Nucleotide
NADP	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
NGF	Nerve Growth Factor
NGN2	Neurogenin 2
NRG1	Neuréguline 1
NT3	Neurotrophine 3
OCT4	Octamer-binding transcription factor 4
OL	Oligodendrocyte
OMGP	Oligodendrocyte Myelin Glycoprotein
OPC	Oligodendrocyte Precursor Cell
ORF	Open Reading Frame
OSP	Oligodendrocyte Specific Protein

PABP	Poly-A Binding Protein
PAX6	Paired-box gene 6
pCAG-IP	pCAG-IRES-Puromycine
PCWH	Peripheral demyelinating neuropathy, Central dysmyelination, Waardenburg syndrome and Hirschsprung disease
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PDI	Protein Disulfide Isomerase
PEPCK	Phospho-Enol-Pyruvate Carboxylase Kinase
PERK	PKR-like Endoplasmic Reticulum Kinase
PKA	Protéine Kinase AMPc-dépendante
PKC	Protéine Kinase C
PKR	Protéine Kinase R
PLC	Phospholipase C
PLP	Proteo-Lipid Protein
PMD	Pelizaeus-Merzbacher Disease
PMLD	Pelizaeus-Merzbacher-Like Disease
PMP22	Peripheral Myelin Protein 22
PP1	Protéine Phosphatase 1
PSA-CAM	Polysialylated neural-Cell Adhesion Molecule
PSAP	Prosaponine
QRT-PCR	Quantitative Real Time-Polymerase Chain Reaction
RA	Retinoic Acid
RE	Réticulum Endoplasmique
RISC	RNA-Induced Silencing Complex
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RNASET2	Ribonucléase T2
ROC	Receiver Operating Characteristics
RVCL	Retinal Vasculopathy and Cerebral Leukodystrophy
S1P	Site-1 Protéase
S2P	Site-2 Protéase
SB	Substance Blanche
SG	Substance Grise
shARN	short hairpin ARN
Shh	Sonic hedgehog
siARN	small interfering ARN
SNC	Système Nerveux Central
SNP	Système Nerveux Périphérique
SOX	SRY-related HMG-box gene
SPG	Spastic Paraplegia
SPG2	Spastic Paraplegia type 2
SRM	Spectroscopie par Résonance Magnétique
SRP	Signal Recognition Peptide
STAT3	Signal Transducer and Activator of Transcription 3
T ₃	Triiodothyronine
TE	Trophectoderme

TGF- β	Transforming Growth Factor- β
TREX1	Three prime Repair Exonuclease 1
uORF	upstream Open Reading Frame
UPR	Unfolded Protein Response
VA	Valproic Acid
VDAC3	Voltage-Dependent Anion-selective Channel protein 3
VWM	Vanishing White Matter
XBP1	X-box Binding Protein 1
ZSV	Zone Sous-Ventriculaire
ZV	Zone Ventriculaire

TABLE DES MATIERES

Liste des tableaux	1
Liste des figures	2
Liste des annexes.....	4
INTRODUCTION GENERALE	5

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Développement du système nerveux central.....	11
A. Développement embryonnaire précoce.....	11
B. Morphogenèse cérébrale	13
1. Formation du tube neural	13
2. Différenciation du cerveau	15
C. Cellules souches embryonnaires	16
1. Origine et propriétés des cellules souches embryonnaires.....	16
2. Maintien de la pluripotence des cellules souches embryonnaires.....	19
3. Différenciation des cellules souches embryonnaires en précurseurs neuraux	19
D. Histogenèse cérébrale.....	22
II. Organisation cellulaire du système nerveux central.....	26
A. Substance grise et corps cellulaires neuronaux	26
B. Substance blanche et axones	27
C. Les cellules gliales	29
1. Les cellules épendymaires.....	29
2. Les cellules microgliales	31
3. Les cellules astrocytaires.....	32
a. Origine embryonnaire des astrocytes	32
b. Morphologie et protéines spécifiques des astrocytes	33
c. Fonctions des astrocytes.....	33
d. Gliose réactionnelle.....	35
4. Les cellules oligodendrocytaires	36
a. Origine embryonnaire des oligodendrocytes.....	36
b. Migration et différenciation des oligodendrocytes	37
c. Fonctions des oligodendrocytes	39
D. La myéline.....	40
1. Structure de la myéline du système nerveux central	40
2. Composition de la myéline du système nerveux central	42
a. Composition lipidique de la myéline	42
b. Composition protéique de la myéline.....	43
3. Rôles de la myéline	46
E. Interactions cellulaires.....	47

1.	Interactions axone/oligodendrocyte	47
2.	Interactions astrocyte/oligodendrocyte	50
3.	Interactions neurone/astrocyte.....	50
III.	Pathologies génétiques de la substance blanche : les leucodystrophies.....	53
A.	Classification des leucodystrophies	53
1.	Les leucodystrophies hypomyélinisantes	55
2.	Les leucodystrophies démyélinisantes	56
B.	Les leucodystrophies de type cavitaire.....	58
1.	La maladie d'Alexander	58
2.	La leucodystrophie avec mégalencéphalie kystique	59
3.	La leucoencéphalopathie kystique sans mégalencéphalie.....	60
4.	Le syndrome CACH/VWM	60
IV.	Le syndrome CACH/VWM et les eIF2B-pathies	61
A.	Historique de la maladie.....	61
B.	Critères diagnostiques cliniques et IRM	61
C.	Marqueurs neuropathologiques et biochimiques.....	64
D.	Implication des gènes EIF2B	66
E.	Spectre clinique des eIF2B-pathies	67
1.	Concept d'eIF2B-pathie	68
2.	Corrélation génotype-phénotype	70
V.	eIF2B, régulation de la traduction et stress cellulaire	72
A.	Les étapes de la traduction	72
1.	Initiation de la traduction	73
a.	Initiation de la traduction dépendante de la coiffe	73
b.	Les mécanismes alternatifs de l'initiation de la traduction	77
2.	Etape d'élongation de la traduction.....	77
3.	Etape de terminaison de la traduction	79
B.	Implication du facteur eIF2B dans l'initiation de la traduction	79
1.	Rôle du facteur eIF2B sur l'activation du facteur eIF2.....	79
2.	Structure et domaines fonctionnels du facteur eIF2B	81
C.	Régulation de l'initiation de la traduction en cas de stress cellulaire	85
1.	Régulation directe du facteur eIF2B	85
a.	Régulation allostérique.....	85
b.	Régulation par phosphorylation	86
c.	Agrégation du facteur eIF2B en cas de choc thermique, rôle des HSP (Heat Shock Protein).....	86
2.	Régulation par phosphorylation d'eIF2 α en réponse à un stress cellulaire	87
3.	Cas particulier du stress du RE : la réponse UPR	91
a.	Activation de la transcription	91
a.	Inhibition de la traduction	94

VI. Physiopathologie des eIF2B-pathies	96
A. Diminution de l'activité GEF dans les eIF2B-pathies	96
B. Activation de la réponse au stress (UPR) dans les eIF2B-pathies	98
C. Trouble de l'ontogenèse des cellules gliales dans les eIF2B-pathies.....	100
D. Modèles levure et murin de la pathologie	102
VII. Conclusion de la partie bibliographique : hypothèses physiopathologiques des eIF2B-pathies.....	104

TRAVAUX EXPERIMENTAUX

PREMIERE PARTIE VALIDATION D'UN BIOMARQUEUR DES eIF2B-PATHIES

I. Validation de la mesure de l'activité GEF comme outil d'aide au diagnostic et au pronostic des eIF2B-pathies	111
A. Contexte scientifique.....	111
B. Méthodologie	111
C. Résultats et discussion.....	112
D. Conclusion.....	112
E. Perspectives.....	113

PUBLICATION N°1	115
Horzinski L., Huyghe A. , Cardoso MC., Gonthier C., Ouchchane L., Blanc P., Boespflug-Tanguy O., Fogli A. Eukaryotic Initiation Factor 2B (eIF2B) GEF activity as a diagnostic tool for eIF2B-related disorders. (2009) PLoS ONE 4(12) : e8318.	

DEUXIEME PARTIE CONSEQUENCES FONCTIONNELLES DES MUTATIONS DU FACTEUR eIF2B

I. Etude de la réponse UPR dans les lymphoblastes de patients porteurs de mutations du facteur eIF2B.....	127
A. Contexte scientifique.....	127
B. Méthodologie	127
C. Résultats et discussion.....	128
D. Conclusion.....	129

PUBLICATION N°2	131
Horzinski L., Kantor L., Huyghe A. , Schiffmann R., Elroy-Stein O., Boespflug-Tanguy O., Fogli A. Evaluation of the endoplasmic reticulum-stress response in eIF2B-mutated lymphocytes and lymphoblasts from CACH/VWM patients. (2010) BMC Neurology 10 : 94.	

II. Etude transcriptomique différentielle des eIF2B-pathies.....	141
A. Contexte scientifique.....	141
B. Méthodologie	141
C. Résultats et discussion.....	142
1. Effet du stress du RE.....	142
2. Identification de gènes et voies métaboliques en cause dans les eIF2B-pathies....	143
3. Anomalie d'épissage de gènes développementaux en cause dans les eIF2B-pathies	144
D. Conclusion.....	146

PUBLICATION N°3	149
Huyghe A.* , Horzinski L.* , Henaut A., Gaillard M., Bertini E., Schiffmann R., Rodriguez D., Dantal Y., Boespflug-Tanguy O., Fogli A. Developmental splicing deregulation in leukodystrophies related to eIF2B-mutations. Human Molecular Genetics. Soumis en novembre 2011.	
*: premiers co-auteurs	

III. Impact des anomalies géniques du facteur eIF2B sur la maturation gliale.....	185
A. Contexte scientifique.....	189
B. Méthodologie	189
C. Résultats et discussion.....	192
1. Mise au point des paramètres de différenciation.....	192
2. Effet de la sous-expression d' <i>Eif2b5</i> sur la différenciation gliale	192
3. Effet de la surexpression d' <i>Eif2b5</i> muté sur la différenciation gliale	194
D. Conclusion.....	195

PUBLICATION N°4	199
Huyghe A. , Gonthier C., Aube C., Combes C., Fogli A., Boespflug-Tanguy O., Pain B. <i>In vitro</i> modelling of the altered glial cells differentiation due to the pathophysiological eIF2B mutations. Human Molecular Genetics. A soumettre.	

CONCLUSION GENERALE	235
PERSPECTIVES.....	2411
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	2417
ANNEXES.....	2655

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Description des principales protéines de la myéline du système nerveux central	45
Tableau 2 : Classement et gènes impliqués dans les principales leucodystrophies	54
Tableau 3 : Les facteurs d'initiation de la traduction dépendante de la coiffe chez les eucaryotes.....	75
Tableau 4 : Données concernant les cinq gènes humains <i>EIF2B</i>	82

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Modification du blastocyste, mise en place du disque embryonnaire didermique et des cavités	12
Figure 2 : Formation du tube neural et des crêtes neurales	14
Figure 3 : Les trois vésicules primitives du cerveau	14
Figure 4 : Différenciation du cerveau.....	15
Figure 5 : Origine et propriétés cardinales des cellules souches embryonnaires	17
Figure 6 : Potentialités de différenciation des cellules souches au cours de la vie	18
Figure 7 : Cellules neurales obtenues à partir de cellules souches embryonnaires humaines (hES).....	21
Figure 8 : Principes généraux de l’histogenèse télencéphalique	22
Figure 9 : Anatomie macroscopique du cerveau antérieur	25
Figure 10 : Schéma d’un neurone.....	27
Figure 11 : Cellules nerveuses composant le système nerveux central.....	30
Figure 12 : Schéma des principales fonctions astrocytaires	35
Figure 13 : Origine des astrocytes et des oligodendrocytes dans la moelle épinière	36
Figure 14 : Représentation schématique du lignage oligodendrocytaire, montrant les sites d’action des signaux neuronaux ou astrocytaires	38
Figure 15 : Oligodendrocyte et myéline.....	39
Figure 16 : Structure et composition de la myéline.....	41
Figure 17 : Schéma d’axones myélinisés	42
Figure 18 : Abondance relative des principales protéines de la myéline du système nerveux central	44
Figure 19 : Illustration schématique de la structure de la gaine de myéline	46
Figure 20 : Signaux neuronaux intervenants dans la myélinisation.....	48
Figure 21 : La traduction de MBP dépend de l’interaction entre les axones et les oligodendrocytes	49
Figure 22 : La synapse tripartite.....	51
Figure 23 : Aspects IRM de la substance blanche d’un patient CACH/VWM âgé de 5 ans en comparaison avec un sujet sain de même âge	63
Figure 24 : Anomalie des oligodendrocytes chez les patients CACH/VWM.....	65
Figure 25 : Défaut de maturation des astrocytes chez les patients CACH/VWM	65

Figure 26 : Répartition des mutations décrites à ce jour dans les cinq gènes <i>EIF2B</i>	67
Figure 27 : Spectre clinique étendu des eIF2B-pathies : corrélation entre l'âge de début de la maladie et la sévérité clinique	68
Figure 28 : Courbe de survie de 83 individus eIF2B mutés sans incapacité sévère en fonction de leur âge	71
Figure 29 : Eléments qui influencent la traduction des ARNm	72
Figure 30 : Initiation de la traduction dépendante de la coiffe chez les eucaryotes.....	76
Figure 31 : Représentation schématique de la phase d'élongation de la traduction chez les eucaryotes.....	78
Figure 32 : Activation du facteur eIF2 par le facteur eIF2B lors de l'étape d'initiation de la synthèse protéique.....	81
Figure 33 : Assemblage du complexe eIF2B	83
Figure 34 : Domaines fonctionnels des cinq sous-unités eIF2B	84
Figure 35 : Régulation de la traduction par différentes kinases en cas de stress cellulaire	88
Figure 36 : Eléments régulateurs dans la région 5' des ARNm impliqués dans la traduction sélective.....	90
Figure 37 : Voies de signalisation principales impliquées dans la réponse UPR.....	93
Figure 38 : Cascade du stress cellulaire	95
Figure 39 : A. Diminution de l'activité GEF (Guanine Exchange Factor) du facteur eIF2B dans les lymphoblastes (Ilb) d'une cohorte de 30 patients atteints d'eIF2B-pathie (Mut). B. Corrélation entre l'âge de début de la maladie et le taux d'activité GEF	97
Figure 40 : La réponse UPR (Unfolded Protein Response) dans les eIF2B-pathies.....	99
Figure 41 : Formation et mécanisme d'action des miARN et siARN.....	191

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Mutations des cinq gènes codant le facteur eIF2B décrites	267
Annexe 2 : Analyse de corrélation entre les données de l'étude transcriptomique et de QRT-PCR pour 10 gènes sélectionnés	271
Annexe 3 : Etude de l'épissage des gènes <i>PLP1</i> et <i>GFAP</i> dans les cerveaux de patients avec eIF2B-pathies en QRT-PCR.....	279
Annexe 4 : Expression du gène <i>Eif2b5</i> dans les mESC après transfection par les différents shARN.....	280

INTRODUCTION GENERALE

Le complexe eIF2B (eukaryotic Initiation Factor 2B) est un facteur d'échange de guanine (GEF : Guanine Exchange Factor) qui joue, avec son substrat eIF2 (eukaryotic Initiation Factor 2), un rôle régulateur clé dans le processus d'initiation de la traduction. Ce facteur est composé de cinq sous-unités codées par les gènes *EIF2B1* à *B5*. Des mutations dans les cinq gènes ont été mises en cause dans une leucodystrophie appelée classiquement syndrome CACH/VWM (Childhood Ataxia with Central Hypomyelination/Vanishing White Matter). Le nombre important de mutations ainsi que la présence d'un large spectre clinique allant de formes congénitales très sévères à des formes adultes modérées voire asymptomatiques a conduit à la notion d'**eIF2B-pathies**. Les premières études fonctionnelles ont permis de montrer que les mutations eIF2B induisent i) une diminution de l'activité GEF du facteur eIF2B, ii) une dérégulation de la réponse UPR (Unfolded Protein Response) suite à un stress cellulaire, et iii) une anomalie de maturation des astrocytes, cellules hautement spécialisées et indispensables à l'homéostasie du système nerveux central (SNC).

Les travaux réalisés au cours de cette thèse se sont inscrits dans la continuité des interrogations actuelles et ont porté sur deux problématiques complémentaires :

- **Valider la spécificité d'un marqueur diagnostique** des eIF2B-pathies. Pour cela, la spécificité de la diminution de l'activité GEF a été évaluée dans les lymphoblastes (Ilb) de 63 patients atteints d'eIF2B-pathie en comparaison avec des patients présentant un phénotype de type CACH/VWM mais non porteurs de mutations du facteur eIF2B, avec des patients atteints d'autres types de leucodystrophies (LDs) déterminées et avec des sujets cliniquement sains, pris comme contrôles.

- **Comprendre les mécanismes moléculaires en cause** dans la pathologie et **étudier les conséquences fonctionnelles** des mutations eIF2B.

Pour cela, les conséquences fonctionnelles des mutations du facteur eIF2B sur la réponse au stress du réticulum endoplasmique (RE) ont tout d'abord été analysées dans les Ilb d'une cohorte de 12 patients en comparaison de sujets contrôles.

Dans un second temps, une étude transcriptomique différentielle a été réalisée entre les fibroblastes (Fbs) de 10 patients porteurs de mutations du facteur eIF2B, ceux de 10 patients atteints d'autres types de LDs déterminées et les Fbs de sujets contrôles. Grâce à cette étude fonctionnelle, des hypothèses concernant la physiopathologie de cette maladie neurodégénérative sévère pourront être proposées afin d'aboutir à de nouvelles pistes de recherche.

Enfin, l'étude des conséquences fonctionnelles des mutations du facteur ubiquitaire eIF2B dans les cellules du SNC et au cours du développement est une étape

nécessaire qui permettra d'émettre des hypothèses sur la physiopathologie de cette maladie sévère afin d'envisager ensuite le développement d'approches thérapeutiques. Pour cela, le modèle des cellules souches embryonnaires murines (mESC) a été utilisé afin d'étudier l'impact d'un défaut génétique introduit dans ces cellules (mimant les mutations eIF2B) sur leur différenciation en cellules gliales. Cela laisse envisager l'application de ce modèle *in vitro* de la pathologie à des cellules souches humaines.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Développement du système nerveux central

A. Développement embryonnaire précoce

Le développement embryonnaire est un processus très régulé qui peut être divisé en trois grandes phases. La première débute après la fécondation et conduit à la **formation du blastocyste** (1^{ère} et 2^{ème} semaine chez l'homme). La seconde phase est l'étape embryonnaire proprement dite, elle comprend **l'implantation de l'embryon, la gastrulation et l'organogénèse précoce** (2^{ème} à 8^{ème} semaine de développement). Et enfin la dernière phase de morphogénèse qui est la période dite fœtale correspond à la **phase de croissance et de développement du fœtus** (9^{ème} à 38^{ème} semaine du développement) (Cochard et Netter, 2003).

Durant les deux premières semaines après la fécondation, le blastocyste se développe. Au stade blastocyste précoce (E5), les cellules polaires externes forment un épithélium, le **trophectoderme** (TE, composé de cellules trophoblastiques) et les cellules apolaires internes forment la **masse cellulaire interne** (Inner Cell Mass, ICM). Ces deux tissus forment les deux premiers lignages différenciés de l'embryon. Le TE renferme la cavité blastocélique et l'ICM. Au 8^{ème} jour, l'ICM du blastocyste se différencie en deux couches, l'**épiblaste** (Epi) qui est recouvert d'un épithélium et l'**endoderme primitif** (Epr, aussi appelé endoderme extraembryonnaire ou **hypoblaste**) qui le sépare de la cavité blastocélique (Figure 1). Ces deux couches restent jointes et accolées et constituent le disque embryonnaire didermique (Mitchell et al., 2005; Encha-Razavi et Escudier, 2011).

L'étape ultérieure du développement est la formation du troisième feuillet embryonnaire. Ce processus crucial est appelé la **gastrulation** et débute à E15 chez l'homme. Les deux premiers feuillets, l'épiblaste et hypoblaste, déjà formés vont subir de profond changements suite à des mouvements cellulaires intenses. A partir de ce moment, l'épiblaste devient l'**ectoderme** et l'hypoblaste l'**endoderme**, suite à la formation du troisième feuillet embryonnaire qui commence à s'étendre entre les deux premiers feuillets : le **mésoderme intraembryonnaire**. C'est également au cours de la gastrulation que les axes antéro-postérieurs et la symétrie bilatérale de l'embryon sont établis. Chaque feuillet primordial de l'embryon va former des tissus du fœtus et de l'adulte au cours d'un processus complexe et coordonné qui donne naissance aux différents tissus de l'organisme au cours de l'organogénèse. L'endoderme définitif va principalement donner le foie, l'intestin, le pancréas, les poumons, les tissus épithéliaux d'une façon générale. Le mésoderme va former, entre autre, le cœur, les vaisseaux, les cellules hématopoïétiques, les vertèbres, les muscles et

les reins. L'ectoderme va donner les tissus du système nerveux et la peau (Mitchell et al., 2005). Les cellules de la lignée germinale émergent au cours de la différenciation de ces trois feuillettes par l'individualisation d'une niche spécifique dont le devenir modifie le programme d'expression génétique somatique pour parvenir à la formation de la niche germinale.

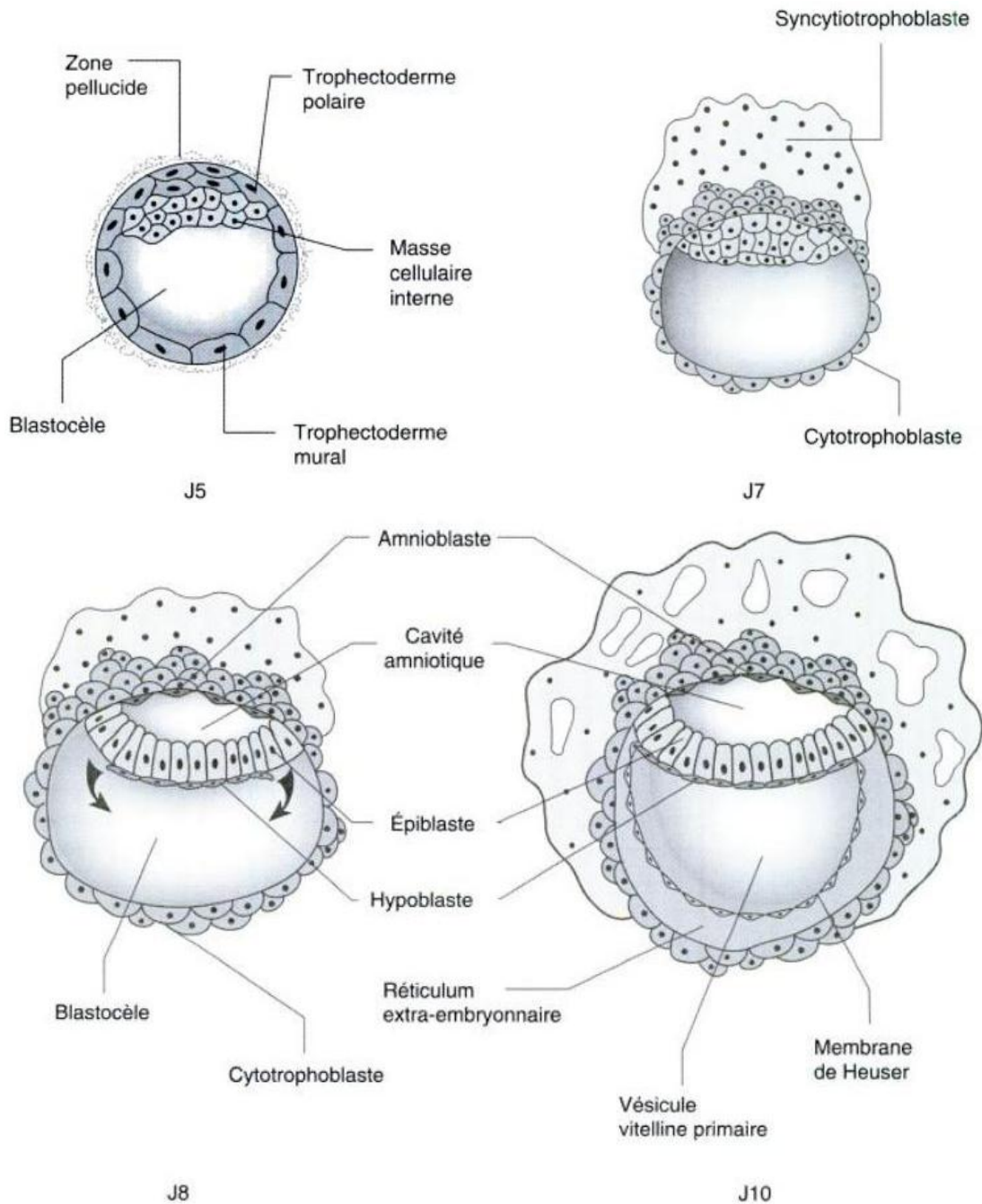


Figure 1 : Modification du blastocyste, mise en place du disque embryonnaire didermique et des cavités (Encha-Razavi et Escudier, 2011).

B. Morphogenèse cérébrale

Pour revue, Götz, 1999; Delhay-Bouchaud, 2001.

1. Formation du tube neural

L'émission de signaux du mésoderme vers l'ectoderme induit la **neurulation**, c'est-à-dire la différenciation d'une partie des cellules ectodermiques en neurectoderme qui donnera naissance au système nerveux. Au début de la troisième semaine, l'ectoderme, induit à la face dorsale de l'embryon, s'épaissit et se différencie en une **plaque neurale** (Figure 2a). Des phénomènes de modelage au sein de cette plaque entraînent son élongation et son effilement latéral. Rapidement les bords latéraux de la plaque neurale se soulèvent et réalisent ainsi la **gouttière neurale** (Figure 2b). Au cours de la quatrième semaine du développement, cette nouvelle structure se ferme par soudure des deux lèvres sur la ligne médiane. Il en résulte la formation du **tube neural** dont les extrémités crâniale et caudale seront les dernières à se fermer (Figure 2c). Juste avant la fermeture du tube neural, la zone de jonction entre les bords de la gouttière neurale et de l'ectoderme adjacent se détache par délamination latérale et forme de chaque côté du tube neural un cordon longitudinal qui donne naissance aux cellules de la **crête neurale** (Figure 2d). L'ectoderme, qui formera la future peau s'est reconstitué au-dessus du tube neural flanqué des deux crêtes neurales.

Le tube neural donne naissance au **SNC** (cerveau et moelle épinière) et les crêtes neurales au **système nerveux périphérique** (SNP) somatique (nerfs et ganglions) et végétatif (systèmes sympathique et parasympathique). La partie antérieure du tube neural donnera l'**encéphale**, autour duquel se constituera la boîte crânienne à laquelle participeront activement les cellules des crêtes neurales de cette région. Dès la fin du premier mois de développement, cette partie antérieure du tube neural comporte trois renflements successifs qui s'individualisent en vésicules. Elles sont inclinées les unes par rapport aux autres et par rapport à la moelle épinière selon une courbure générale à concavité ventrale. On peut ainsi rapidement distinguer le **proencéphale**, le **mésencéphale** et le **rhombencéphale** (Figure 3). La partie caudale du tube neural reste plus cylindrique et donne naissance à la **moelle épinière**.

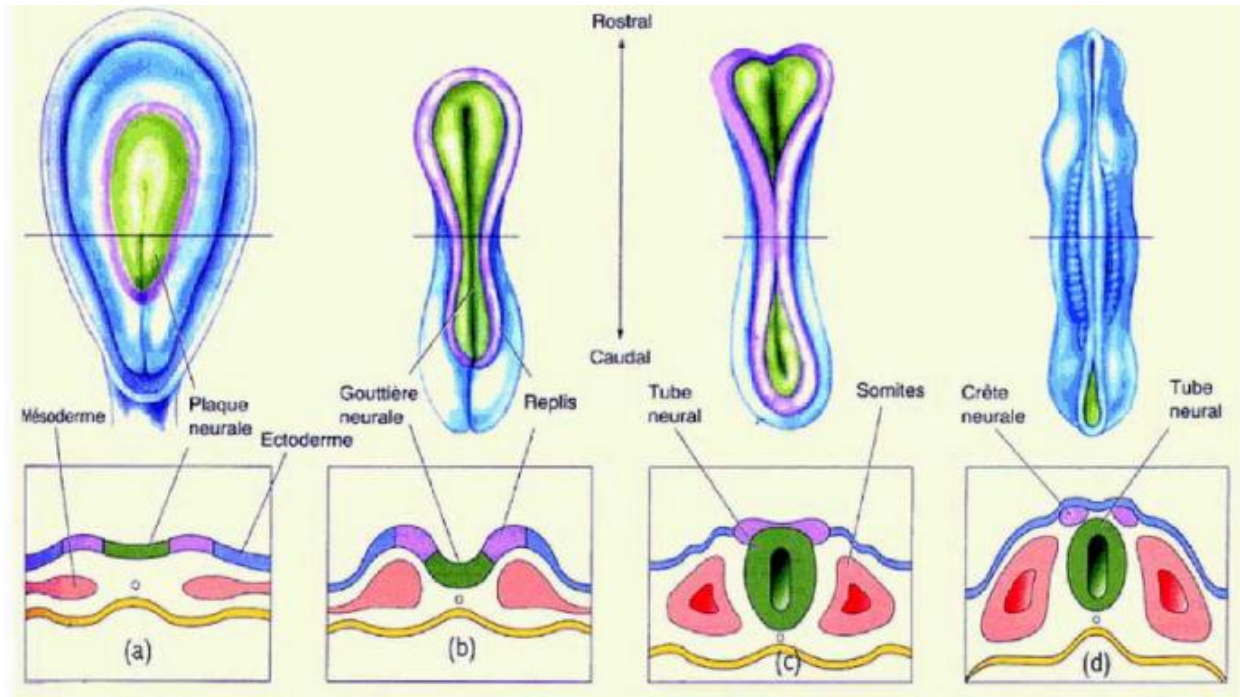


Figure 2 : Formation du tube neural et des crêtes neurales. Ces schémas illustrent les premiers stades du développement du système nerveux chez l'embryon. Les schémas du haut représentent les vues dorsales de l'embryon; ceux du dessous sont des coupes transversales. **a)** Le système nerveux le plus primitif est représenté par un faible épaissement de l'ectoderme, la plaque neurale. **b)** La première phase importante du développement du système nerveux est représentée par la formation de la gouttière neurale. **c)** Les bords de la gouttière se referment pour former le tube neural. **d)** La partie de l'ectoderme qui se trouve au contact du tube neural forme la crête neurale, à partir de laquelle se développe le système nerveux périphérique. Les somites se différencient à partir du mésoderme pour donner le squelette et les muscles (<http://www.neur-one.fr>).

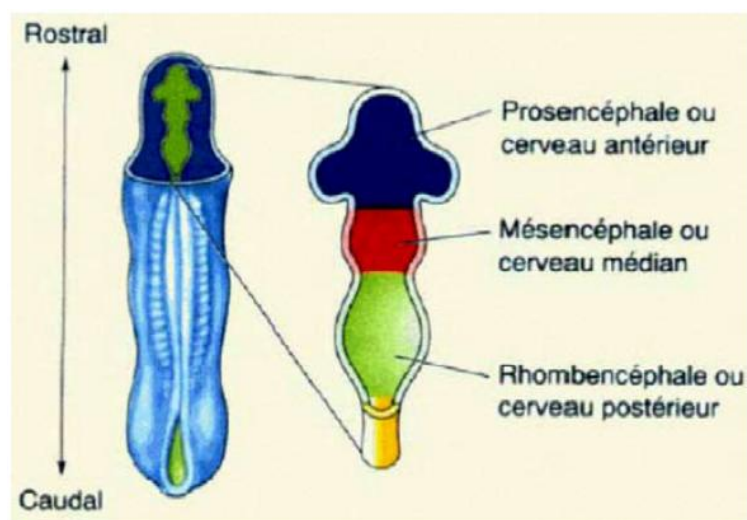


Figure 3 : Les trois vésicules primitives du cerveau. La partie rostrale du tube neural se différencie pour former les trois vésicules à l'origine de l'ensemble du système nerveux (<http://www.neur-one.fr>).

2. Différenciation du cerveau

Au début du deuxième mois de gestation, l'embryon poursuit activement son développement. Une subdivision de deux des vésicules primitives aboutit à l'individualisation de cinq vésicules. Le prosencéphale se partage en une vésicule antérieure, le **télocéphale**, qui comprend une région moyenne et deux expansions latérales, les futurs hémisphères cérébraux, et une vésicule postérieure ou **diencephale**. Le rhombencéphale se divise également en **métencéphale**, qui formera la protubérance annulaire et le cervelet, et en **myélocéphale**, futur bulbe rachidien ; ces deux structures étant délimitées par la courbure pontique. Le **mésencéphale** en revanche ne subit que des modifications mineures (Figure 4). La cavité dilatée du rhombencéphale constitue le futur IVème ventricule et l'aqueduc de Sylvius, celle du diencephale le IIIème ventricule, et celles des hémisphères cérébraux les ventricules latéraux. Ces diverses cavités restent en continuité avec la lumière de la moelle épinière en formation ou canal de l'épendyme, ce qui assure la libre circulation du liquide céphalorachidien (LCR) dans l'ensemble du SNC.

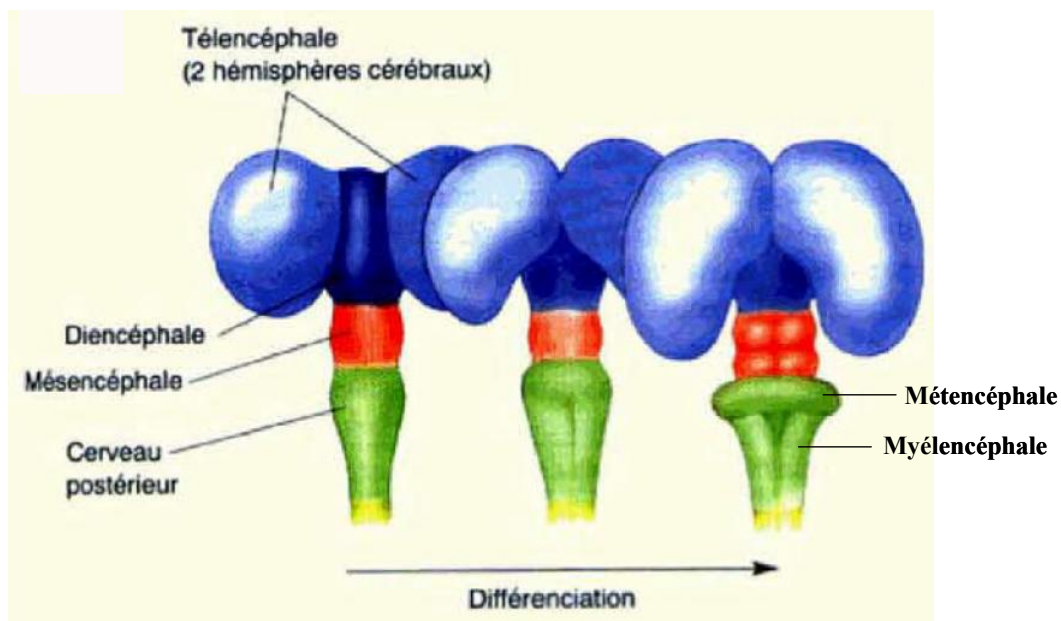


Figure 4 : Différenciation du cerveau. Le prosencéphale se différencie en une paire de vésicules télencéphalique et optique, et en un diencephale. Au cours du développement, les vésicules télencéphaliques forment les hémisphères cérébraux qui se développent postérieurement et latéralement de telle sorte qu'ils enveloppent le diencephale. Les bulbes olfactifs émergent de la surface ventrale de chaque vésicule télencéphalique. Le rhombencéphale se différencie pour former le métencéphale (futur pont et cervelet) et le myélocéphale (futur bulbe rachidien) (<http://www.neur-one.fr>).

C. Cellules souches embryonnaires

Au stade le plus précoce de leur formation, la paroi des vésicules cérébrales est très fine, non vascularisée et est formée d'un épithélium pseudo-stratifié simple, composé d'une **zone ventriculaire (ZV)** et d'une **zone marginale**. Des **cellules souches** sont présentes dans ces structures et participent à la différenciation des cellules neurales.

1. Origine et propriétés des cellules souches embryonnaires

Les **cellules souches embryonnaires** (Embryonic Stem Cells, ESC) ont été isolées pour la première fois chez la souris à partir de la mise en culture de l'ICM dérivé d'un embryon au stade blastocyste (Evans et Kaufman, 1981; Martin, 1981). Ces cellules sont **pluripotentes** et sont capables de se différencier *in vivo* dans tous les organes de l'embryon. *In vitro*, elles sont capables de donner tous les types cellulaires, y compris les cellules de la lignée germinale, mais à l'exception des tissus extra-embryonnaires (Figure 5). Les ESC sont également en **autorenouvellement**. Maintenues *in vitro* dans des conditions appropriées, elles prolifèrent de façon illimitée en maintenant leur propriété de pluripotence sans modification majeure de leur caryotype. Dans le modèle souris, un des facteurs clé de cet autorenouvellement est le **LIF** (Leukemia Inhibitory Factor), qui active la voie **STAT3** (Signal Transducer and Activator of Transcription 3), voie de signalisation inhibant la différenciation (*pour revue*, Smith, 2001; Burdon et al., 2002). Sur les bases de cette définition, il existe différents types de cellules souches définies par leurs capacités de différenciation et dont les potentialités sont différentes selon les tissus et l'état physiologique de l'individu (Figure 6). Dans une approche développementale, différentes classes de cellules souches peuvent être identifiées. Après la fécondation, le zygote et la morula sont constitués de cellules dites **totipotentes**. Ces cellules sont capables de donner l'ensemble des lignages embryonnaires et extra-embryonnaires, y compris la lignée germinale. Les ESC isolées de l'embryon au stade blastocyste sont dites **pluripotentes**, c'est-à-dire qu'elles sont capables de donner tous les lignages embryonnaires, y compris germinales dans le modèle souris, mais ne contribuent plus aux annexes extra-embryonnaires. Les autres types de cellules souches présentes dans les tissus fœtaux ou adultes sont appelées **cellules souches adultes ou tissulaires**. Certaines d'entre elles gardent des capacités de différenciation importantes et on parle de **multipotence** si elles sont capables de générer plusieurs types cellulaires différenciés différents. On peut citer les ESC hématopoïétiques, mésenchymateuses, neurales, intestinales, épidermiques, etc. Tous ces types cellulaires donnent naissance à plusieurs autres cellules qui

participent au maintien homéostatique des différents tissus dans lesquels elles se trouvent. Il apparaît que de nombreux tissus différenciés présentent également des « pools » de cellules souches qui obéiraient aux mêmes concepts que ceux identifiés dans les modèles mieux caractérisés comme dans le cœur, le poumon, le foie, le rein, etc.

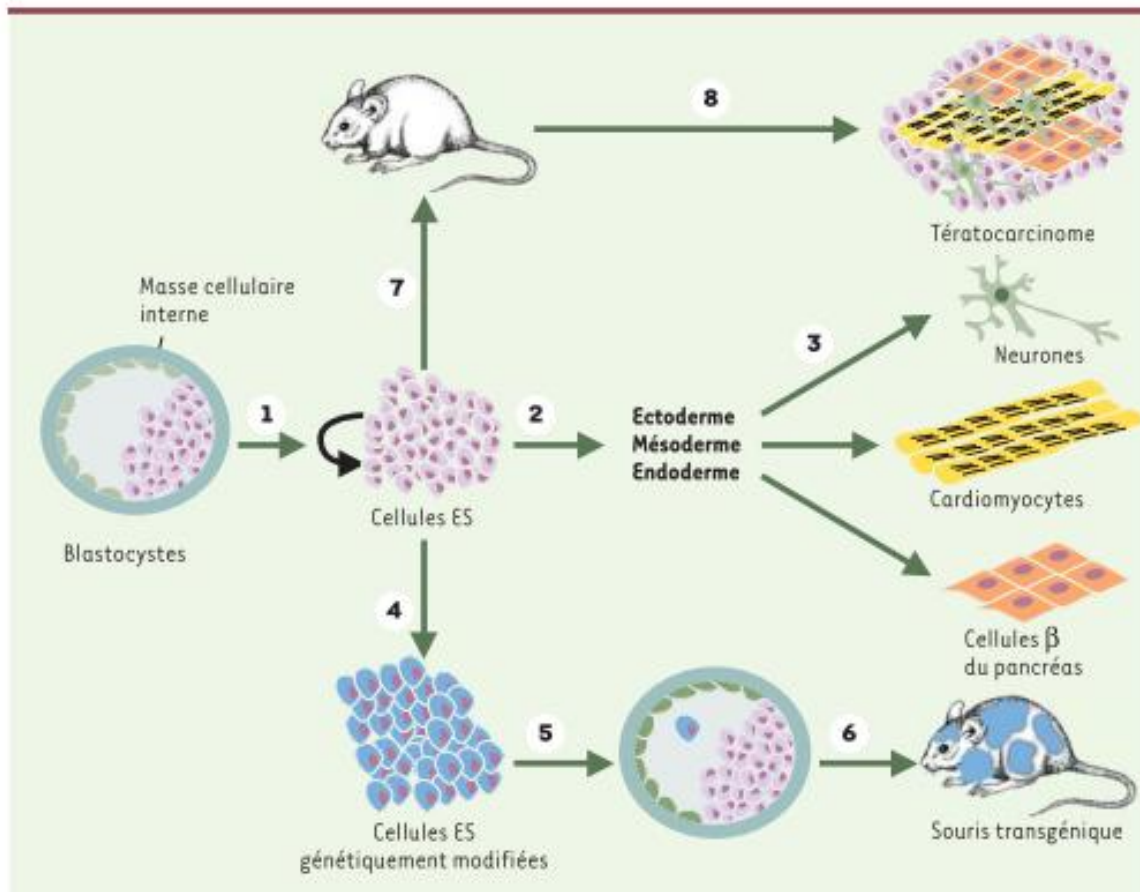


Figure 5 : Origine et propriétés cardinales des cellules souches embryonnaires (ESC). Les lignées d'ESC sont fabriquées à partir de la masse cellulaire interne du blastocyste. **1)** *In vitro*, les ESC sont capables de s'autorenouveler indéfiniment. **2)** Elles sont capables de se différencier en cellules des trois feuilletts primitifs : ectoderme, mésoderme et endoderme. **3)** Ces cellules précurseurs sont ensuite capables de se différencier en cellules matures fonctionnelles comme des neurones, des cardiomyocytes ou des cellules β pancréatiques. **4)** Les ESC peuvent être modifiées génétiquement. **5)** Une seule cellule ainsi modifiée peut être ensuite implantée dans un blastocyste receveur où elle va poursuivre son programme de différenciation (**6**) et contribuer à la formation de tous les lignages constituant l'organisme adulte. **7)** La greffe d'ESC dans une souris adulte produit un tératocarcinome (**8**) composé d'ESC pluripotentes et de cellules différenciées représentant les trois feuilletts embryonnaires (Fluckiger et al., 2003).

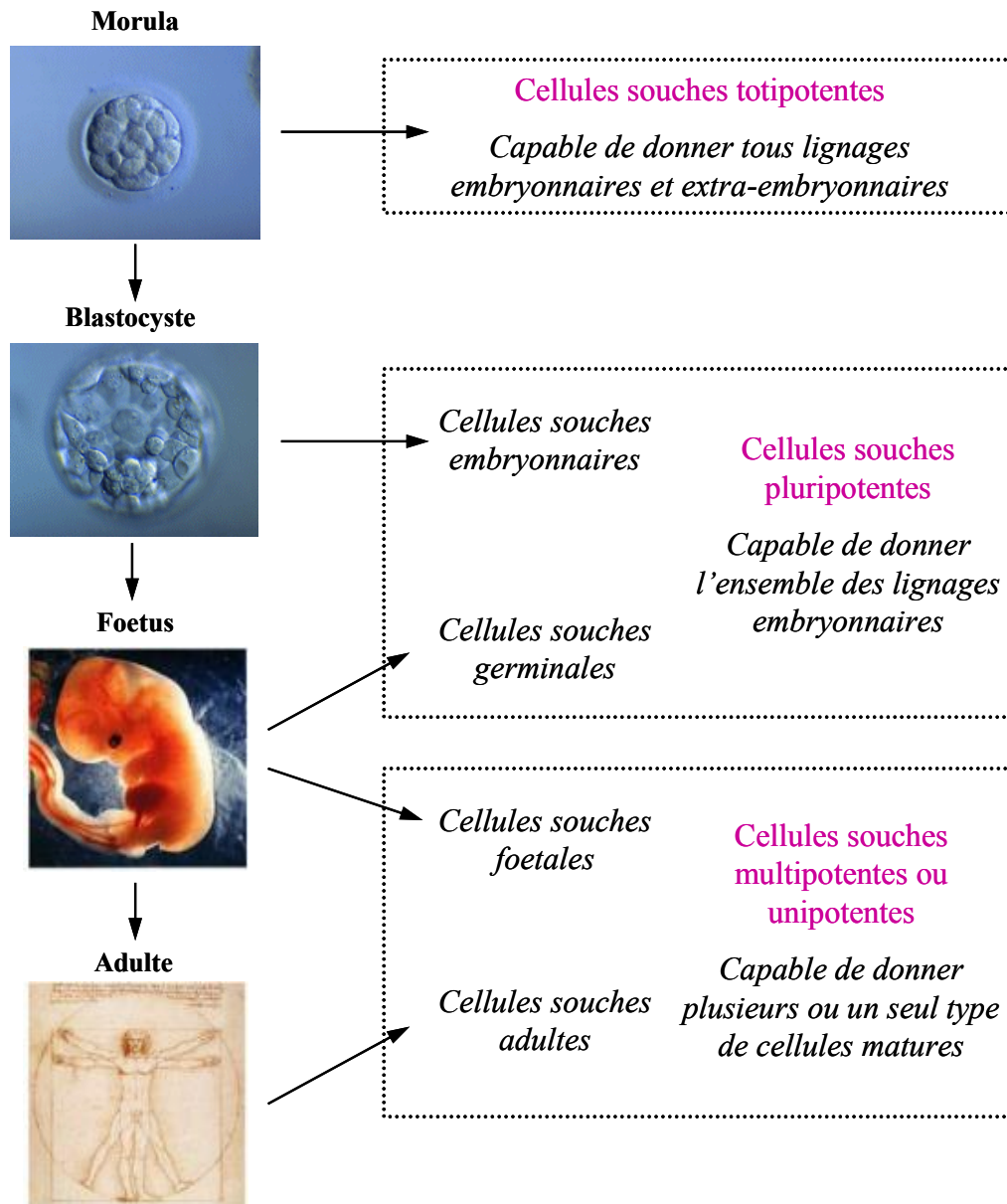


Figure 6 : Potentialités de différenciation des cellules souches au cours de la vie.

2. Maintien de la pluripotence des cellules souches embryonnaires

Dans le modèle mammifère, le concept de pluripotence apparaît particulièrement bien régulé. Trois gènes codant pour des facteurs de transcription sont au cœur de la régulation de l'identité des ESC chez les mammifères. Il s'agit des gènes **OCT4/POU5F1** (*Octamer-binding transcription factor 4*), **SOX2** (*SRY-related HMG-box gene 2*) et **NANOG** qui sont des gènes dont l'expression est plus spécifique de l'ICM des blastulas murines et humaines. Les premières études indiquaient que les embryons déficients pour le facteur OCT4 ne peuvent se développer au delà du stade blastocyste et que les ESC présentant un niveau d'expression d'OCT4 perturbé perdaient leur propriété d'autorenouvellement en induisant leur différenciation (Nichols et al., 1998; Niwa et al., 2000). Le facteur de transcription SOX2 a été identifié par des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine dans les ESC et le produit de ce gène forme avec OCT4 un complexe protéique. Ces deux gènes contrôlent également *via* une régulation croisée le maintien de la pluripotence des ESC (Niwa, 2007). De plus, une balance fine entre les niveaux d'expression des facteurs OCT4 et Cdx2 (Caudal type homeobox 2), marqueur précoce des cellules trophoblastiques, contrôle le devenir des cellules de l'embryon très précoce entre TE et ICM. Concernant le facteur de transcription à homéodomaine NANOG, il est démontré que ce gène soutient l'autorenouvellement des ESC de souris en l'absence de LIF (Mitsui et al., 2003; Chambers, 2004).

3. Différenciation des cellules souches embryonnaires en précurseurs neuraux

Des lignées d'ESC pluripotentes ont été isolées chez les primates (singes Rhésus, Cynomolgus et Marmoset) ainsi que chez l'homme. Les ESC humaines, appelées hESC, présentent les mêmes propriétés cardinales que les ESC de souris (c'est-à-dire une immortalité et une pluripotence *in vitro*), mais sont différentes par certaines caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles. En particulier, les hESC ne semblent pas dépendantes du LIF pour leur autorenouvellement mais dépendantes du FGF (Fibroblast Growth Factor), ce qui suggère qu'elles sont plus proches des cellules souches épiblastiques (Epiblaste Stem Cells, EpiSC) que des ESC (*pour revue*, Smith, 2001). Parce qu'elles représentent une réserve cellulaire quasi illimitée et possèdent la capacité de se différencier en cellules spécialisées *in vitro*, les ESC constituent un outil de choix pour le développement de nouvelles approches thérapeutiques fondées sur le remplacement cellulaire. En l'état actuel des connaissances,

différents types d'hESC ont été isolées soit provenant des blastocystes, soit issues de la reprogrammation des cellules fibroblastiques *via* le processus décrit par le Pr. S. Yamanaka (Takahashi et al., 2007). Ce dernier aspect est sans doute le plus prometteur en terme de thérapeutique.

A partir de ces différents types cellulaires, plusieurs stratégies visant à orienter spécifiquement la différenciation des ESC en précurseurs neuraux ont été élaborées. Pour la plupart, ces stratégies passent par une étape transitoire, la formation d'un **corps embryoïde** (Embryoid Body, EB), composé de cellules souches induites à se différencier et qui s'engagent dans différentes voies de cellules précurseurs représentatives des trois feuilletts embryonnaires : ectoderme, mésoderme et endoderme. À partir des EB, deux protocoles de référence ont été établis pour dériver des précurseurs neuroectodermiques. L'un utilise l'**acide rétinolique** (Fraichard et al., 1995; Bain et al., 1996), l'autre est fondé sur l'utilisation d'un milieu de culture **dépourvu de sérum** et **enrichi en facteurs de croissance spécifiques** (Okabe et al., 1996). Ces protocoles permettent d'obtenir de 30% à 90% de cellules présentant des caractéristiques de cellules neuroépithéliales indifférenciées. Ces cellules induites sont caractérisées en particulier par l'expression du marqueur neurofilament **Nestine**. Au cours de ce protocole d'induction, les ESC présentent des modifications morphologiques majeures qui se caractérisent par la formation d'un épithélium cylindrique organisé radialement et qui est appelé **rosette neurale**. Cette structure contient des progéniteurs neuroépithéliaux et reproduit l'aspect en deux dimensions d'une coupe transversale du tube neural évoqué ci-dessus (Figure 7). Les rosettes neurales expriment des marqueurs neuroectodermiques comme les facteurs de transcription **PAX6** (Paired-box gene 6) et **SOX1** (SRY-related HMG-box gene 1) et sont compétentes pour répondre à des signaux développementaux leur permettant de se différencier en différents types de neurones et en cellules gliales (Li et al., 2005).

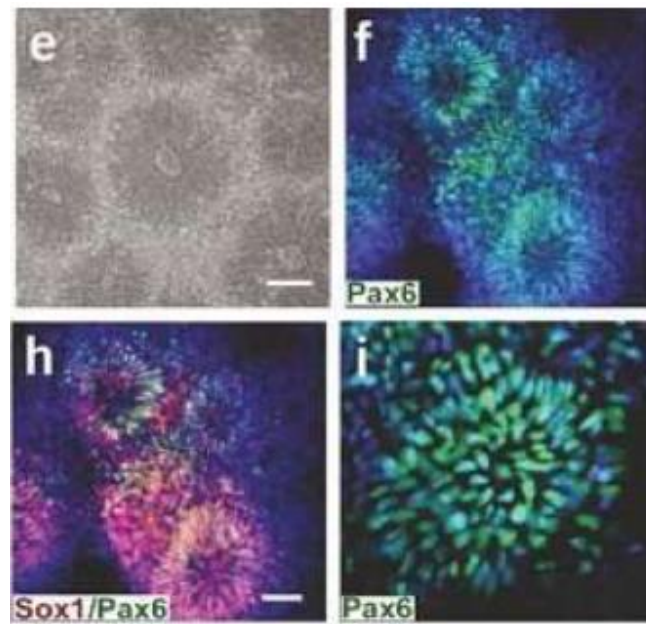


Figure 7 : Cellules neurales obtenues à partir de cellules souches embryonnaires humaines (hESC). Les hESC s'organisent en rosettes neurales évoquant la coupe transversale d'un tube neural. Aspect morphologique typique en microscopie par contraste de phase (e). Les cellules à l'intérieur des rosettes sont positives pour les facteurs de transcription *PAX6* (*Paired-box gene 6*) et *SOX1* (*SRY-related HMG-box gene 1*) (f, h, i) (Li et al., 2005).

D. Histogenèse cérébrale

Pour revue, Götz, 1999.

Au cours du développement précoce, la mise en place des structures cérébrales aboutit à la formation de cellules particulières dont l'organisation et l'architecture sont particulièrement bien contrôlées. Les grandes phases de l'histogenèse cérébrale sont représentées sur la Figure 8.

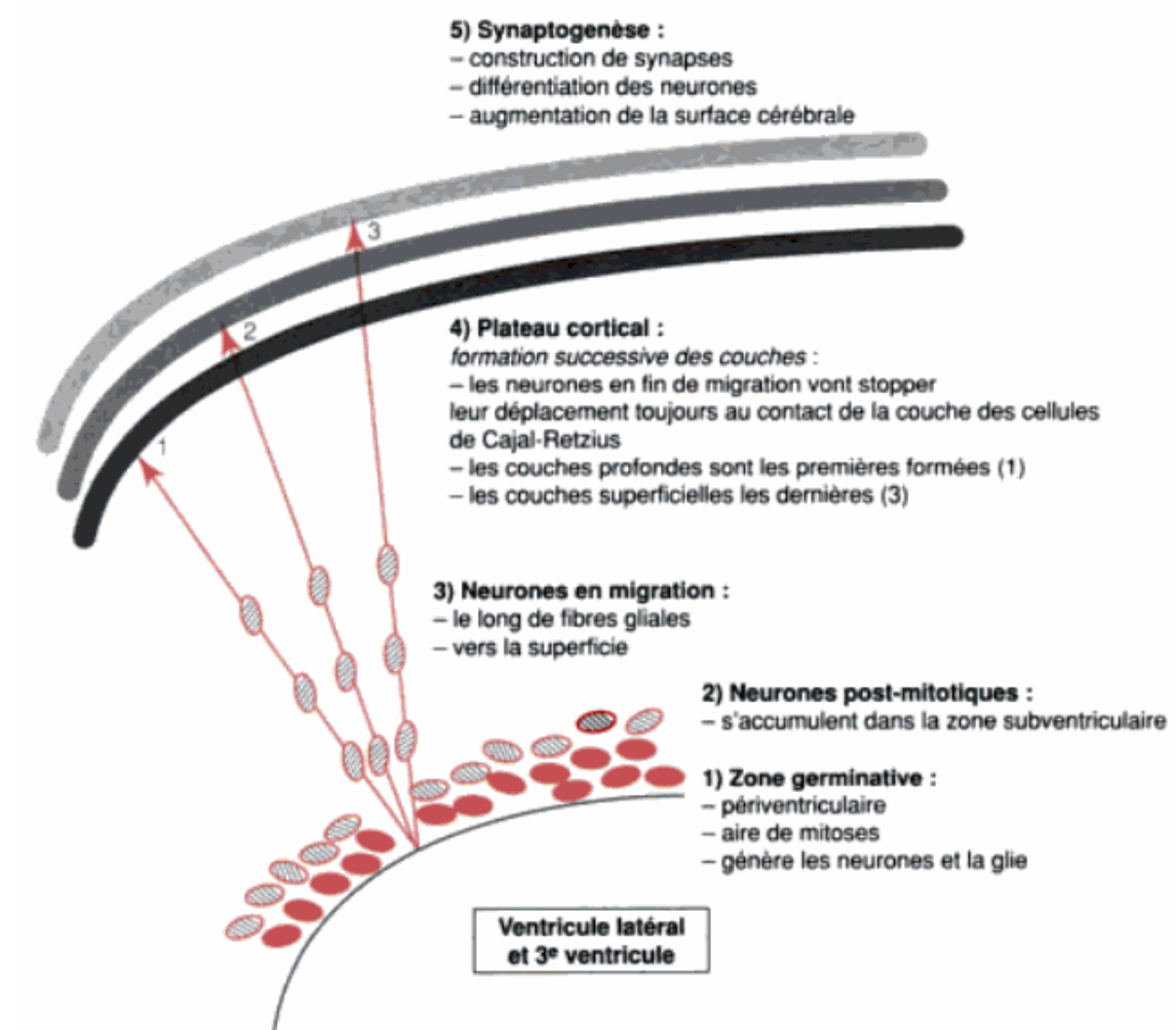


Figure 8 : Principes généraux de l'histogenèse télencéphalique (Adamsbaum, 2001).

L'observation des transformations du tube neural au cours du développement fœtal permet d'expliquer l'organisation du cerveau et l'ajustement des différents types cellulaires le composant. En effet, peu après la fermeture du tube neural, les cellules columnaires disposées en une seule assise qui forment la paroi neuroépithéliale commencent à se diviser de façon répétitive. Dans la paroi du tube neural, les cellules de la lignée neuronale s'accumulent en formant une couche interne, le manteau, qui donnera la future **substance grise** (SG).

Une des caractéristiques uniques du développement cérébral des mammifères est la différence entre l'endroit où les cellules sont générées et le lieu où elles achèvent leur différenciation. Les précurseurs cellulaires, ou cellules souches neurales, sont présentes à haute densité autour des ventricules embryonnaires au sein de zones appelées **zones ventriculaires** (ZV) ou **germinatives**. Les migrations cellulaires sont d'autant plus importantes que l'on progresse vers l'extrémité antérieure du SNC. Inexistantes dans la moelle épinière où les corps cellulaires restent groupés autour du canal de l'épendyme, elles deviennent nettes dans le tronc cérébral où des amas cellulaires vont migrer à distance des cavités ventriculaires pour constituer les noyaux spécifiques du tronc cérébral. Ces migrations atteignent leur maximum au niveau du cervelet et dans les hémisphères cérébraux où de très nombreux neurones migrent en périphérie pour former le cortex cérébelleux et le cortex cérébral. Il en est de même pour les futures cellules gliales qui vont progressivement coloniser la paroi du tube neural à partir de leur positionnement initialement axial.

Chez l'homme, après une phase de **prolifération** active à la surface ventriculaire du télencéphale, le **neurone post-mitotique** va entamer une migration vers le plateau cortical en s'enroulant autour d'un guide constitué par les prolongements d'une cellule gliale, tendus entre le bord ventriculaire et la surface méningée (d'où le nom de **glie radiaire**). Les premiers neurones à atteindre le plateau cortical constituent la couche marginale superficielle, ce sont les neurones de Cajal-Retzius (couche de Cajal-Retzius, cCR), et la sous-plaque en profondeur (destinée à disparaître à la fin de la constitution du plateau cortical). Les neurones suivants vont s'intercaler entre ces deux couches, tout en gagnant la position la plus superficielle possible. La migration s'arrête au contact des neurones de la cCR. Il en résulte que les couches profondes du cortex sont mises en place avant les couches superficielles. Au cours de la gestation du fœtus humain, la migration neuronale se déroule de la 10^{ème} à la 25^{ème} semaine (Goffinet, 1994; Adamsbaum, 2001).

Les faisceaux de fibres mettant en relation les diverses parties du cerveau se développent alors : les axones issus des neurones corticaux et ceux qui s'y rendent et s'y projettent constituent la substance blanche (SB) corticale. La capsule interne relie le cortex au tronc cérébral, et le corps calleux qui se met en place vers la 10^{ème} semaine relie les deux

hémisphères cérébraux (Figure 9A). Vers le milieu de la grossesse, l'augmentation considérable de la surface des hémisphères entraîne l'apparition des circonvolutions et des scissures délimitant les différents lobes. Cette croissance spectaculaire est due à la fois à la différenciation des neurones et à la multiplication des cellules gliales. En effet, après migration à leur emplacement définitif, les neurones se groupent en ensembles compacts pour constituer des noyaux ou cortex ayant la même fonction, puis émettent et **enrichissent leurs prolongements cellulaires** pour former le maximum d'interactions. Dès la septième semaine de gestation, les neurones commencent à établir entre eux des synapses et ce processus va se poursuivre dans les zones cérébrales de maturation tardive jusqu'à l'adolescence. Lors de la construction des réseaux neuronaux, il y a d'abord une **phase de croissance et de guidage de l'axone vers sa cible** permettant l'établissement de synapses initiales. Puis cette phase est suivie d'une phase de **remodelage des circuits initiaux** qui induit la régression de certaines synapses et qui aboutit à la construction des réseaux neuronaux matures plus robustes.

Les cellules de la glie radiaire, qui jouent un rôle crucial dans la migration cellulaire, apparaissent en même temps que les premiers neurones. *A contrario*, les précurseurs gliaux apparaissent lorsque cette phase active de neurogenèse est déjà achevée et migrent dans la SG et la SB où ils vont se différencier pour assurer les diverses fonctions métaboliques et de soutien qu'on leur reconnaît dans le système nerveux adulte (*pour revue*, Delhay-Bouchaud, 2001).

A l'issue de ce processus développemental complexe, le cerveau est alors constitué de deux composantes principales régionalisées (Figure 9B) : la **SG riche en corps cellulaires neuronaux** et la **SB dépourvue de synapse qui est essentiellement constituée de faisceaux d'axones et de cellules gliales**.

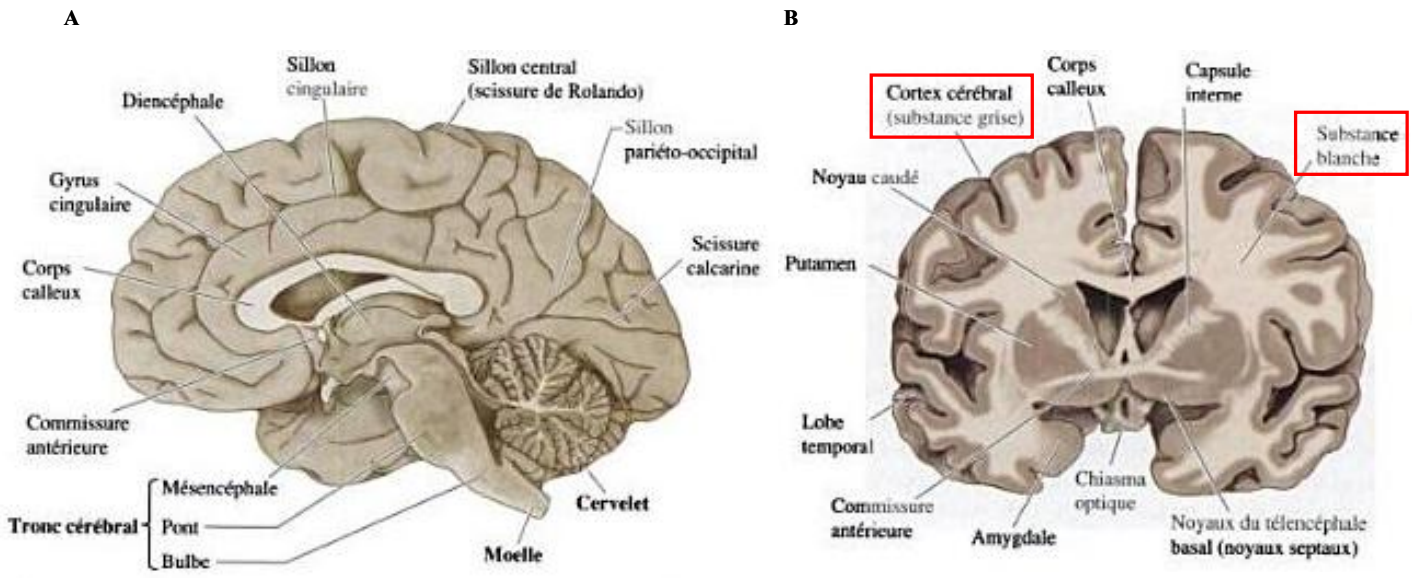


Figure 9 : Anatomie macroscopique du cerveau antérieur. A. Vue sagittale médiane de l'encéphale avec indication des principales structures. **B.** Structures internes du cerveau vues sur une coupe frontale (Purves, 2005).

II. Organisation cellulaire du système nerveux central

A. Substance grise et corps cellulaires neuronaux

Pour revue, Amiel-Tison, 2005; Kierszenbaum, 2006.

La SG, riche en **corps cellulaires neuronaux**, correspond aux régions où s'établissent les connexions interneuronales (**synapses**). C'est donc à son niveau que sont intégrées les informations et que le signal est construit. La SG est donc constituée par le groupement des corps cellulaires neuronaux et de leurs prolongements qui s'établissent suivant une organisation spatiale particulière à chaque région du cerveau.

Les neurones sont des cellules hautement spécialisées et **excitables**. Ils constituent l'**unité fonctionnelle** du système nerveux. Ils sont composés d'un corps cellulaire et de prolongements cytoplasmiques que sont les **dendrites** et les **axones**. Les dendrites reçoivent par l'intermédiaire des synapses des **impulsions électriques** sous la forme de potentiels d'actions venant d'autres cellules nerveuses. Chaque neurone est ainsi muni d'un axone unique permettant la transmission des impulsions nerveuses et de dendrites dont le nombre varie selon la classe du neurone. Le nombre de dendrites peut ainsi s'échelonner de quelques unités à plusieurs milliers selon le site de différenciation des neurones.

Dans le processus de transmission synaptique, la membrane neuronale joue un rôle déterminant dans la genèse et la transmission des messages. Elle possède de nombreux **canaux** qui régulent les échanges ioniques entre milieux intra et extracellulaires. Certains de ces canaux ioniques s'ouvrent passivement mais d'autres ont la propriété de s'ouvrir activement en fonction des courants électriques induits par les **mouvements ioniques** (notamment sodiques et potassiques) de part et d'autre de la membrane. Cette répartition inégale des ions engendre le potentiel d'action, signe électrique élémentaire du message nerveux. Ce potentiel d'action se propage de proche en proche, toujours par modification de la perméabilité membranaire le long des axones, jusqu'à l'**arborisation terminale**. Au niveau des synapses, le passage du message se fait par l'intermédiaire des **neurotransmetteurs**. Les récepteurs post-synaptiques recueillent alors le message délivré par les neurotransmetteurs (Figure 10). Ce sont les protéines spécifiques de la membrane neuronale qui confèrent à chaque partie du neurone sa spécialisation fonctionnelle.

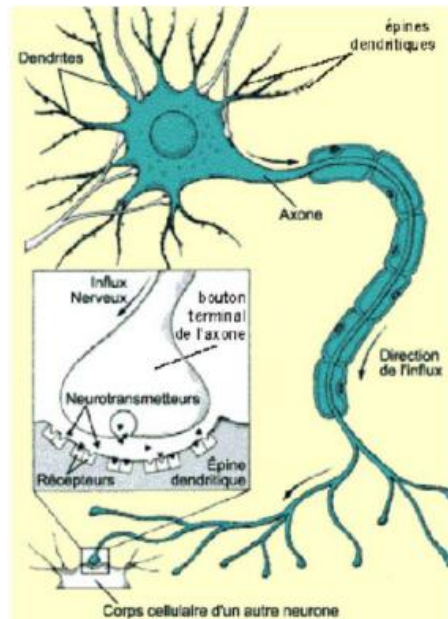


Figure 10 : Schéma d'un neurone (<http://www.neur-one.fr>).

B. Substance blanche et axones

Pour revue, Pritchard et Alloway, 2002; Hirokawa et Takemura, 2005.

La **SB** occupe toutes les régions du SNC laissées libres par la SG. La SB se caractérise principalement par la présence prédominante à son niveau d'**axones myélinisés** groupés parallèlement en faisceaux ou cordons. Aucune synapse ne s'y fait et le rôle fondamental de la SB est donc la **conduction des influx nerveux** vers les zones de la SG où s'effectuent les transmissions synaptiques et le traitement des informations. On y rencontre surtout des **oligodendrocytes** (OLs) assurant la formation et l'entretien des **gaines de myéline** ainsi que des **cellules gliales non myélinisantes** qui assurent la **cohésion et l'homéostasie de la SB** ainsi que les contacts avec les structures environnantes.

Le terme d'**axone** provient à l'origine de l'expression « propagation axiale ». Comme celle-ci le sous-entend, l'axone est un prolongement qui peut s'étendre sur de grandes distances avant d'entrer en contact avec d'autres neurones. Chaque neurone ne possède qu'un seul axone et ce prolongement naît du soma, appelé segment initial (cône). Les axones contiennent des faisceaux de **neurofilaments** et de **microtubules** qui participent au soutien structural et jouent un rôle primordial dans le transport de molécules complexes et de vésicules vers les terminaisons synaptiques. Contrairement aux dendrites, les axones ne

contiennent aucun ribosome et ne participent donc pas à la synthèse protéique. Un axone peut générer des branches collatérales qui se projettent dans différentes régions du cerveau. En pénétrant dans la région cible, l'axone donne ainsi naissance à un réseau de terminaisons qui aboutissent sur un grand nombre de neurones post-synaptiques.

La fonction principale d'un axone est de propager l'information en conduisant les potentiels d'action du soma vers les terminaisons synaptiques. Les axones sont électriquement excitables grâce aux propriétés physico-chimiques de leur membranes liées aux différences des concentrations d'ions spécifiques entre le liquide intra et extracellulaire.

La plupart des molécules protéiques et des organites intracellulaires, nécessaires à l'entretien de l'axone et de ses terminaisons, sont transportés le long de l'axone via le processus appelé **transport axonal**. Ce processus est indispensable car l'axone ne renferme ni ribosome ni réticulum endoplasmique (RE) et toutes les molécules nécessaires à sa physiologie et à sa signalétique doivent être acheminées tout au long de sa structure qui s'étend parfois sur de très longues distances. La vidéomicroscopie et l'analyse du transport d'acides aminés radioactifs ont montré que diverses particules sont transportées à des vitesses différentes et dans les deux sens le long de l'axone, ce qui fait de cette structure unique au niveau de l'organisme une véritable autoroute de transport des nutriments et des informations nécessaires à l'homéostasie de la cellule neuronale.

Le **transport antérograde** concerne le flux du matériel se déplaçant du soma vers les terminaisons synaptiques. Les protéines et les lipides synthétisés par le RE et l'appareil de Golgi sont assemblés dans les organites du soma et pénètrent dans l'axone où ils sont déplacés par les transports antérogades rapides. Après leur entrée dans l'axone, ces matériaux sont rapidement transportés tout au long de celui-ci par les microtubules. Ce processus est assuré par les **kinésines**, molécules qui s'attachent et se détachent alternativement à un organite sur une courte distance. Le processus est ainsi répétitif et assure la progression de la molécule. D'autres composants du neurone, tels que les composants du cytosquelette et leurs protéines associées se déplacent plus lentement, en direction antérograde, sous forme polymérisée. De fait, les neurofilaments et les microtubules d'un axone se déplacent sans arrêt le long de celui-ci. Ils sont dégradés à la terminaison synaptique par dépolymérisation enzymatique. D'autres molécules comme la clathrine, la calmoduline, les microfilaments et plusieurs enzymes sont aussi transportées lentement le long de l'axone de manière antérograde.

Un grand nombre d'organites intracellulaires, d'enzymes et de fragments de membranes sont partiellement dégradés puis stockés dans des vésicules lysosomiales afin de permettre leur **transport rétrograde** vers le soma. Ce processus permet à ces matériaux

d'être recyclés et réutilisés pour la synthèse des nouveaux composants cellulaires. Le transport intervient rapidement. Il est effectué grâce à la **dynéine**, protéine à activité ATPase associée aux microtubules, de nature voisine de la kinésine et qui opère en sens inverse. Outre sa fonction épurative, le transport rétrograde possède aussi d'importantes fonctions liées au développement et aux régulations de la fonction axonale. Chez l'embryon en croissance, les extrémités des neurones en développement trouvent leurs cibles cellulaires spécifiques en se guidant grâce à des substances chimiques comme le facteur de croissance nerveux (Nerve Growth Factor, **NGF**) produit par les cellules cibles. Le NGF est transporté de façon rétrograde vers le soma où il régule la synthèse du matériel qui sera ensuite transporté à l'extrémité distale de l'axone en croissance. De même, chez l'adulte, les axones dépendent de facteurs neurotrophiques produit par le neurone postsynaptique.

C. Les cellules gliales

Les cellules gliales sont présentes à la fois dans la SG et la SB du SNC.

1. Les cellules épendymaires

Pour revue, Stevens et Lowe, 1997; Kierszenbaum, 2006; Del Bigio, 2010.

Les cellules épendymaires ou **épendymocytes** sont des cellules de type épithélial qui tapissent les cavités des ventricules de l'encéphale et le canal central de la moelle épinière (canal de l'épendyme), formant une couche de cellules cubiques au contact du LCR (Figure 11). Le domaine apical des cellules épendymaires possède de très nombreuses **microvillosités** et un ou plusieurs **cils** selon leur localisation. Les épendymocytes voisins sont unis par des **desmosomes** et leur domaine basal est en contact avec les prolongements astrocytaires. Les cellules épendymaires règlent les mouvements de solutés entre le LCR et le compartiment extracellulaire du SNC. Grâce aux battements de leurs cils, ces cellules assurent la **circulation du LCR**. Elles exercent également une activité d'**endocytose**, de **phagocytose** et de **dégradation lysosomale** vis à vis de diverses molécules ou particules présentes dans le LCR. Les épendymocytes fourniraient également un support trophique et probablement métabolique aux cellules progénitrices des régions périventriculaire.

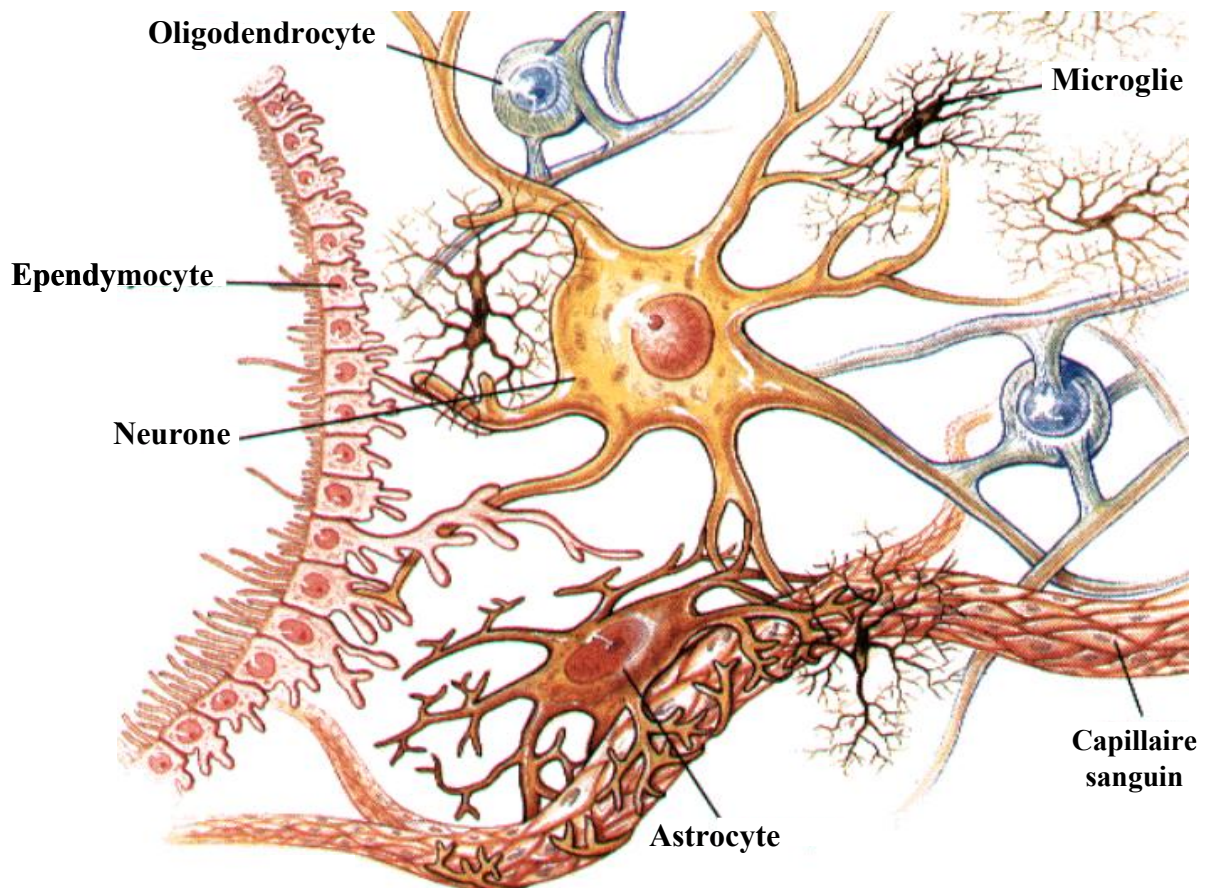


Figure 11 : Cellules nerveuses composant le système nerveux central (SNC). Les astrocytes permettent les échanges nutritifs entre les neurones et les vaisseaux sanguins. Les cellules microgliales ont un rôle de phagocytose des microorganismes étrangers pénétrant le SNC. Les épendymocytes permettent la circulation du liquide céphalo-rachidien. Et enfin, les oligodendrocytes sont les cellules myélinisantes du SNC (http://www.dgpc.ulaval.ca/bio90192/chap5/laval_5.ppt).

2. Les cellules microgliales

Pour revue, Stevens et Lowe, 1997; Tritsch et al., 1999; Kim et de Vellis, 2005.

Le SNC possède un ensemble de cellules immunitaires qui lui est propre, constitué principalement des **microgliocytes**, qui sont des **macrophages spécialisés** (Figure 11). Ce sont des cellules mobiles et très polymorphes dont le phénotype dépend de l'environnement et du stade de développement. Du fait de leur position stratégique autour des régions périventriculaires et périvasculaires, et de leurs capacités de phagocytose, les cellules de la microglie permettraient d'éliminer les substances étrangères qui pourraient pénétrer dans le cerveau par le LCR ou par diffusion à partir de la circulation sanguine. En réponse à une agression, l'activation de la microglie est la première des réactions cellulaires observée dans le SNC. La microglie activée exprime un répertoire particulier de canaux ioniques et de récepteurs qui pourrait être à l'origine de cette détection extrêmement sensible des altérations subtiles du microenvironnement, comme le déséquilibre de l'homéostasie ionique précédant des changements pathologiques qui ne sont pas encore détectables histologiquement.

Les cellules microgliales assurent également la sécrétion de molécules cytotoxiques, pro-apoptotiques comme des cytokines pro- ou anti-inflammatoires, des protéinases, des protéines du complément et des radicaux oxygénés. Enfin, une fois activées, ces cellules sont également capables de sécréter de nombreux facteurs neurotrophiques et de synthétiser de l'**ATP** (Adénosine Triphosphate), favorisant la survie neuronale lors d'une agression du SNC. Ces cellules jouent donc un rôle primordial dans la défense et la protection des cellules du SNC.

Par leurs capacités fonctionnelles, elles jouent ainsi deux grands rôles dans le SNC. En premier lieu, elles interviennent au cours du développement en éliminant de façon programmée par **apoptose** les cellules surnuméraires, permettant ainsi un bon déroulement de la neurogenèse, de la guidance axonale, de la synaptogenèse, de la vascularisation et de la myélinisation. Leur second rôle est celui de **cellules sentinelles** en cas d'agression du SNC, afin d'activer les processus de réparation et de neuroprotection de cet environnement. Mais il a été observé qu'au cours du vieillissement ou de processus neurodégénératifs, l'activation de la microglie pourrait devenir insuffisante et inadaptée, provoquant une activation excessive et chronique délétère *via* des processus destructeurs.

3. Les cellules astrocytaires

a. Origine embryonnaire des astrocytes

L'origine des astrocytes dans le cerveau au cours du développement n'est pas encore parfaitement identifiée. Deux voies sont proposées : la **glie radiaire** et les **progéniteurs de la zone sous-ventriculaire (ZSV)**.

Au cours du développement humain, la différenciation des astrocytes à partir de la glie radiaire se produit dans toutes les régions du SNC. Les cellules de la glie radiaire se différencient à partir de la ZSV en même temps que se produit la neurogenèse et les prolongements de ces cellules astrocytaires s'étendent des régions ventriculaires vers la pie-mère. Elles servent ainsi de substrat pour la migration des neurones. L'observation des changements successifs de la morphologie de la glie pendant les dernières étapes de l'histogenèse, ainsi que l'expression de différents antigènes de surface par les différentes classes d'astrocytes pendant la période périnatale, a permis d'établir que la glie radiaire se transforme principalement en astrocytes pendant le développement (Lazzarini, 2004). La glie radiaire résiduelle garderait alors un rôle de cellules souches capables de se différencier en neurones et en cellules gliales dans le SNC mature (Lazzarini, 2004). Chez l'adulte, on observe encore des astrocytes radiaires mais hautement spécialisés et dont la distribution est restreinte à quelques structures comme les cellules de Müller dans la rétine, les tanocytes épendymaires dans les régions qui bordent les ventricules et le long du canal de la moelle épinière, et enfin les astrocytes de type Golgi-Bergmann dans le cervelet (Tritsch et al., 1999).

Les astrocytes proviennent également directement des cellules souches de la ZSV qui se différencient en précurseurs gliaux. Les progéniteurs astrocytaires de la ZSV vont migrer de la ZSV vers la SB et la SG où ils vont se différencier en astrocytes et OLs. La migration des progéniteurs se ferait notamment grâce aux cellules de la glie radiaire. Lorsque ceux-ci entrent en contact avec les vaisseaux sanguins ou la pie-mère, ils cessent leur migration et commencent leur différenciation en astrocytes (Levison et Goldman, 1993).

Comme dans la plupart des cellules de l'organisme au cours de l'organogenèse, le nombre des astrocytes est régulé par un programme **de mort cellulaire programmée** (apoptose) qui aboutit à la disparition de la moitié de ces cellules gliales produites pendant la période embryonnaire. Plusieurs facteurs de croissance sont impliqués dans la survie et la différenciation des astrocytes, comme l'**EGF** (Epidermal Growth Factor), le **TGF- β** (Transforming Growth Factor- β), le **LIF**, le **CNTF** (Ciliary Neurotrophic Factor), les **BMP** (Bone Morphogenic Proteins), ainsi que des hormones, comme les **hormones thyroïdiennes**, l'**insuline** et l'**hydrocortisone** (Tritsch et al., 1999).

b. Morphologie et protéines spécifiques des astrocytes

Les astrocytes ont une forme étoilée, avec de nombreux prolongements qui se distribuent tout autour de la cellule (Figure 11). Les astrocytes sont les plus grosses cellules du tissu nerveux. On distingue les **astrocytes de type I**, qui sont en contact avec les capillaires sanguins, et les **astrocytes de type II**, qui entourent le neurone et la fente synaptique empêchant ainsi la dispersion des neurotransmetteurs.

Les astrocytes établissent de nombreux contacts *via* leurs prolongements cytoplasmiques terminés par des parties élargies ou « **pieds astrocytaires** », avec des somas neuronaux, des neurites, des synapses, des cellules endothéliales, des OLs, des nœuds de Ranvier et d'autres astrocytes (Tritsch et al., 1999). Par ses nombreuses interactions, l'astrocyte joue ce rôle central dans la **signalisation cérébrale**. L'importance de ces interactions dans les fonctions astrocytaires est détaillée dans le chapitre suivant.

L'astrocyte se caractérise par la présence de protéines spécifiques des différentes étapes du développement astrocytaire et de chaque sous-classe d'astrocytes. Dans l'astrocyte en développement, on trouve un filament intermédiaire, la **vimentine** (également trouvée dans d'autres précurseurs des cellules neurales), qui cède la place au cours de la maturation de la cellule à la protéine gliofibrillaire acide (Glial Fibrillary Acidic Protein, **GFAP**), le marqueur le plus utilisé de l'astrocyte. La GFAP joue un rôle important dans la forme de l'astrocyte et de ses prolongements, et dans sa résistance mécanique (Tritsch et al., 1999).

c. Fonctions des astrocytes

Les principales fonctions de l'astrocyte sont illustrées sur la Figure 12.

Les astrocytes, comme la plupart des cellules gliales, ont longtemps été considérés essentiellement comme jouant un rôle de support et d'entretien du tissu nerveux. Mais de plus en plus d'éléments plaident en faveur d'une implication beaucoup plus importante des astrocytes dans la **communication nerveuse**. Ces cellules hautement spécialisées vont notamment fournir le **glucose** nécessaire à l'activité nerveuse qu'ils captent des capillaires sanguins cérébraux *via* leurs pieds astrocytaires (Sébille et al., 2011).

Au cours de la neurogenèse, les astrocytes jouent un rôle important dans la formation des territoires dans le SNC par l'établissement de « **barrières astrocytaires** » entre différents territoires adjacents. Les astrocytes ont un rôle dans l'**établissement et le maintien de la barrière hémato-encéphalique** (BHE) et interviennent également dans l'établissement des **réseaux neuronaux**. Ils synthétisent des molécules qui inhibent ou stimulent la croissance des neurites, les guident vers leur cible où les arborisations neuritiques se développent et fasciculent. Les astrocytes s'organisent pour former de véritables « canaux cellulaires » en

amont des axones en développement, fournissant un support physique et trophique à la croissance axonale (Tritsch et al., 1999).

Les astrocytes sont couplés les uns aux autres par des **jonctions communicantes** (« gap-junctions »), majoritairement constituées de connexines (Cx), Cx30 et Cx43. Au niveau de ces jonctions communicantes, chacune des deux cellules jointes participe à la formation d'un héli-cannal constitué d'un hexamère de Cx assemblées autour d'un pore central. Ces jonctions communicantes, au travers desquelles peuvent circuler divers métabolites, facilitent la transmission électrique interneuronale (*pour revue*, Nag, 2011). C'est par ces jonctions que les astrocytes évacuent vers les capillaires le potassium (K^+) extracellulaire excédentaire généré par une intense activité neuronale, évitant ainsi que l'accumulation de K^+ extracellulaire n'empêche la génération des potentiels d'action (Sébille et al., 2011). Quatre canaux potassiques ont été identifiés jusqu'à présent à la surface des astrocytes corticaux, le plus représenté étant Kir4.1 (*pour revue*, Nag, 2011). De la même manière, les astrocytes possèdent un grand nombre de **canaux** sodiques, calciques et chlorures nécessaires à leur signalisation et aux communications intercellulaires. Bien qu'électriquement non excitables, les astrocytes communiquent grâce à leur **signalisation calcique**. L'élévation du calcium (Ca^{2+}) à l'intérieur de l'astrocyte peut survenir soit spontanément en l'absence d'activité neuronale, soit par l'intermédiaire de neurotransmetteurs sécrétés durant l'activité synaptique. Les astrocytes possèdent en effet de nombreux récepteurs aux neurotransmetteurs, notamment de type métabotrope qui vont stimuler la PLC (Phospholipase C) et la formation d' IP_3 (Inositol Triphosphate) aboutissant à l'augmentation de la concentration de Ca^{2+} intracellulaire à partir des stocks intra-astrocytaires (*pour revue*, Perea et al., 2009). Cette signalisation calcique se propage entre astrocytes voisins *via* les jonctions communicantes. Ce réseau d'astrocytes communiquant forme un véritable **syncytium**, c'est à-dire qu'ils se comportent comme un seul et même élément. À travers ce réseau, se propage des vagues d'ions calcium dont l'effet régulateur pourrait se faire sentir dans un grand nombre de synapses en même temps. Les prolongements astrocytaires qui entourent les synapses pourraient ainsi exercer un contrôle plus global sur la concentration ionique et le volume aqueux dans les fentes synaptiques. Le réseau astrocytaire constituerait donc un système de transmission non synaptique qui se superposerait au système neuronal pour jouer un rôle majeur de modulation des activités neuronales.

Les astrocytes présentent également au sein de leur membrane un grand nombre de **transporteurs** spécifiques (pompes ou échangeurs ioniques actifs), dont la diversité est égale à celle retrouvée dans les neurones, et dont certains sont spécifiques de la glie. Ces molécules

jouent un rôle important dans les fonctions homéostatiques des astrocytes (Tritsch et al., 1999).

Enfin, l'une des principales fonctions des astrocytes est la **recapture de neurotransmetteurs** tels que le **glutamate** pour qu'il soit transformé en glutamine. Ils peuvent également sécréter des agents neuroactifs comprenant des stéroïdes, des neuropeptides, ou encore des facteurs de croissance (*pour revue*, Nag, 2011).

d. Gliose réactionnelle

Les astrocytes répondent à une lésion ou une agression du tissu cérébral par une série de transformations phénotypiques désignées sous le nom d'**astrocytose** ou gliose réactionnelle. Celle-ci se caractérise par une augmentation du nombre et de la taille des cellules synthétisant la GFAP ainsi que d'autres protéines normalement absentes ou exprimées faiblement par l'astrocyte non réactif (molécules d'adhésion, protéines du cytosquelette, enzymes du métabolisme oxydatif, cytokines et facteurs de croissance). Les astrocytes réactifs, avec la microglie, **inhibent la croissance axonale** et la **remyélinisation** par la synthèse de facteurs inhibiteurs (Tritsch et al., 1999).

La vision de l'astrocyte comme une simple cellule de support du système nerveux a donc bien évolué ces dernières années. Cette cellule est maintenant reconnue comme un partenaire essentiel aux neurones dans le contrôle des fonctions cérébrales.

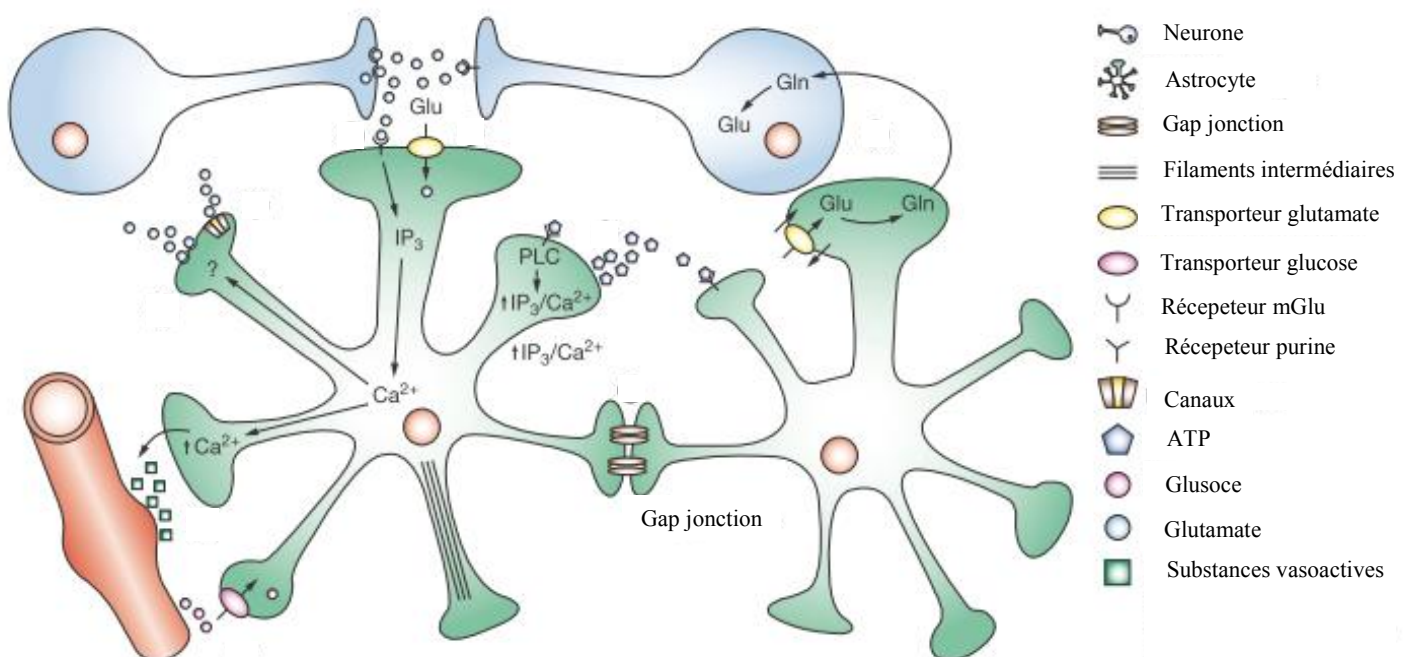


Figure 12 : Schéma des principales fonctions astrocytaires. Gln : glutamine, Glu : glutamate, IP₃ : Inositol Triphosphate, PLC : Phospholipase C. D'après Maragakis et Rothstein, 2006.

4. Les cellules oligodendrocytaires

a. Origine embryonnaire des oligodendrocytes

La spécification embryonnaire de la lignée oligodendrogliale partage des caractéristiques communes avec les **neurones moteurs du tube neural ventral**. Les cellules précurseurs d'OLs (OPC) sont issues du même domaine ventral au niveau du tube neural embryonnaire, appelé pMN. L'action du facteur Sonic hedgehog (**Shh**), *via* l'activation du facteur de transcription **OLIG2** est essentielle pour le développement des neurones moteurs et des OLs. A l'inverse, l'expression dorsale de **BMP** et l'activation de la voie **Wnt** antagonise le développement des OLs et favorise celui des astrocytes (*pour revue*, Fancy et al., 2011, Figure 13).

OLIG2 est initialement exprimé dans les progéniteurs oligodendrocytaires ventraux et est inversement réprimé dans les neurones et les astrocytes (Zhou et al., 2001). La différenciation oligodendrocytaire est en effet réduite et retardée chez les souris n'exprimant plus ce facteur de transcription (Zhou et Anderson, 2002). Par ailleurs, les progéniteurs exprimant OLIG2 sont capables de myéliniser des axones en culture et *in vivo* dans la moelle épinière endommagée (Brüstle et al., 1999; Liu et al., 2000).

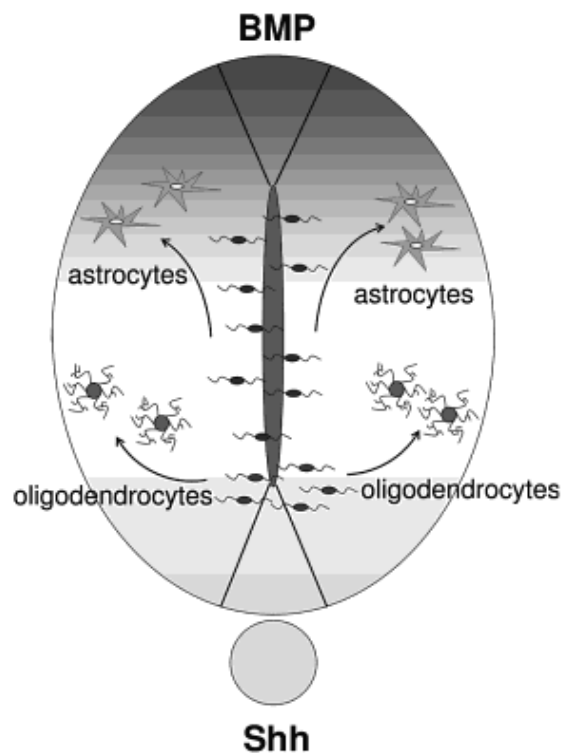


Figure 13 : Origine des astrocytes et des oligodendrocytes dans la moelle épinière. Dans la moelle épinière en développement, les oligodendrocytes sont issus des régions ventrales de la zone ventriculaire exprimant Shh (Sonic hedgehog), alors que les astrocytes proviennent des régions dorsales exprimant BMP (Bone Morphogenic Protein) (Armati et Mathey, 2010).

b. Migration et différenciation des oligodendrocytes

Les OPC dérivés du domaine pMN se divisent, migrent et se différencient pendant les périodes pré et post-natales du développement chez l'homme. Ces événements sont associés à une évolution de la morphologie et de l'expression de marqueurs spécifiques qui permettent de distinguer plusieurs stades phénotypiques (Figure 14). Au cours de la différenciation du lignage oligodendrocytaire, la cellule précurseur devient successivement **progénitrice**, **pré-OL**, puis cellule post-mitotique ou encore **OL immature**. Vient ensuite la période de maturation avec apparition de l'**OL mature non myélinisant** et enfin l'**OL myélinisant**. Chacune de ces étapes se caractérise par une augmentation de la complexité de la morphologie, une perte ou une acquisition de marqueurs spécifiques, une perte des capacités de migration, un ralentissement puis l'arrêt de la prolifération et enfin l'aboutissement au phénotype mature, l'**OL myélinisant**. Des facteurs extrinsèques d'origine neuronale et astrocytaire agissent de façon concertée: le **PDGF** (Platelet-Derived Growth Factor) induit la migration des précurseurs, le **TGF- β** régulerait négativement la prolifération des précurseurs et induirait ainsi leur différenciation, et les **hormones thyroïdiennes** permettraient également la différenciation des OLs. Les protéines de la matrice extracellulaire (MEC) joueraient également un rôle dans leur **différenciation** et dans le déclenchement de la **myélinisation** (Tritsch et al., 1999). Lors du processus normal de myélinisation, une **mort cellulaire programmée des OLs par apoptose** a été démontrée. Ainsi, dans le nerf optique du rat, 50% des OLs meurent, et 20% dans le cortex cérébral en développement. Cette mort programmée intéresse en grande majorité des OLs à un stade pré-myélinisant (80%) et à un moindre degré les précurseurs (20%). La compétition pour l'accès à des facteurs de croissance, disponibles en quantité limitée, serait responsable de ce phénomène (*pour revue*, Miller, 2002).

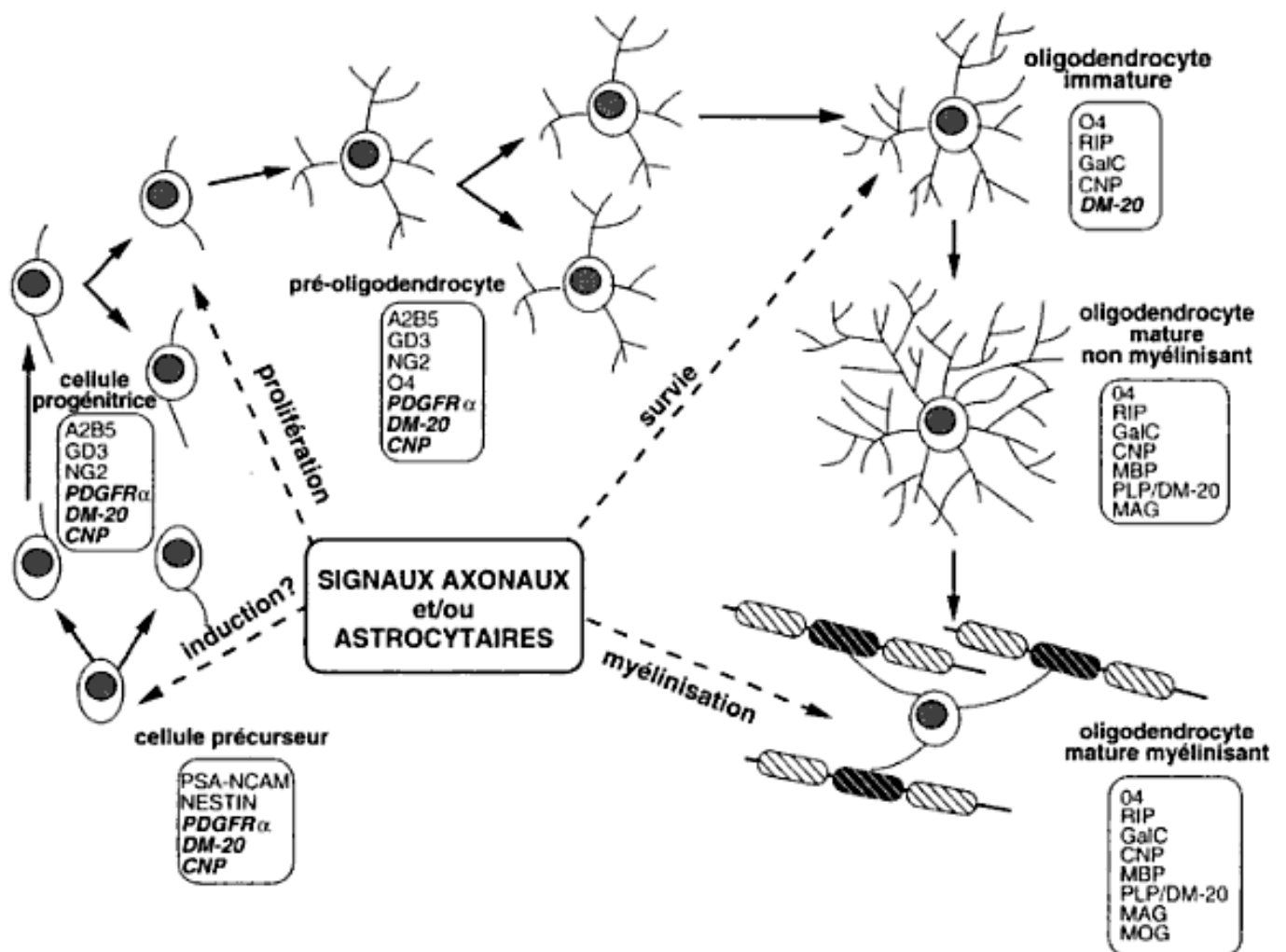


Figure 14 : Représentation schématique du lignage oligodendrocytaire, montrant les sites d'action des signaux neuronaux ou astrocytaires. GD3 et A2B5 sont des gangliosides ; GalC : galactocérobroside ; O4 est un sulfatide ; PDGFR α : récepteur α du Platelet-Derived Growth Factor ; CNP : 2',3'-Cyclic Nucleotide 3'-Phosphodiésterase ; PLP et DM20 : protéolipides majeurs de la myéline ; MBP : Myelin Basic Protein ; MAG : Myelin Associated Glycoprotein ; MOG : Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein ; (Tritsch et al., 1999).

c. Fonctions des oligodendrocytes

Les OLs sont des cellules gliales hautement spécialisées formant la **gaine de myéline** qui entoure les axones des neurones du SNC. La myélinisation résulte d'une interaction entre cellules dans laquelle les protéines de surface des OLs produisent un **prolongement en feuillet** qui s'enroule de façon répétée autour de l'axone avec lequel ils sont en contact. Le cytoplasme est chassé du prolongement glial au fur et à mesure que celui-ci s'enroule autour de l'axone et l'isole des liquides extracellulaires, grâce aux multiples couches de myéline.

La gaine de myéline qui entoure un seul axone provient d'un grand nombre d'OLs. Chaque axone myélinisé est engainé par une succession de segments de myéline, ou **internœuds**, séparés les uns des autres par de courts intervalles appelés **nœuds de Ranvier** (Figure 15). Les segments de myéline isolent l'axone des ions du liquide extracellulaire ; ainsi, les nœuds de Ranvier sont les seules parties de l'axolemme capables de conduire les courants ioniques d'un potentiel d'action. A cause de cette disposition de la myéline, les potentiels d'action sont obligés de « sauter » d'un nœud de Ranvier à l'autre. Ce processus, appelé **conduction saltatoire**, produit des vitesses de conduction bien plus rapides que celles des axones amyélinisés (Pritchard et Alloway, 2002).

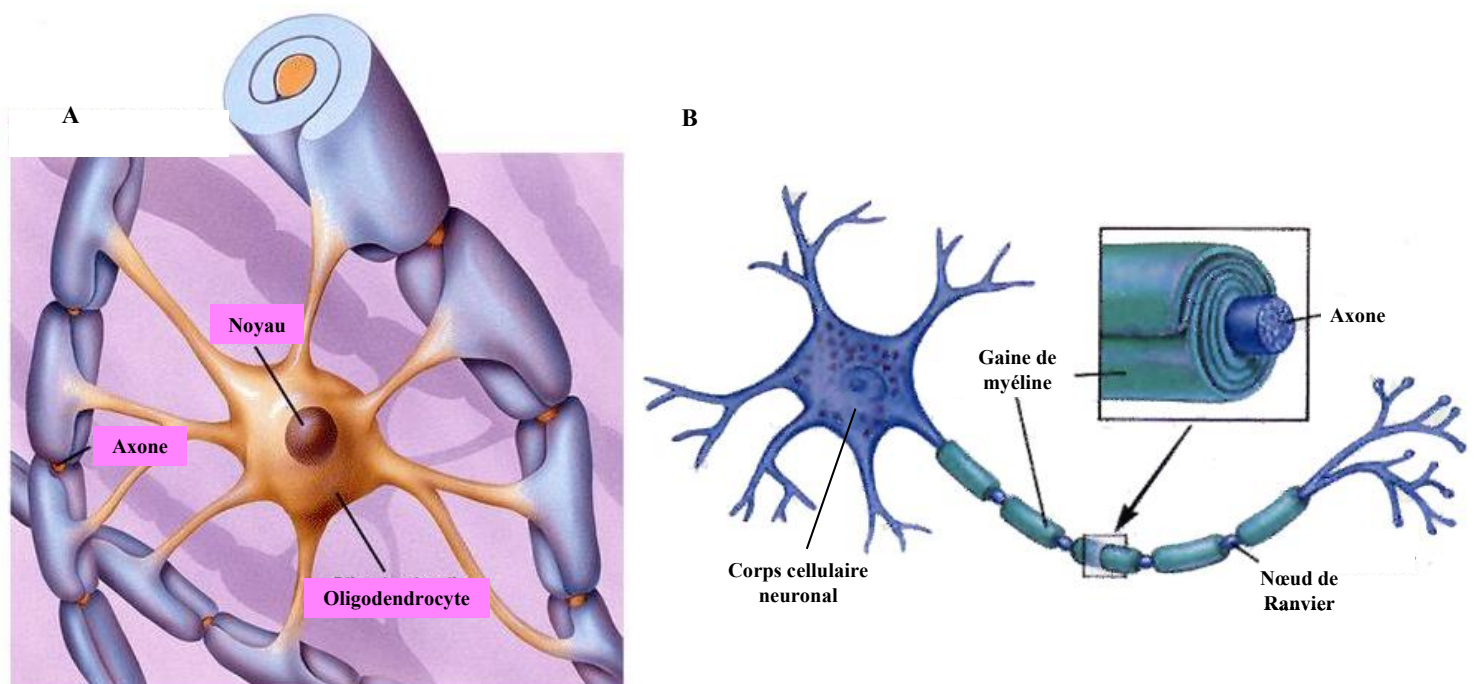


Figure 15 : Oligodendrocyte et myéline. A. Les prolongements des oligodendrocytes s'enroulent et se compactent autour de l'axone à myéliniser. (http://www.apf-moteurline.org/aspectsmedicaux/dmsh/causes_defmot/lesionscerebrales/SEP_GC_TM_178-185.pdf) B. Chaque segment de myéline est séparé par des nœuds de Ranvier permettant une conduction saltatoire, plus rapide, de l'influx nerveux, d'un nœud de Ranvier à l'autre (<http://www.homepages.hetnet.nl/~b1beukema/leukodystrofie.html>).

D. La myéline

Parmi les processus majeurs du développement du SNC, la myélinisation est un phénomène relativement tardif puisqu'elle intervient après la croissance axonale et parachève la mise en place des structures déjà fonctionnelles. Elle consiste en l'enroulement spiralé des prolongements membranaires des OLs autour d'un segment axonal, puis en l'extrusion du cytoplasme, suivi de la compaction des membranes accolées. La myélinisation ne débute qu'une fois les axones parvenus à leurs cellules cibles. Chez l'homme, la myélinisation débute au cours du troisième trimestre de la vie intra-utérine et reste très active jusqu'à l'âge de 2 ans pour se poursuivre jusqu'à la puberté dans le SNC. A la naissance, le SNC renferme encore de nombreux faisceaux nerveux immatures ou même complètement dépourvus de myéline. La lenteur de ce processus et la corrélation entre la myélinisation et le niveau final de la capacité fonctionnelle expliquent la durée particulièrement longue et complexe du développement psychomoteur chez l'enfant. Dans le SNC, la myélinisation est un processus **asynchrone** se produisant selon un gradient rostro-caudal dans la moelle épinière et caudo-rostral dans le cerveau, les racines motrices étant myélinisées avant les sensitives, et les faisceaux postérieurs ascendants avant les antérieurs descendants.

1. Structure de la myéline du système nerveux central

La gaine de myéline apparaît comme une spirale parfaite composée de plusieurs dizaines d'enroulements de membrane dont l'espacement est rigoureusement identique. Cette structure répétitive est formée par l'alternance de « **doubles lignes intrapériodiques** » correspondant à l'accolement des faces extracellulaires de la membrane plasmique de deux couches adjacentes et de « **lignes denses majeures** » correspondant à l'apposition des faces internes cytoplasmiques de l'extension de la membrane plasmique de la cellule myélinisante (Figure 16A). La compaction au niveau de la ligne dense majeure est achevée par l'extrusion du cytoplasme hors des enroulements de membrane, pendant la dernière étape de la myélinisation (Stevens et Lowe, 1997; Tritsch et al., 1999). Chaque segment d'axone n'est pas entièrement recouvert de myéline. Les zones de myéline compacte appelées internœuds sont séparées par des régions dépourvues de myéline que sont les nœuds de Ranvier. A chaque extrémité des internœuds, se trouve une région paranodale, ou paranœud, contenant du cytoplasme où la myéline n'est pas compactée (*pour revue*, Hudson, 2001; Baumann et Pham-Dinh, 2001) (Figure 17).

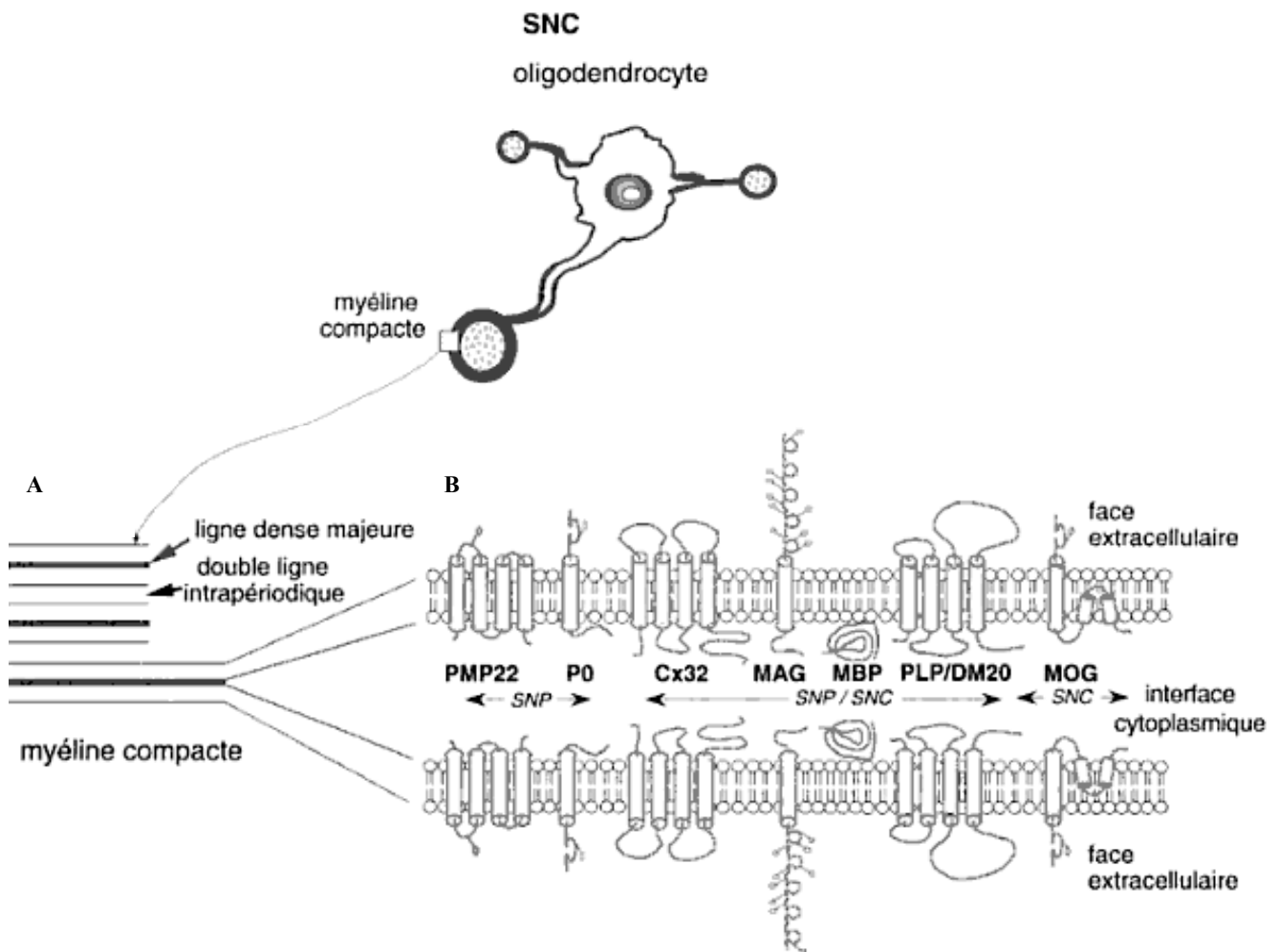


Figure 16 : Structure et composition de la myéline. **A.** La myéline, formée par les enroulements de la membrane de l'oligodendrocyte, apparaît comme une structure répétitive, constituée par l'alternance de « lignes denses majeures » correspondant à l'apposition, du côté cytoplasmique, des faces internes de la membrane plasmique, et de « doubles lignes intrapériodiques » correspondant à l'adhérence des faces externes de la membrane de deux couches adjacentes. **B.** Représentation des principales protéines de la myéline. PMP22 : Peripheral Myelin Protein 22 ; Cx32 : Connexine 32 ; MAG : Myelin Associated Glycoprotein ; MBP : Myelin Basic Protein ; PLP et DM20 : protéolipides majeurs de la myéline ; MOG : Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein ; SNC : Système Nerveux Central ; SNP : Système Nerveux Périphérique. D'après Tritsch et al., 1999.

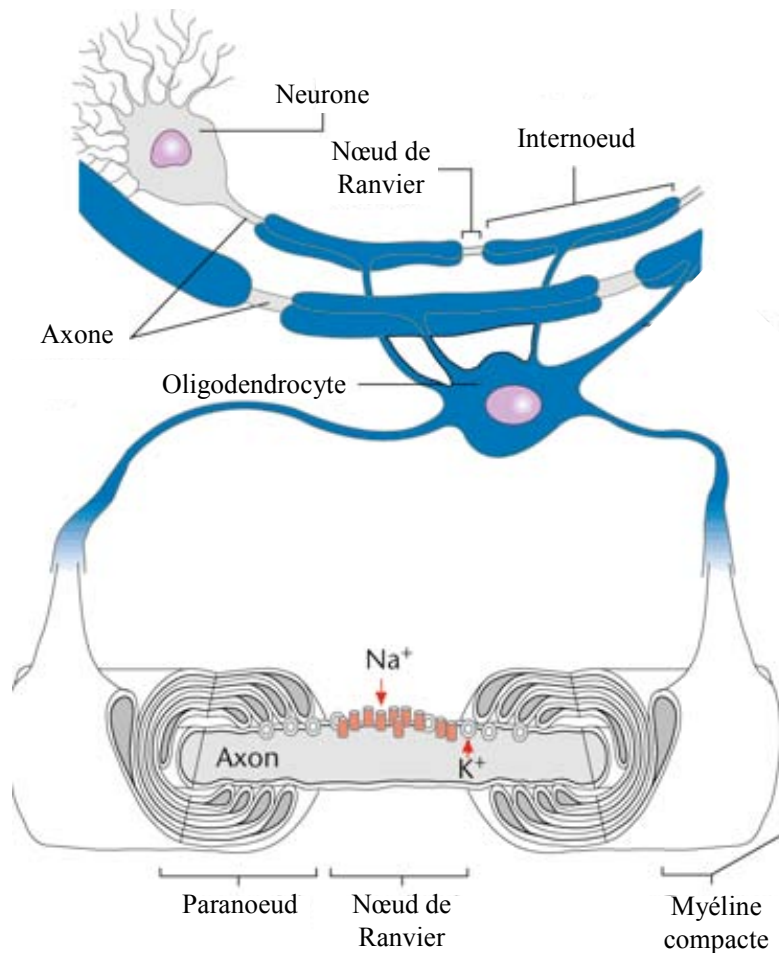


Figure 17 : Schéma d'axones myélinisés. D'après Hudson, 2001.

2. Composition de la myéline du système nerveux central

La myéline est une structure **faiblement hydratée** contenant 40% d'eau, contrairement à la SG qui en contient jusqu'à 80%. La myéline est constituée de 70% de **lipides** et de 30% de **protéines** en poids sec. Ce ratio lipides/protéines est très spécifique de cette structure car il est généralement inversé dans les autres membranes cellulaires. Les propriétés isolantes de la gaine de myéline, qui favorisent la conduction rapide de l'influx nerveux, sont largement dues à cette structure, à sa finesse, sa faible concentration en eau et à sa richesse en lipides (*pour revue*, Baumann et Pham-Dinh, 2001; Lüllmann-Rauch, 2008).

a. Composition lipidique de la myéline

Les lipides de la myéline comprennent environ 30% de **glycolipides**, en particulier le galactocérobroside (**GalC**) représentant à lui seul 20% du poids sec ainsi que son dérivé

sulfaté, le **sulfatide**. On trouve également environ 25% de **cholestérol** et 40% de **phospholipides**. Les lipides présentent une **distribution asymétrique**, certaines molécules étant uniquement présentes sur la monocouche externe de la double couche lipidique (glycolipides, cholestérol, phosphatidylcholine) et d'autres uniquement sur la couche cytoplasmique (phosphatidylsérine). Cette asymétrie confère une différence de charge entre les monocouches nécessaire à l'enchâssement correct de nombreuses protéines myéliniques, permettant ainsi la formation et le maintien de l'architecture de la myéline (*pour revue*, Tritsch et al., 1999; Baumann et Pham-Dinh, 2001).

b. Composition protéique de la myéline

L'étude de fractions myéliniques de souris ou d'homme par de nouvelles techniques d'analyse protéomique a récemment remis en cause les fractions quantitatives habituellement décrites de protéines myéliniques et a permis de mettre en évidence de nouvelles protéines jusqu'à présent non détectables (*pour revue*, Jahn et al., 2009) (Figure 18).

Deux familles de protéines forment les constituants majeurs de la myéline. Il s'agit de la famille des protéolipides protéines (**PLP** et **DM20**, issues d'un épissage alternatif du gène *PLP1*) et des protéines basiques (**MBP**, Myelin Basic Proteins) (Figure 18, Tableau 1).

Le gène codant la protéine PLP est localisé sur le chromosome X et il est épissé alternativement au cours du développement pour que s'exprime DM20 puis PLP. Ces deux protéines sont constituées de quatre domaines transmembranaires comprenant une boucle intracellulaire et deux boucles extracellulaires (Figure 16B). La protéine PLP est composée de 276 acides aminés et DM20 diffère de PLP par la délétion d'un segment de 35 acides aminés au niveau de la boucle intracellulaire. PLP joue un rôle majeur dans l'apposition correcte des faces extracellulaires de la membrane plasmique (double ligne intrapériodique, Figure 19), stabilisant ainsi la structure de la myéline nécessaire à la compaction. La régulation de l'épissage alternatif de *PLP1* et le maintien d'un ratio PLP/DM20 correct sont indispensables pour la différenciation des OLs et le maintien de la myéline. Dans les OLs matures et dans la myéline, l'isoforme PLP est préférentiellement synthétisée, alors que dans les progéniteurs oligodendrocytaires, l'épissage a lieu en faveur de l'isoforme DM20 (Campagnoni, 1988). Dans les OLs différenciés et dans le cerveau post-natal, le ratio *PLP/DM20* en transcrits est de 3:1. PLP est synthétisé dans le RE, transporté à l'appareil de Golgi via des vésicules et enfin adressé à la gaine de myéline (*pour revue*, Baron et Hoekstra, 2010).

Le gène *MBP* code deux familles de protéines, les MBP classiques et les Golli-MBP résultant également d'épissages alternatifs. La protéine MBP est localisée à la surface de la membrane cytosolique (Figure 16B, 19) et, comme PLP, est impliquée dans la compaction de

la myéline (*pour revue*, Baumann et Pham-Dinh, 2001; Baron et Hoekstra, 2010). Le transcrite *MBP* est transporté dans des granules, assemblées au niveau du noyau, le long des extensions cytoplasmiques des OLs où, en réponse à un stimulus, il sera traduit (*pour revue*, Simons et Trotter, 2007; Bradl et Lassmann, 2010). Ce mécanisme est très régulé. La région 3'UTR de l'ARN messager *MBP* contient un élément de réponse à la protéine **hnRNPA2** (heterogeneous nuclear Ribonucleoprotein A2, A2RE), qui reconnaît donc le messenger *MBP*. Ce complexe est alors exporté vers le cytoplasme où les granules se forment et sont transportés grâce aux microtubules le long des prolongements oligodendrocytaires. hnRNPA2 liée au transcrite *MBP* va alors réprimer sa traduction (*pour revue*, Jahn et al., 2009; Baron et Hoekstra, 2010).

Un grand nombre d'autres protéines, minoritaires, complètent et rendent compte de la spécificité de la myéline parmi lesquelles la **CNPase** (2'3' Cyclic Nucleotide 3' Phosphodiesterase), la **MAG** (Myelin-Associated Glycoprotein), la **MOG** (Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein), la **MOBP** (Myelin Oligodendrocyte Basic Protein), l'**OSP** (Oligodendrocyte-Specific Protein), la glycoprotéine **OMGP** (Oligodendrocyte Myelin Glycoprotein) et des connexines comme les **Cx32** et **Cx47** (Figure 16B, 18, Tableau 1).

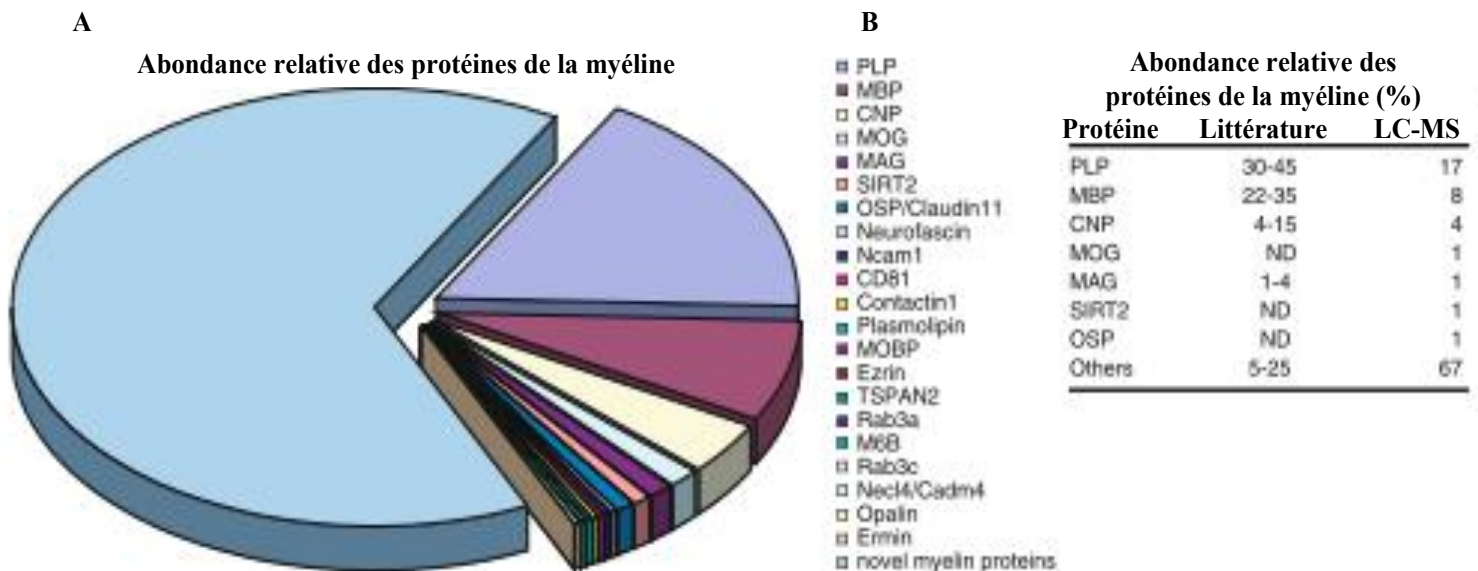


Figure 18 : Abondance relative des principales protéines de la myéline du système nerveux central. **A.** Les principales protéines connues de la myéline du SNC sont représentées en fonction de leur abondance relative. **B.** Expression en pourcentage de l'abondance relative des principales protéines de la myéline. Les valeurs usuelles de la littérature sont comparées aux valeurs récemment obtenues par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS). D'après Jahn et al., 2009.

<i>Protéine</i>	<i>Localisation</i>	<i>Nombre de transcrits</i>	<i>Apparition</i>	<i>Modifications post-traductionnelles</i>	<i>Rôles suggérés</i>
PLP	Membrane	2 (PLP et DM20)	DM20 avant la maturation des OLs, PLP après MBP dans les OLs matures	Acylation	Compaction myéline, communication axone-glie, maturation/migration/survie des OLs
MBP	Cytoplasme	4	Précocement au cours de la myélinisation	Phosphorylation, Méthylation, Citrullination	Structure et compaction myéline
OSP	Membrane (protéine de jonctions serrées)	1	Stades tardifs de la myélinisation	-	Maintien compaction myéline
CNPase	Cytoplasme	2	Avant MBP et PLP	Phosphorylation	Régulateur précoce de la myélinisation
MAG	Membrane	2 (MAG-S et MAG-L)	Avant MBP stades les plus précoces de la myélinisation	Glycosylation, Acylation, Phosphorylation	Compaction/maintenance myéline
MOG	Membrane	>15	Stades tardifs de la myélinisation	Glycosylation	Elaboration finale myéline, intégrité
MOBP	Membrane	1	-	-	Compaction myéline
OMGP	Membrane	2	-	Glycosylation	Inhibition de la croissance neuritique
Cx29	Membrane	1	Stades tardifs de la myélinisation	-	
Cx32	Membrane	1	Stades tardifs de la myélinisation	Phosphorylation	Formation des jonctions communicantes entre les feuilletts myéliniques et entre OLs et astrocytes
Cx47	Membrane	1	Stades tardifs de la myélinisation	-	Formation des jonctions gap OLs et astrocytes

Tableau 1 : Description des principales protéines de la myéline du système nerveux central. PLP : Proteo-Lipid Protein, MBP : Myelin Basic Protein, OSP : Oligodendrocyte-Specific Protein, CNPase : 2'3'-Cyclic Nucleotide 3'-Phosphodiesterase, MAG : Myelin-Associated Glycoprotein, MOG : Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein, MOBP : Myelin Oligodendrocyte Basic Protein, OMGP : Oligodendrocyte Myelin Glycoprotein, Cx : Connexine, OLs : Oligodendrocytes. D'après Tritsch et al., 1999; Bradl et Lassmann, 2010.

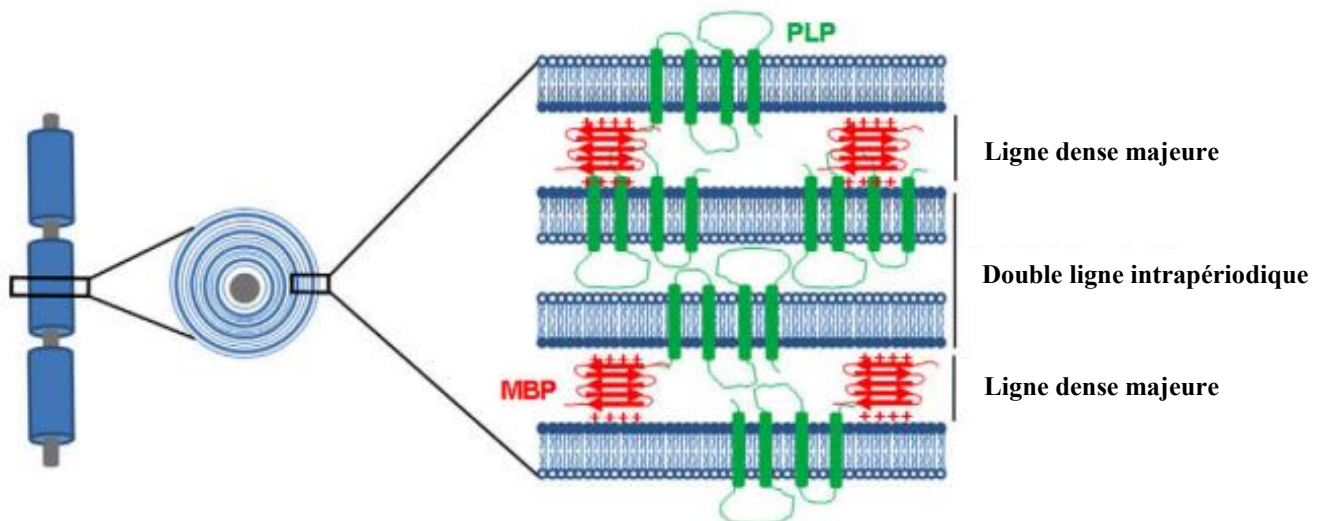


Figure 19 : Illustration schématique de la structure de la gaine de myéline. La myéline compacte est formée de l'apposition des faces externes de deux membranes adjacentes par le biais de la protéine PLP (Protéo-Lipid Protein, formant la double ligne intrapériodique), qui facilite ensuite l'accolement des faces internes et l'extrusion du cytoplasme par le biais de la protéine MBP (Myelin Basic Protein, formant la ligne dense majeure). D'après Baron et Hoekstra, 2010.

3. Rôles de la myéline

La gaine de myéline possédant une **résistance électrique élevée**, la propagation de l'influx nerveux va être saltatoire et rapide, le potentiel d'action se formant de nœud de Ranvier en nœud de Ranvier, structure particulièrement riche en canaux sodiques. En effet, celle-ci présente une quantité de canaux sodiques 25 fois supérieure à celle des régions internodales et à l'inverse aucuns canaux potassiques, retrouvés eux à proximité des nœuds de Ranvier au niveau des **paranoëuds**.

La présence de la myéline permet donc d'augmenter la **rapidité de la transmission nerveuse**, mais également sa fidélité avec une **économie d'énergie et de volume**. En effet, pour atteindre la même vitesse de conduction, un axone non myélinisé devrait être 100 fois plus gros qu'un axone myélinisé (Tritsch et al., 1999).

En dehors de ces fonctions d'isolant électrique, la myéline possède également des **fonctions métaboliques et trophiques**. Un nombre important d'enzymes intervenant dans la synthèse, la maturation et le renouvellement de certains constituants de la myéline a été décrit. Par ailleurs, la myéline est capable d'influencer la croissance et la maintenance axonale grâce à des protéines considérées jusqu'alors comme strictement structurales (*pour revue*, Baumann et Pham-Dinh, 2001).

E. Interactions cellulaires

1. Interactions axone/oligodendrocyte

La communication réciproque entre l'axone et l'OL est importante dès la période développementale précoce. Au cours de la formation du SNC, les neurones interviendraient dans la **régulation du nombre et dans la différenciation des OPC** pour assurer une régulation spatio-temporelle de la myélinisation. L'axone interagirait précocement à proximité puis en contact avec les OLs myélinisants en sécrétant des facteurs comme le **FGF2**, **Jagged 1**, le **CNTF**, la **NT3** (Neurotrophine 3), le **PDGF** ou l'**IGF1** (Insulin-like Growth Factor 1) (Figure 20). De plus, l'axone exprime à l'axolemmme des signaux attractifs comme **L1-CAM** (L1-Cell Adhesion Molecule,) ou répulsifs comme **PSA-CAM** (Polysialylated neural-Cell Adhesion Molecule), ou **LINGO-1** (Nogo receptor-interacting protein,) pour les OLs, certains interagissant avec des molécules de la MEC comme la **laminine-2** (*pour revue*, Simons et Trajkovic, 2006).

Il a été montré que les récepteurs **Notch1** étaient présents à la surface des OLs et de leurs précurseurs et que **Jagged 1**, ligand du récepteur Notch1, étaient exprimés le long des axones. L'expression de Jagged 1 diminue au cours du développement, parallèlement à la myélinisation, suggérant que Jagged 1 inhibe la différenciation oligodendrocytaire *via* Notch1 (Wang et al., 1998) (Figure 20).

De la même manière, la myélinisation dépend également de la molécule neuronale **NRG1** (Neuréguline 1) qui interagit avec le récepteur oligodendrocytaire **ErbB** (*pour revue*, Bradl et Lassmann, 2010) (Figure 20).

De plus, la **prolifération des OPC** dépend de l'**activité électrique** des axones voisins. La suppression de l'activité électrique par la tétradotoxine (bloqueur des canaux sodiques) inhibe la myélinisation. De la même manière, si les cellules neuronales sont maintenues dans un état dépolarisé, la myélinisation ne s'initie pas (*pour revue*, Barres et Raff, 1993). En effet, la survenue d'un potentiel d'action conduit à la sécrétion d'**ATP** et d'**adénosine** par le neurone, à l'origine d'une communication neuro-gliale. L'adénosine va inhiber la prolifération des OPC et stimuler leur différenciation et donc la myélinisation. L'ATP sécrété va lui induire la libération de **LIF** par l'astrocyte qui va à son tour aller stimuler la myélinisation. L'activité électrique va également diminuer le niveau d'expression de la molécule **NCAM**, permettant ainsi la myélinisation (*pour revue*, Bradl et Lassmann, 2010) (Figure 20).

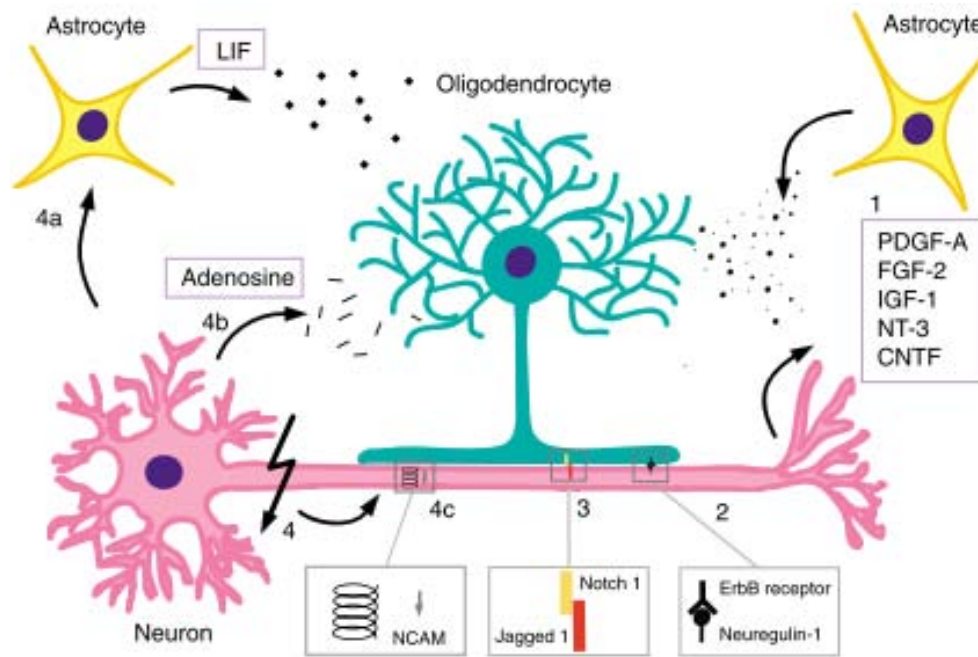


Figure 20 : Signaux neuronaux intervenant dans la myélinisation. (1) Les astrocytes et / ou les neurones sécrètent divers facteurs de croissance et trophiques qui régulent la prolifération et / ou la survie des oligodendrocytes (OLs). (2) La neuréguline 1 se lie à son récepteur oligodendrocytaire ErbB pour permettre la survie et la maturation des OLs. (3) L'interaction du récepteur Notch1 oligodendrocytaire avec la molécule axonale Jagged1 inhibe la différenciation des OLs. (4) L'activité électrique neuronale entraîne la sécrétion de facteurs promyélinisants tels que le LIF par les astrocytes, l'adénosine par les neurones et modifie le niveau d'expression de la molécule axonale NCAM (Simons et Trajkovic, 2006).

D'autre part, dans les OLs cultivés en l'absence de neurones, PLP est majoritairement localisé en intracellulaire et co-localise peu avec MBP ou GalC, il est immédiatement internalisé par endocytose. A l'inverse, en co-culture avec des neurones, ces protéines sont co-localisées et PLP est transporté dans des endosomes à la membrane plasmique (Trajkovic et al., 2006).

Chez les souris invalidées pour le gène *Mag*, les axones peuvent être myélinisés plusieurs fois, indiquant que la protéine MAG doit être impliquée dans la reconnaissance des axones déjà myélinisés (Li et al., 1998).

Enfin, il a été décrit l'interaction entre les axones et les OLs pour permettre la **traduction de MBP**. Les transcrits *MBP* sont transportés dans des granules ARN le long des prolongements oligodendrocytaires pour y être traduits et la liaison de hnRNPA2 en 3' UTR du transcrit *MBP* réprime cette traduction. Suite à la liaison de la molécule neuronale L1-CAM à son récepteur F3 à la surface oligodendrocytaire, la kynase Fyn va être activée et va

phosphoryler la protéine hnRNPA2, stimulant ainsi la traduction de *MBP* (White et al., 2008) (Figure 21).

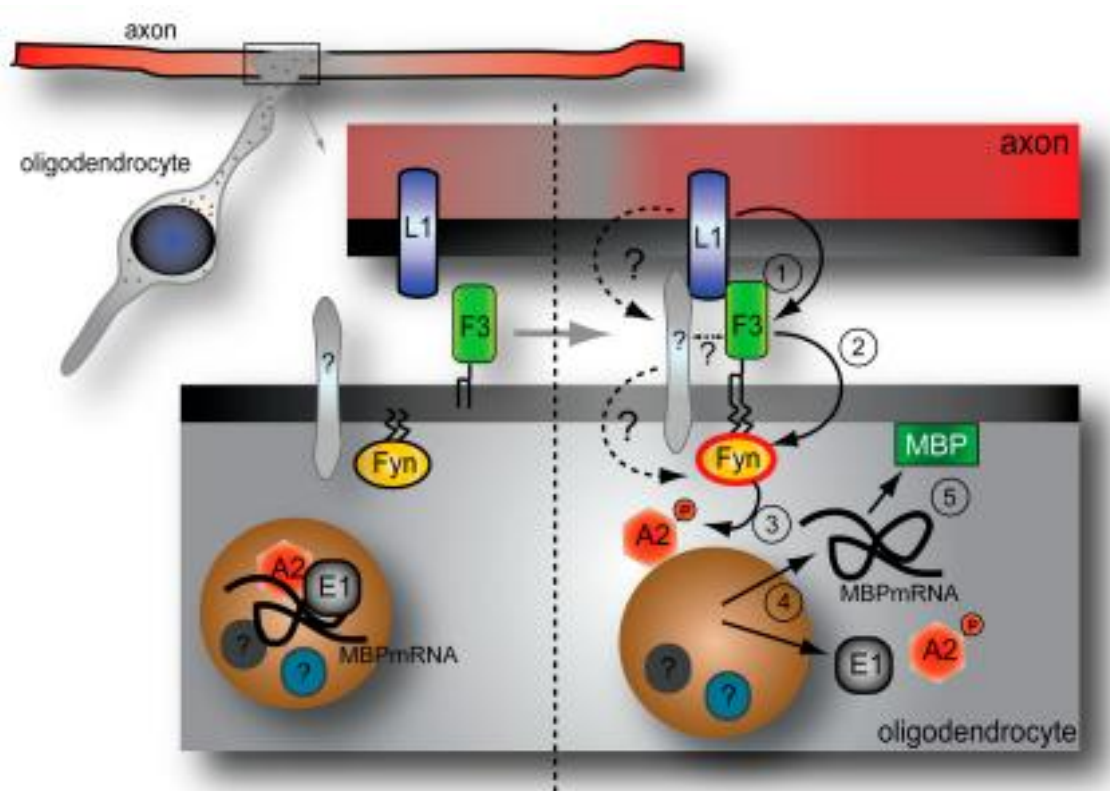


Figure 21 : La traduction de MBP dépend de l'interaction entre les axones et les oligodendrocytes (OLs). Durant les contacts axone/OL, la molécule neuronale L1-CAM se lie à son récepteur oligodendroglial F3 (1), conduisant à l'activation de la kynase Fyn (2) qui va phosphoryler hnRNPA2 (3). Ceci aboutit au relargage de hnRNPA2 et E1 des granules ARN contenant les transcrits *MBP*, libérant ainsi ces transcrits au niveau des sites de contact axone/glie (4) et permettant la synthèse localisée de la protéine MBP (5) nécessaire à la formation de la gaine de myéline (White et al., 2008).

2. Interactions astrocyte/oligodendrocyte

Les interactions entre les OLs et les astrocytes permettent la mise en place d'un maillage, à travers lequel courent les réseaux neuronaux. Les astrocytes sécrèteraient des facteurs de croissance (**PDGF, LIF, FGF2, IGF1, NT3**) nécessaires au développement, à la différenciation et à la survie des OLs ainsi qu'à la myélinisation (Tritsch et al., 1999) (Figure 14). Les jonctions communicantes constituées de Cx exprimées par les astrocytes (Cx30, Cx43) et les OLs (Cx29, Cx32, Cx47) permettent la formation d'un **syncytium glial**, ayant un rôle dans la formation et le maintien de la myéline. En effet, des mutations dans les gènes **GJC2** (*Gap Junction Gamma 2*, Cx47) et **GJB1** (*Gap Junction Beta 1*, Cx32) sont respectivement responsables, chez l'Homme, d'une pathologie hypomyélinisante du SNC (**Pelizaeus-Merzbacher-Like Disease, PMLD ou HLD1**) et du SNP (neuropathie sensitivomotrice de **Charcot-Marie-Tooth liée à l'X, CMTX**) (*pour revue*, Kohlschütter et al., 2010).

La présence des astrocytes *in vitro* est nécessaire à l'adhésion des OLs aux neurones (Meyer-Franke et al., 1999). D'autre part, l'expression d'Olig2 réprime celle de GFAP (filament intermédiaire astrocytaire) et inhibe la formation du complexe STAT3/p300, nécessaire à la maturation astrocytaire (Fukuda et al., 2004). De plus, les souris **invalidées pour le gène *Gfap*** présentent une **myélinisation anormale** avec une architecture et une vascularisation désorganisée de la SB ainsi qu'une hydrocéphalie associée à une perte de cette SB (Liedtke et al., 1996). Enfin, après lésion de la moelle épinière, les OLs sont capables de re-myéliniser la zone lésée, mais ceci est impossible en l'absence d'astrocytes, suggérant un rôle majeur de ceux-ci dans la maturation oligodendrocytaire (Talbot et al., 2005).

3. Interactions neurone/astrocyte

Les astrocytes interagissent avec les neurones, notamment au niveau synaptique puisque les prolongements astrocytaires forment avec les terminaisons des neurones pré- et post-synaptiques ce que l'on appelle la **synapse tripartite** (Figure 22). Comme cité précédemment, les astrocytes synthétisent des molécules qui vont inhiber ou stimuler la **croissance des neurites** et les guider vers leur cible où les arborisations neuritiques se développent et fasciculent (*pour revue*, Panatier et Robitaille, 2007). Les astrocytes participent au contrôle de l'**homéostasie ionique et hydrique** *via* les canaux astrocytaires aquaporines et à la régulation du pH extracellulaire se modifiant avec l'activité neuronale. De plus, les astrocytes participent aux dernières étapes de la **différenciation dendritique**. Enfin,

pendant le développement, les astrocytes joueraient un rôle dans l'**élimination synaptique** (Tritsch et al., 1999).

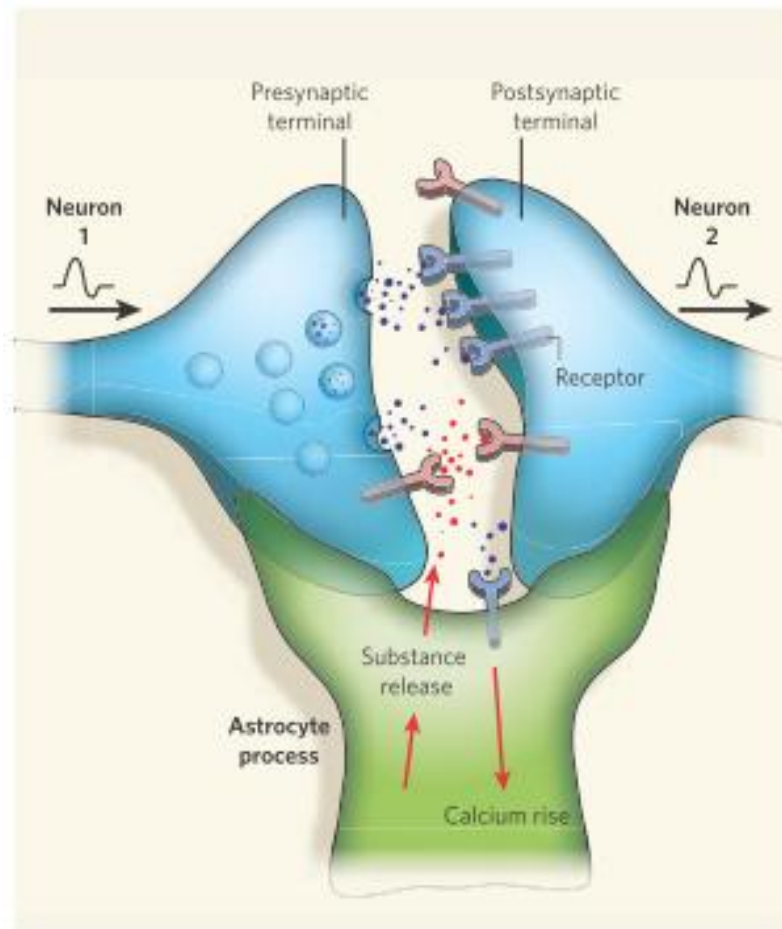


Figure 22 : La synapse tripartite. Les astrocytes expriment de nombreux récepteurs communs avec les neurones. Les neurotransmetteurs relargués de la terminaison présynaptique d'un neurone vont aller activer des récepteurs astrocytaires conduisant à un influx de calcium à l'intérieur de l'astrocyte et le relarguage de nombreuses substances actives, telles que l'ATP, qui vont agir en retour pour activer ou inhiber l'activité neuronale. Les astrocytes sécrètent également des protéines qui vont réguler la fonction présynaptique et moduler la réponse du neurone postsynaptique aux neurotransmetteurs (Allen et Barres, 2009).

De plus les astrocytes agissent sur la recapture des différents neurotransmetteurs, influant ainsi sur l'intensité et la durée d'un signal. Les principaux neurotransmetteurs du SNC sont le **glutamate** et le **GABA** (acide Gamma-Aminobutyrique). L'astrocyte est capable de capter ces deux neurotransmetteurs. Si l'activité gabaergique est trop forte et si la captation de GABA est trop faible, il y a synthèse de glutamate à partir de GABA, ces deux molécules ayant un précurseur commun : la glutamine. La **glutamine-synthétase** est exclusivement astrocytaire. Le glutamate en excès libéré par les neurones est capté par les astrocytes et transformé en glutamine par la glutamine-synthétase. Le glutamate en excès étant

neurotoxique, cette étape de détoxification est extrêmement importante.

De plus, on connaît depuis longtemps le rôle de **pourvoyeur de glucose** des astrocytes nécessaire à l'activité neuronale. Grâce à leurs podocytes apposés contre la paroi des capillaires sanguins cérébraux, le glucose peut pénétrer dans les astrocytes où il est partiellement métabolisé et retransmis aux neurones. Il semble même qu'une activité synaptique plus intense favorise un apport plus élevé de glucose en activant le travail des astrocytes. Ces cellules jouent donc un rôle actif dans le métabolisme et l'alimentation en glucose des neurones (*pour revue*, Benarroch, 2005; Panatier et Robitaille, 2007).

La SB cérébrale est donc une structure complexe composée des axones myélinisés et de cellules gliales. Ces cellules jouent un rôle structurel et trophique majeur pour la myéline et les axones et l'altération de leur développement et / ou maintien conduit à diverses pathologies neurodégénératives. Parmi elles, on distingue le groupe des **LDs** qui sont des pathologies génétiques primitives de la SB que nous allons détailler dans le chapitre suivant.

III. Pathologies génétiques de la substance blanche : les leucodystrophies

Les pathologies génétiques affectant primitivement la SB et son composant principal, la myéline, appelées LDs, représentent un groupe **hétérogène** de **maladies rares** débutant le plus souvent dans l'enfance mais pouvant également toucher l'adulte. Il est classique de distinguer les processus pathologiques qui interfèrent avec le développement de la myéline (**dysmyélinisation**) de ceux qui aboutissent à une destruction de la myéline (**démyélinisation**) (*pour revue*, Labauge et Boespflug-Tanguy, 2010). A l'exception des troubles sévères de la formation de la myéline (**hypomyélinisation**), responsables dès les premiers mois de vie de **troubles du développement psychomoteur**, ces maladies primitives de la myéline se manifestent cliniquement essentiellement par des signes de **souffrance axonale** secondaire plus ou moins rapides. Du fait des difficultés à faire parfois la distinction entre une maladie primitive de la myéline et une anomalie primitive ou associée de l'axone responsable d'une anomalie secondaire de la myéline, le terme de leucoencéphalopathie est parfois utilisé.

A. Classification des leucodystrophies

La classification des LDs a suivi l'évolution des techniques d'analyse du SNC au cours des dernières décennies. Initialement neuropathologique, la classification s'appuie aujourd'hui sur les techniques d'imagerie par résonance magnétique (**IRM**) et de détection des **marqueurs biochimiques et moléculaires** identifiant les anomalies en cause (*pour revue*, Kohlschütter et al., 2010). Il est aujourd'hui classique de distinguer les LDs « **hypomyélinisantes** » et « **démyélinisantes** » (Tableau 2).

Type d'affection	Protéine/gène en cause	Phénotype	Transmission	
Leucodystrophies hypomyélinisantes	Protéo-lipo protéines PLP et DM20 / <i>PLP1</i>	Maladie de Pelizaeus-Merzbacher (PMD, MIM 312080) Paraplégie spastique de type 2 (SPG2, MIM 312920)	Liée à l'X	
	Connexine 47 / <i>Gap jonction gamma 2 (GJC2)</i>	Maladie de Pelizaeus-Merzbacher-like 1 (PMLD1, MIM 608804)	AR	
	SOX10 / <i>SRY-related HMG-box gene 10 (SOX10)</i>	Leucodystrophie avec dysmyélinisation centrale et neuropathie démyélinisante périphérique (PCWH, MIM 609136)	AR	
	Hycine / <i>Down Regulated by CTNNA1 protein A (DRCTNNA1)</i>	Hypomyélinisation et cataracte congénitale (HCC, MIM 610532)	AR	
	Monocarboxylate transporter 8 / <i>MCT8</i>	Syndrome Allan-Herndon-Dudley (MIM 300523)	Liée à l'X	
	Aldéhyde désydrégénase 3A2 / <i>ALDH3A2</i>	Syndrome de Sjögren-Larsson (MIM 270200)	AR	
Leucodystrophies démyélinisantes	Leucodystrophies cavitaires	Glial fibrillary acidic protein / <i>GFAP</i>	Maladie d'Alexander (MIM 203450)	AR
		MLC1 / <i>Megalencephalic Leucoencephalopathy with subcortical Cysts 1 (MLC1)</i>	Leucodystrophie avec mégalencéphalie kystique (MLC, MIM 604004)	AR
		Ribonucléase T2 / <i>RNASET2</i>	Leucoencéphalopathie kystique sans mégalencéphalie (MIM 612951)	AR
		Eukaryotic initiation factor 2B alpha à epsilon / <i>EIF2B1 à 5</i>	eIF2B-pathies (MIM 603896)	AR
	Leucodystrophies démyélinisantes sans cavitations	Mitochondrial aspartyl tRNA synthetase / <i>DARS2</i>	LBSL (MIM 611105)	AR
		Lamine B1 / <i>LMNB1</i>	Leucodystrophie adulte autosomique dominante 5q31 (ADLD, MIM 169500)	AD
	Leucoencéphalopathies vasculopathiques	Ribonucléase H2, A, B ou C / <i>RNASEH2,A,B,C</i>	Syndrome d'Aicardi-Goutières (AGS, MIM 225750)	AR
		Exonucléase TREX1 / <i>TREX1</i>	Syndrome d'Aicardi-Goutières (AGS, MIM 225750) Vasculopathie rétinienne avec leucodystrophie cérébrale (RVCL, MIM 192315)	AR (AGS) AD (RVCL)
		NOTCH3 / <i>NOTCH3</i>	Artériopathie cérébrale autosomique dominante avec leucoencéphalopathie sous-corticale (CADASIL, MIM 125310)	AD
		Collagène IV A1 / <i>COL4A1</i>	Porencéphalie familiale (MIM 175780) Maladie des petits vaisseaux cérébraux (MIM 607595)	AD
	Défauts lysosomaux	Arylsulfatase A / <i>ARSA</i>	Leucodystrophies métachromatique de type 1 (MLD1, MIM 250100)	AR
		Prosaponine / <i>PSAP</i>	Leucodystrophies métachromatique de type 2 (MLD2, MIM 249900)	AR
		Galactocérébroside / <i>GALC</i>	Maladie de Krabbe (MIM 245200)	AR
	Défauts peroxysomaux	Transporteur ATP-binding cassette D1 / <i>ABCD1</i>	Adrénoleucodystrophie (ALD, MIM 300100)	Liée à l'X
	Défaut métabolisme aa	Aspartoacylase / <i>ASPA</i>	Maladie de Canavan (MIM 271900)	AR

Tableau 2 : Classement et gènes impliqués dans les principales leucodystrophies. AR : Autosomique Récessif, AD : Autosomique Dominant, aa : acides aminés. D'après Boespflug-Tanguy et al., 2008; Kohlschütter et al., 2010.

1. Les leucodystrophies hypomyélinisantes

Les LDs hypomyélinisantes (HLDs) sont classiquement caractérisées par un **déficit permanent significatif de la quantité de myéline** au niveau du SNC, reconnaissable à l'image IRM montrant un aspect anormal de la SB relativement **diffus et symétrique**.

Un *continuum* clinique existe entre les formes sévères liées à un trouble de la maturation des OLs myélinisants dans les premiers jours de vie et les formes modérées liées à un trouble de la compaction ou de la stabilité de la myéline se manifestant à l'âge adulte par des troubles moteurs des membres inférieurs (**paraplégie spastique** ascendante ou SPG).

Les principales pathologies parmi les HLDs sont les pathologies de transmission récessive liée à l'X, regroupées sous le terme de **PLP-pathies**, dues à des mutations du gène *PLP1* codant pour les protéines majeures de la myéline PLP et DM20. Les PLP-pathies comprennent la **maladie de Pelizaeus-Merzbacher** (PMD, HLD1) et la **paraplégie spastique de type 2** (SPG2). Les formes PMD sévères résultent de mutations ponctuelles ou de duplications du gène *PLP1* tandis que les formes SPG2 résultent de mutations nulles moins sévères (Cailloux et al., 2000; Inoue, 2005).

D'autres gènes ont plus récemment été impliqués dans des LDs de type **PMD-like** comme le gène *GJC2* codant la Cx47 (Cx spécifique des OLs formant des jonctions canalaire hétérotypiques avec la Cx43 présente à la surface des astrocytes), responsable de la LD PMD-like 1 (HLD2). Les patients PMD-like 1 présentent un phénotype de type PMD de transmission autosomique récessive, initialement modéré, suivi d'une dégradation neurologique rapidement évolutive en lien possiblement avec une dégénérescence axonale rapide (*pour revue*, Boespflug-Tanguy et al., 2008).

Des mutations du gène *SOX10* (*SRY-related HMG-box gene 10*), codant un facteur de transcription régulant la migration des cellules des crêtes neurales et la différenciation des OLs, sont également impliquées dans un phénotype hypomyélinisant du SNC et du SNP (*pour revue*, Schiffmann et Boespflug-Tanguy, 2001).

Récemment, le gène *DRCTNNB1A* (*Down Regulated by CTNNB1 protein A*), codant une protéine de la membrane cellulaire ubiquitaire appelée hyccine, dont le rôle reste inconnu, a été impliqué dans le syndrome d'**hypomyélinisation et cataracte congénitale** (HCC, HLD5) (Zara et al., 2006).

De même, le gène *MCT8* (*Monocarboxylate Transporter 8*) codant un transporteur cérébral des hormones thyroïdiennes, pour lequel des mutations sont connues pour donner un tableau de retard mental lié à l'X ou **maladie d'Allan-Herdon-Dudley** a récemment été impliqué dans un phénotype **PMD-like** lié à l'X. Cependant, à la différence des patients

PMD, ces patients présentent un bilan thyroïdien perturbé et l'hypomyélinisation tend à s'améliorer progressivement, traduisant une atteinte de la SB à type de retard de myélinisation (Vaurs-Barrière et al., 2009).

Enfin, le syndrome de **Sjögren-Larsson** est une pathologie de transmission autosomique récessive, liée à des mutations dans le gène *ALDH3A2* codant pour l'aldéhyde deshydrogénase des acides gras (FALDH). Cette enzyme intervient dans le métabolisme des alcools gras à chaîne longue et des leucotriènes, composants essentiels pour la formation des membranes cellulaires. Ce déficit induit une atteinte prédominante des organes riches en lipides tels que la peau, la myéline et la rétine et se caractérise par une ichtyose prurigineuse, une SPG progressive, un retard mental et des dépôts lipidiques rétiniens (*pour revue*, Gordon, 2007).

2. Les leucodystrophies démyélinisantes

Les LDs démyélinisantes se caractérisent par une **formation initiale effective de la myéline**, de façon plus ou moins normale, suivie d'une **perte** ou de **remaniements** de cette myéline.

Quatre grands groupes d'anomalies démyélinisantes peuvent être observés :

- Les **LDs vacuolaires ou cavitaires** résultant d'un trouble de l'homéostasie de la SB, associées à des changements macro ou micro-kystiques. Ce groupe de pathologies sera abordé plus en détail dans le chapitre suivant.

- Les **LDs démyélinisantes sans cavitations**. Parmi celles-ci, le syndrome **LBSL** (« Leukoencephalopathy with Brain Stem and spinal cord involvement and high Lactate »), causé par des mutations du gène *DARS2* codant la protéine mitochondriale aspartyl-tRNA synthetase (mtAspRS), est caractérisé par de forts taux de lactates dans le cerveau et la moelle épinière.

La surexpression de **lamine B1**, filament intermédiaire nucléaire, est responsable d'une forme adulte de LD démyélinisante dont les atteintes ressemblent à celles de la sclérose en plaque (*pour revue*, Boespflug-Tanguy et al., 2008).

- Les **leucoencéphalopathies vasculopathiques** englobant notamment le syndrome d'**Aicardi-Goutières** qui est une leucoencéphalopathie vasculaire d'origine génétique

caractérisée par des calcifications des noyaux gris centraux. Il existe une hétérogénéité génétique dans ce syndrome qui peut être dû à des mutations dans le gène codant une 3'5'ADN exonucléase appelée **TREX1**, ou dans les gènes codant les **ribonucléases H2 A, B ou C** (*pour revue*, Kaye, 2001).

La leucoencéphalopathie avec artériopathie cérébrale autosomique dominante et infarctus sous-corticaux ou **CADASIL** est une pathologie familiale due à des mutations dans le gène **NOTCH3**, récepteur transmembranaire intervenant dans la différenciation cellulaire, s'exprimant particulièrement dans les cellules musculaires des parois artérielles mais également dans les astrocytes. Elle affecte en général les jeunes adultes et se manifeste par des accidents vasculaires cérébraux précoces touchant plus particulièrement les régions cérébrales profondes pouvant évoluer vers une démence vasculaire précoce et / ou vers une fréquence accrue de migraines avec aura (*pour revue*, Chabriat et al., 2009).

Quant aux mutations dans le gène **COL4A1**, codant le collagène de type 4 α 1, elles sont responsables de **microangiopathies**.

- Les **maladies métaboliques** résultant le plus souvent de troubles innés du métabolisme d'**enzymes ubiquitaires** des peroxysomes, des lysosomes ou des **acides aminés** responsables d'un trouble de la biogenèse ou de la maintenance de la myéline.

Cette catégorie comprend, entre autres, deux LDs d'origine métabolique de transmission autosomique récessive appartenant au groupe des **maladies lysosomales** : la leucodystrophie métachromatique (**MLD**) et la **maladie de Krabbe**. La première est liée à un déficit en **arylsulfatase A**, enzyme lysosomale permettant la dégradation de dérivés sulfatés du GalC (SgalC) en GalC et responsable de la MLD de type 1, ou bien à un déficit en cofacteur de l'arylsulfatase A, la **saposine B**, responsable de la MDL de type 2. Ces déficits entraînent d'une part un défaut de GalC, glycosphingolipide essentiel pour le renouvellement de la gaine de myéline et d'autre part, une accumulation de sulfatides (détectables dans les urines) responsables d'un processus inflammatoire dans le SNC et le SNP par altération de l'homéostasie calcique, et de gangliosides GM2 et GM3 pouvant avoir un rôle délétère sur la fonction cellulaire. La maladie de Krabbe quant à elle, est due à un déficit en **galactocérébrosidase**, enzyme lysosomale dégradant le GalC en céramide, donnant le type 1 de la maladie ou bien en cofacteur de la galactocérébrosidase, la **saposine A**, responsable du type 2. L'atteinte de la myéline dans cette pathologie serait liée à l'accumulation excessive d'un métabolite secondaire appelé **psychosine**, toxique pour la SB (*pour revue*, Baumann et Turpin, 2000; Kaye, 2001).

L'adrénoleucodystrophie (**ALD**), autre maladie métabolique, appartenant au groupe des **maladies peroxysomales**, correspond également à une LD démyélinisante. Il s'agit d'une pathologie de transmission récessive liée à l'X, caractérisée par l'**accumulation d'acides gras saturés à très longue chaîne** (dosables dans le sérum) par défaut de dégradation intra-peroxysomale. Des mutations dans le gène *ABCD1* (*ATP-binding cassette D1*), qui code une protéine de la membrane peroxysomale appartenant à la superfamille des transporteurs ATP-binding cassette (ABC), sont responsables du phénotype. La forme classique sévère observée le plus souvent chez l'enfant est caractérisée par une inflammation associée à une insuffisance surrénalienne. La forme adulte, la plus fréquente, est appelée **adrénomyélonéuropathie** (AMN) et donne lieu à une paraplégie spastique lentement progressive (*pour revue*, Baumann et Turpin, 2000).

La **maladie de Canavan** est une LD démyélinisante d'origine métabolique par **déficit en aspartoacylase**, enzyme hydrolysant l'acide N-acétyl-aspartique (NAA) en aspartate et acétate. Une accumulation de NAA, métabolite important pour l'homéostasie neuronale et permettant la synthèse du neurotransmetteur N-acétyl-aspartyl glutamate (NAAG), est identifiable par dosage dans les urines ou le LCR ou en spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) dans le cerveau. Le lien entre accumulation de NAA, marqueur neuronal, et l'atteinte de la SB reste mal compris. Il est possible que le NAAG interfère avec les fonctions glutamatergiques, jouant ainsi un rôle dans la physiopathologie de la maladie (*pour revue*, Baumann et Turpin, 2000).

B. Les leucodystrophies de type cavitaire

Ce groupe de LDs se caractérise par un aspect **vacuolaire de la SB** reconnaissable à l'IRM du fait de la présence de **zones micro- ou macro-kystiques** de signal identique à celui du LCR. Dans ce groupe, ont été successivement individualisés la maladie d'Alexander (**AxD**), la leucoencéphalopathie avec mégalencéphalie kystique (**MLC**), et le **syndrome CACH/VWM**.

1. La maladie d'Alexander

Pour revue, Schiffmann et Boespflug-Tanguy, 2001; Mignot et al., 2004; Boespflug-Tanguy et al., 2008.

La maladie d'Alexander (AxD) est une maladie progressive, considérée comme fatale, débutant en général dans l'enfance. Elle est la première pathologie décrite reliée directement

et génétiquement à une **dysfonction de l'astrocyte**. Elle a été initialement caractérisée par l'accumulation d'inclusions cytoplasmiques appelées **fibres de Rosenthal (FRs)** dans les astrocytes. Trois formes cliniques ont été ainsi individualisées. La forme infantile est la plus fréquente, elle se caractérise par un début précoce (entre 1 mois et 2 ans) et une évolution sévère. Sa symptomatologie associe une mégalencéphalie progressive, un retard du développement psychomoteur ou une régression, des signes pyramidaux, une ataxie et des crises convulsives conduisant au décès dans les 10 premières années de vie. La forme juvénile débute entre 2 et 12 ans et associe une paraplégie spastique et des signes bulbaires progressifs mais des capacités intellectuelles habituellement préservées. Les formes adultes ont une présentation clinique plus hétérogène donnant un tableau neurodégénératif à rechutes ressemblant à la sclérose en plaques. Les cas d'AxD sont le plus souvent **sporadiques**. Lors de la découverte de FRs dans des cerveaux de souris sur-exprimant la protéine humaine GFAP, identiques à celles décrites dans l'AxD mais sans démyélinisation, le gène **GFAP** est devenu un candidat potentiel pour cette pathologie. Il a en effet ensuite été trouvé dans certains cas des mutations à l'état hétérozygote sur des résidus arginine dans la région codante du gène *GFAP*. La comparaison des souris sur-exprimant le gène humain *GFAP* et de celles délétées pour le gène endogène avec l'AxD supporte l'hypothèse d'un **gain de fonction toxique** dû à la présence des FRs, pouvant induire un **stress oxydatif de la SB**.

Les FRs sont composés du filament intermédiaire astrocytaire **GFAP** et des protéines chaperones **α B-crystalline** et **HSP27** (Heat Shock Protein 27). Ces deux protéines participent à la bonne conformation protéique, notamment celle de GFAP, et assurent donc des fonctions **anti-apoptotiques** et **anti-oxydantes**. Leur séquestration au niveau des FRs pourraient donc empêcher ces fonctions et ainsi conduire à la **neurodégénération** et donc à des **dysfonctionnements astrocytaires**.

2. La leucodystrophie avec mégalencéphalie kystique

Pour revue, Schiffmann et Boespflug-Tanguy, 2001; Boespflug-Tanguy et al., 2008; Labauge et Boespflug-Tanguy, 2010.

La leucoencéphalopathie mégalencéphalique avec kystes sous-corticaux ou MLC est une maladie spongiforme de transmission autosomique récessive de début infantile (avant 10 ans). Elle est liée à des mutations du gène **MLC1** (*Megalencephalic Leucoencephalopathy with subcortical Cysts 1*). Celui-ci code une protéine transmembranaire, de fonction inconnue, exprimée essentiellement dans les astrocytes et les neurones, qui interagirait avec le complexe glycoprotéique associé à la dystrophine, les canaux potassiques Kir4.1 et les canaux aqueux

de type aquaporine-4. Cliniquement, elle est caractérisée par une macrocéphalie, une détérioration lente et progressive des fonctions motrices avec le développement d'une ataxie et d'une spasticité, une épilepsie dans 50% des cas et une dégradation mentale variable. A l'IRM, on observe une **atteinte diffuse de la SB** avec présence de **kystes sous-corticaux bilatéraux** dans les régions temporales et/ou fronto-pariétales. L'aspect spongiforme de la SB témoigne de la présence de vacuoles entre les membranes externes des feuilletts myéliniques épargnant les axones. Ces aspects sont secondaires à une division des lamelles de myéline le long des lignes intrapériodiques ou à une compaction incomplète.

3. La leucoencéphalopathie kystique sans mégalencéphalie

De découverte récente, cette pathologie de transmission autosomique récessive est liée à des mutations du gène *RNASET2*. Les individus atteints sont asymptomatiques à la naissance et développent ensuite une encéphalopathie avec **microcéphalie** associée à un développement psychomoteur retardé durant les premières années de vie. L'analyse IRM montre des **lésions kystiques sous-corticales** associées à des altérations bilatérales de la SB. Le phénotype décrit ressemble à celui des infections congénitales à cytomégalovirus (Henneke et al., 2009).

4. Le syndrome CACH/VWM

Le syndrome CACH/VWM est une autre LD vacuolaire de transmission autosomique récessive due à des mutations dans les cinq gènes *Eukaryotic Initiation Factor 2B 1 à 5* (*EIF2B1* à *5*) codant les cinq sous-unités du facteur ubiquitaire indispensable à l'initiation de la synthèse protéique : le facteur eIF2B. Cette pathologie étant le modèle d'étude de ce travail, ses formes cliniques, sa physiopathologie et sa génétique sont décrits en détails dans le chapitre qui suit.

IV. Le syndrome CACH/VWM et les eIF2B-pathies

A. Historique de la maladie

Au début des années 1990, une nouvelle LD de transmission **autosomique récessive**, a été individualisée de façon indépendante par Hanefeld *et al.* (1993) et Schiffmann *et al.* (1994) puis rapportée comme une entité nouvelle à partir des caractéristiques IRM par van der Knaap *et al.* en 1997.

En 1993, Hanefeld *et al.* ont individualisé, parmi 21 individus avec une LD indéterminée, trois patients présentant un tableau clinique et radiologique proche désigné sous le terme de **Myelinosis centralis diffusa** (MCD) du fait de la disparition progressive de la myéline des hémisphères cérébraux (Hanefeld *et al.*, 1993).

En 1994, Schiffmann *et al.* ont décrit quatre enfants avec une LD indéterminée progressive caractérisée par des troubles de la marche (**ataxie**) et une évolution rapide. Les IRM cérébrales montraient une **anomalie diffuse de la SB**, dont le signal était proche de celui du LCR. Cette LD a été ainsi dénommée **syndrome CACH** pour Childhood Ataxia with Central Hypomyelination par cette équipe (Schiffmann *et al.*, 1994).

Enfin, van der Knapp *et al.*, en 1997, ont individualisé sur des caractéristiques cliniques et IRM un groupe de patients avec une SB ayant progressivement un signal identique à celui du LCR, cette pathologie a été désignée sous le terme de **VWM** pour Vanishing White Matter (van der Knaap *et al.*, 1997). Les 9 enfants de l'étude présentaient une ataxie et une **spasticité** importante, et des capacités mentales relativement préservées. La maladie est **chronique-progressive** avec des **épisodes de détérioration** clinique initiés par des infections ou des traumatismes crâniens mineurs. La détérioration est souvent accompagnée d'une léthargie et peut aboutir à un coma.

Cette LD a finalement été dénommée syndrome **CACH/VWM**.

B. Critères diagnostiques cliniques et IRM

Les premières descriptions du syndrome CACH/VWM concernaient des enfants présentant un développement initial normal, chez qui s'installaient de manière progressive entre l'âge de 2 et 5 ans, des troubles de la marche de type cérébello-spastique, contrastant avec une relative conservation des capacités cognitives. Dans un grand nombre de cas, le début de la maladie était en apparence aigu, avec déficit neurologique, confusion et parfois

crises convulsives dans un contexte d'infection virale fébrile banale ou dans les suites d'un traumatisme crânien minime. Au cours de l'évolution, une récupération partielle, parfois totale, était observée en quelques semaines ou mois, suivie de nouveaux épisodes de détérioration plus ou moins rapide, aboutissant au décès par dysfonctionnement du tronc cérébral dans un délai de 5 à 10 ans après le début de la maladie (Hanefeld et al., 1993; Schiffmann et al., 1994; van der Knaap et al., 1997).

L'atteinte de la SB est **diffuse**, **bilatérale** et **symétrique**. Elle apparaît de façon anormalement hypodense sur l'examen tomodensitométrique du cerveau. L'IRM est caractéristique avec une SB de signal proche de celui du LCR : hyposignal T1 et hypersignal T2 (Figure 23). Sur les séquences FLAIR (« Fluid Attenuation Inversion Recovery », ou densité de protons), au sein de l'hypersignal anormal de la SB, il existe de vastes zones en hyposignal attestant du caractère cavitaire de cette LD. Les zones cavitaires sont préférentiellement dans les régions périventriculaires de la SB frontale ou parfois occipitale. Le caractère extensif de la cavitation de la SB dans les formes infantiles explique le terme de VWM (SB disparaissante), donné à ce syndrome. Il n'existe pas de corrélation entre l'étendue des lésions en IRM et les symptômes cliniques. En effet, des patients avec atteinte neuroradiologique extensive peuvent être paucisymptomatiques (*pour revue*, Labauge et al., 2007).

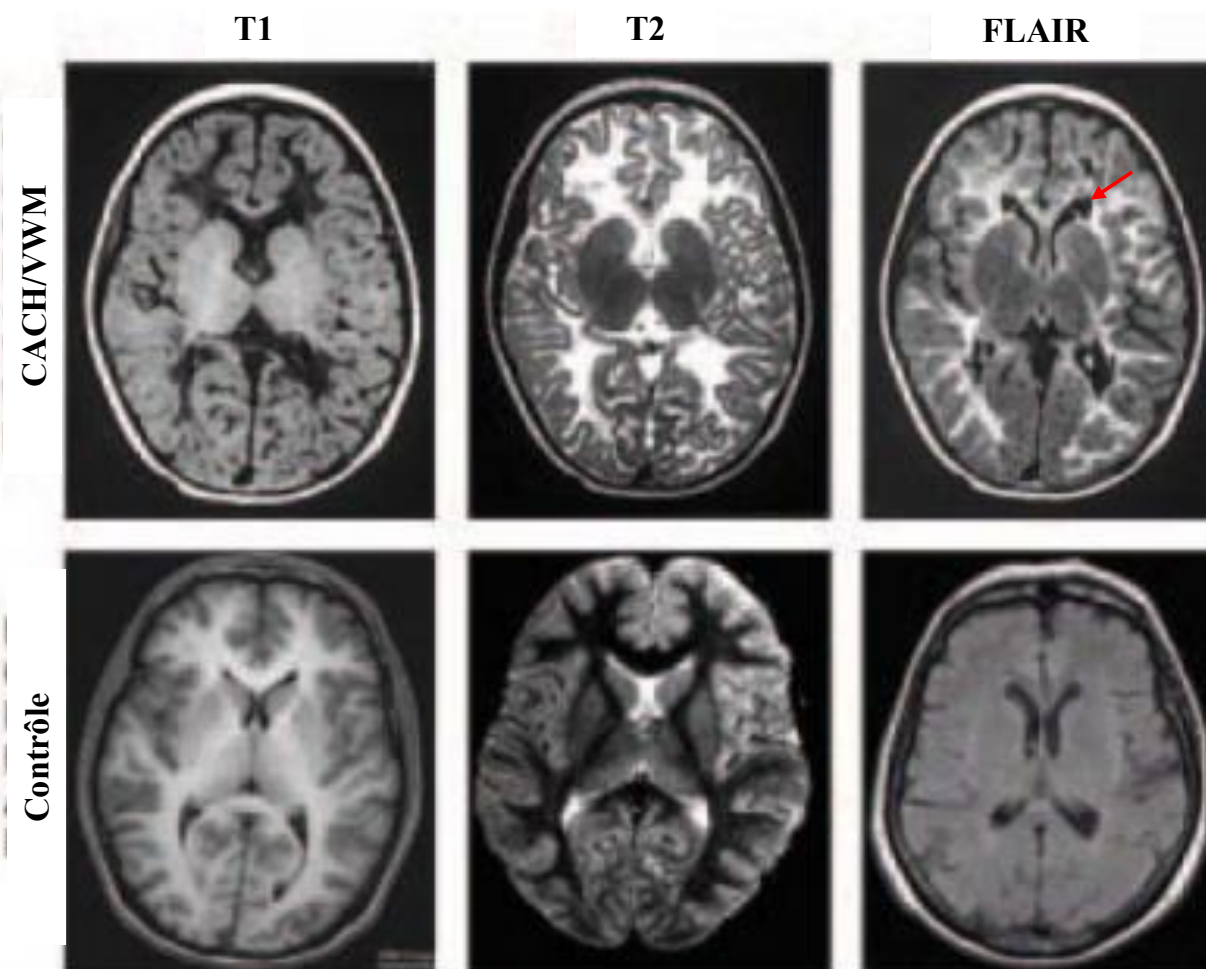


Figure 23 : Aspects IRM de la substance blanche (SB) d'un patient CACH/VWM âgé de 5 ans en comparaison avec un sujet sain de même âge. La SB a un signal proche du liquide céphalo-rachidien sur les séquences pondérées T1 et T2. Des zones cavitaires apparaissent dans la SB frontale en FLAIR (flèche rouge). D'après Labauge et al., 2007.

C. Marqueurs neuropathologiques et biochimiques

Les études neuropathologiques (Schiffmann et al., 1994; van der Knaap et al., 1997) effectuées dans les formes infantiles comme adultes montrent qu'il s'agit d'une LD cavitaire de type **orthochromatique** caractérisée par une **atteinte démyélinisante spongiforme strictement limitée à la SB cérébrale** avec respect de la moelle et des racines donnant un gradient rostro-caudal, ainsi qu'une **relative préservation des axones**, sans **aucune réaction microgliale ni macrophagique** évoquant un processus inflammatoire,

En revanche, l'étude neuropathologique de cerveaux de deux patients CACH/VWM décédées à 6 et 10 ans a montré une **augmentation anormale du nombre d'OLs**. Ces OLs présentent un cytoplasme très développé et beaucoup d'organelles (Rodriguez et al., 1999) (Figure 24).

Une étude en microscopie électronique de cerveaux de six patients CACH/VWM a ensuite mis en évidence la présence de **cellules « spumeuses »** exprimant les protéines MOG et PLP ainsi qu'un **gliose astrocytaire périvasculaire** (Wong et al., 2000).

Cependant, une étude chez un garçon atteint d'une forme à début beaucoup plus précoce et mort vers l'âge de 2 ans révèle une éventuelle destruction primaire des OLs matures par apoptose, suivi du recrutement de cellules progénitrices exprimant le transcrit PLP (Brück et al., 2001), suggérant probablement une **dynamique cellulaire** impliquée dans la physiopathologie de la maladie.

En plus de l'atteinte oligodendrocytaire, une étude a montré une **diminution du nombre d'astrocytes** dans les aires cérébrales affectées de deux sœurs à 10 et 11 mois de vie (Francalanci et al., 2001).

Plus récemment, Dietrich *et al.* ont mis en évidence dans le cerveau d'un patient âgé de 12 ans une **morphologie inhabituelle de ces astrocytes** avec peu de prolongements anormalement longs et pas de pieds astrocytaires (Dietrich et al., 2005) (Figure 25).

Enfin, en accord avec les résultats précédents, une étude vient de caractériser ces astrocytes comme étant à un stade prolifératif, démontrant une **immaturité astrocytaire**, associée à une augmentation d'expression de GFAP δ , issu d'un épissage alternatif du transcrit astrocytaire *GFAP* (Bugiani et al., 2011).

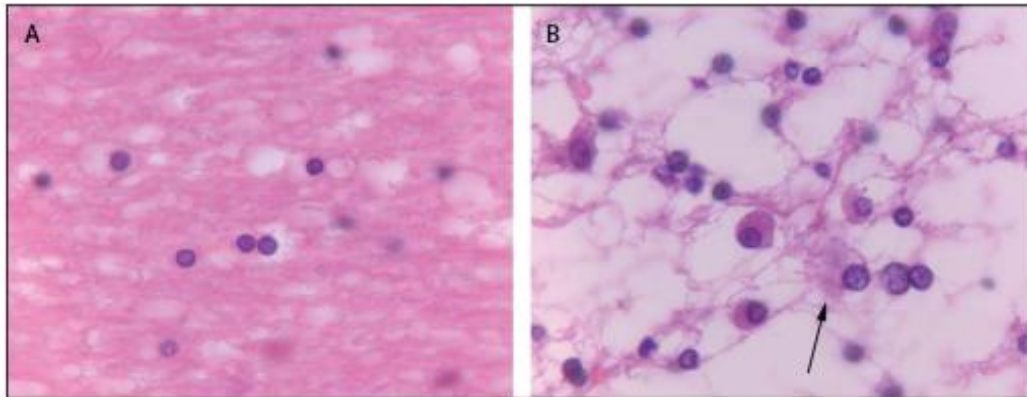


Figure 24 : Anomalie des oligodendrocytes (OLs) chez les patients CACH/VWM. Coloration à l'hématoxyline-éosine. **A)** Les OLs normaux ont un petit cytoplasme et un noyau rond et dense. La substance blanche (SB, rose) est très compacte. **B)** Chez un patient CACH/VWM, les OLs sont plus nombreux, avec un cytoplasme abondant et un noyau excentré (flèche noire). La SB est beaucoup moins compacte, de grandes zones de cavitation apparaissent (van der Knaap et al., 2006).

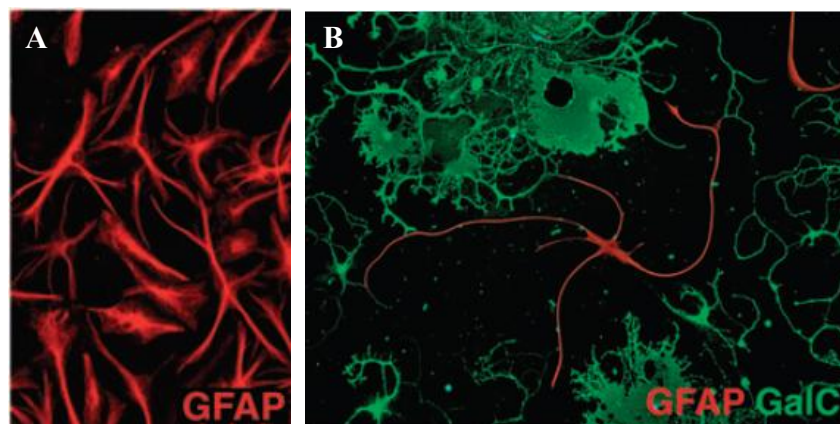


Figure 25 : Défaut de maturation des astrocytes chez les patients CACH/VWM. Explants de cerveau mis en culture, marquage GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) : protéine astrocytaire et GalC (Galactocérebroside) : composant de la myéline. **A)** Les astrocytes normaux ont de courts prolongements au bout desquels se trouvent les pieds astrocytaires. **B)** Chez un patient CACH/VWM, les astrocytes ont de longs prolongements sans pieds astrocytaires. D'après Dietrich et al., 2005.

Les études en spectroscopie par résonance magnétique (SRM) ont mis en évidence une **diminution des taux de NAA** (marqueur de l'intégrité neuronale), de la **choline** (marqueur du renouvellement membranaire, en particulier des membranes myéliniques) et de la **créatine** (marqueur de l'activité cellulaire) strictement limitée à la SB (Hanefeld et al., 1993; Schiffmann et al., 1994; Dreha-Kulaczewski et al., 2008) ainsi qu'une **augmentation des taux de glucose et de lactate** (Hanefeld et al., 1993).

Une analyse SRM du phosphore sur sept patients atteints a également montré une **diminution de tous les métabolites phosphatés de haute énergie** dans les régions affectées du cerveau. Parmi les métabolites impliqués dans la biosynthèse et le catabolisme des phospholipides membranaires, plusieurs ont une concentration anormale, suggérant que l'état énergétique des tissus touchés est altéré (Blüml et al., 2003).

Une **diminution de la forme asialylée de la transferrine** (asialotransferrine) a été rapportée dans le LCR de patients CACH/VWM (Vanderver et al., 2005, 2008) même si l'origine des formes sialylées et asialylées de la transferrine dans le LCR reste encore inconnue. Il est proposé que la sialotransferrine puisse provenir d'un transfert de la transferrine sanguine *via* la BHE et que l'asialotransferrine provienne d'une dégradation partielle de la sialotransferrine ou d'une synthèse *de novo* par les cellules du SNC. Dans ce cas, la diminution de l'asialotransferrine dans le LCR des patients CACH/VWM traduirait : soit une augmentation de la dégradation de la forme sialylée, soit un défaut de la sialylation de la transferrine.

D. Implication des gènes EIF2B

En 1999, une étude de liaison réalisée à partir de 19 familles présentant un phénotype de syndrome CACH/VWM a permis d'identifier une région d'intérêt en **3q27** (Leegwater et al., 1999). Par la suite, le séquençage des parties exoniques de 25 gènes dans cette région d'intérêt a permis l'identification de mutations dans le gène **EIF2B5**, codant la sous-unité ϵ du facteur d'initiation de la traduction eIF2B (Leegwater et al., 2001). Puis, par homologie de fonction, il a ensuite été trouvé des mutations dans les quatre gènes **EIF2B1 à B4** codant les quatre autres sous-unités du facteur eIF2B, α , β , γ et δ (van der Knaap et al., 2002).

A ce jour, l'analyse de 228 patients a révélé une **grande diversité allélique** (127 mutations ; annexe 1). Les mutations touchent dans 69% des cas la sous-unité eIF2B ϵ (**EIF2B5**), la sous-unité eIF2B β (**EIF2B2**) dans 13% des cas, la sous-unité eIF2B δ (**EIF2B4**) dans 9% des cas, la sous-unité eIF2B γ (**EIF2B3**) dans 7% des cas et enfin la sous-unité eIF2B α (**EIF2B1**) dans 2% des cas (Figure 26).

On retrouve majoritairement des mutations faux-sens (83%) qui peuvent être à l'état homozygote ou hétérozygote composite alors que les mutations aboutissant à un décalage du cadre de lecture (5%), à une terminaison prématurée de la traduction (7%) ou à un défaut d'épissage (5%) ne sont jamais présentes à l'état homozygote. Le facteur eIF2B étant indispensable à l'initiation de la traduction, de telles mutations à l'état homozygote entraîneraient une perte de fonction totale de ce facteur aboutissant à une létalité embryonnaire. Aucun patient double hétérozygote pour des mutations situées sur deux gènes différents n'a été identifié à ce jour.

Deux mutations récurrentes ont été identifiées : la mutation c.338G>A (**p.Arg113His**) qui est retrouvée chez 61% des patients mutés dans le gène *EIF2B5* à l'état hétérozygote composite (57%) ou homozygote (43%) et la mutation c.638A>G (**p.Glu213Gly**) qui est retrouvée elle chez 67% des patients mutés dans le gène *EIF2B2* à l'état homozygote pour 60% d'entre eux.

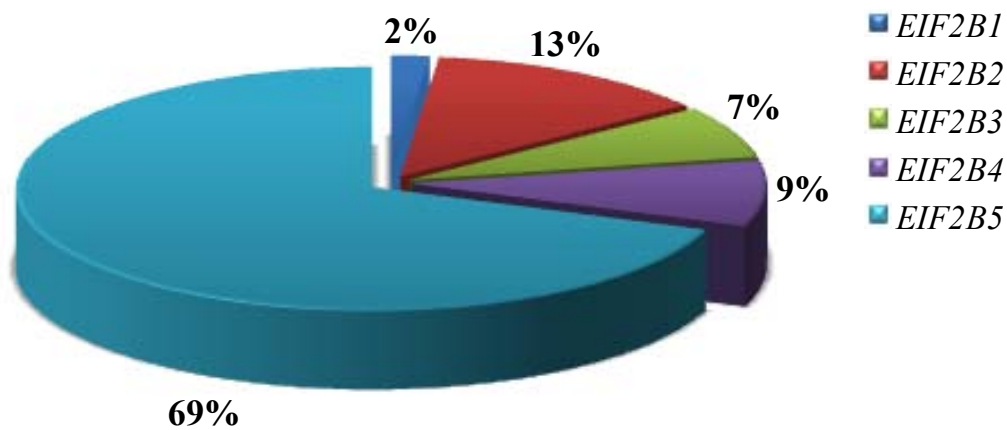


Figure 26 : Répartition des mutations décrites à ce jour dans les cinq gènes *EIF2B*.

E. Spectre clinique des eIF2B-pathies

L'utilisation des critères IRM et neuropathologiques de CACH/VWM pour sélectionner les patients avec une LD de cause indéterminée susceptibles de bénéficier d'une analyse des gènes *EIF2B* a permis d'élargir le **spectre clinique** de cette pathologie (Fogli et al., 2004a) (Figure 27).

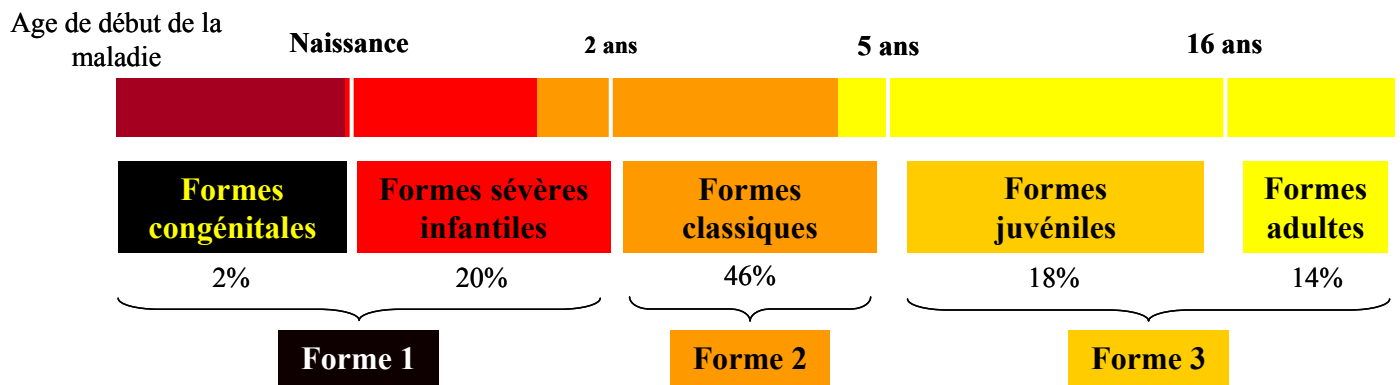


Figure 27 : Spectre clinique étendu des eIF2B-pathies : corrélation entre l'âge de début de la maladie et la sévérité clinique. La répartition des formes cliniques a été calculée à partir d'une cohorte de 219 patients. D'après Fogli et al., 2004a.

1. Concept d'eIF2B-pathie

En plus de la forme classique CACH/VWM décrite initialement et survenant dans l'enfance entre 2 et 5 ans, l'existence de formes foudroyantes débutant avant l'âge de 1 an avec décès en quelques mois a été rapportée (Francalanci et al., 2001). L'identification des gènes en cause a permis de rapporter à la même entité deux formes cliniques précoces particulières:

(1) des **formes infantiles fatales** dont une leucoencéphalopathie décrite chez les indiens **Cree** du Canada (Cree leukoencephalopathy : CLE), caractérisée par l'apparition des troubles entre 3 et 6 mois avec un décès de 100% des individus avant l'âge de 21 mois (Black et al., 1988; Fogli et al., 2002b, 2002a). Les patients présentent une hypotonie suivie par l'apparition brutale, souvent en lien avec des infections fébriles, de phase de détresse neurologique avec hypertonie, hyperventilation, vomissements et diarrhées. Une régression psychomotrice, une léthargie, une perte de la vue et un arrêt de la croissance du périmètre crânien sont observés. L'analyse neuropathologique a démontré dans la SB la présence de **nombreuses cellules avec de larges vacuoles exprimant la protéine MOG** et le marquage GFAP montre également une **astrogliose** (Fogli et al., 2002b) Une neuropathie périphérique a récemment été mise en évidence (Huntsman et al., 2007). La mutation homozygote **p.Arg195His** de la sous unité eIF2Bε a ainsi été identifiée comme étant responsable de la CLE (Fogli et al., 2002b).

(2) des **formes congénitales** rapidement létales associées à des **anomalies du développement** (retard de croissance intra-utérin avec oligohydramnios, hypoplasie rénale, cataracte/glaucome congénitaux, dysmorphie faciale, dystrophie ovarienne), parfois à une atteinte hépatique et pancréatique (van der Knaap et al., 2003) et plus récemment une neuropathie périphérique démyélinisante (Federico et al., 2006).

Les **formes de début plus tardif** avec apparition des symptômes au cours de l'adolescence ou à l'âge adulte (le plus souvent dans la deuxième décennie mais parfois au-delà) sont de connaissance plus récente (Fogli et al., 2003b; Ohtake et al., 2004; van der Knaap et al., 2004). Le début est souvent plus insidieux avec des troubles cognitifs ou du comportement non reconnus, jusqu'à l'apparition de signes cérébello-spastiques, ou d'épisodes aigus, en particulier des troubles de la conscience ou des crises d'épilepsie. Comme dans les formes infantiles, des facteurs environnementaux peuvent aggraver ou révéler la maladie (Fogli et al., 2004a). Ces exacerbations induites par des facteurs environnementaux (infections, traumatismes crâniens, frayeur, exposition au soleil, grossesse, etc) sont résolutive en quelques heures ou jours (Vermeulen et al., 2005; Peter et al., 2008). Il a été rapporté dans plusieurs études une **hétérogénéité phénotypique** dans les formes adultes de la pathologie qui peut se traduire par une épilepsie isolée (Jansen et al., 2008), des formes psychiatriques pures, démentielles isolées, sans autre symptôme de focalisation, suggérant un diagnostic de démence sénile (Ohtake et al., 2004) ou encore des troubles psychiatriques parfois proches de la schizophrénie (Denier et al., 2007). Des formes paucisymptomatiques, asymptomatiques, ou encore révélées par des symptômes non neurologiques, ont été également décrites (Fogli et al., 2003b; van der Knaap et al., 2004).

En 1997, Schiffmann et al. ont décrit pour la première fois quatre patientes entre 15 et 29 ans présentant une LD associée à une dysfonction ovarienne, nommé alors **ovarioleucodystrophie** (Schiffmann et al., 1997). Ces femmes présentaient l'apparition de symptômes à l'entrée de l'adolescence ou à l'âge adulte avec des troubles de la marche, parfois associés à un dysfonctionnement cognitif, et une progression lentement évolutive. Deux de ces patientes présentaient une aménorrhée primaire (absence d'apparition de menstruations), la troisième une aménorrhée secondaire (arrêt précoce des menstruations avant l'âge de 40 ans), et la dernière une dysgénésie ovarienne apparue dès l'âge de 13 ans. Les quatre patientes avaient un caryotype normal ainsi qu'un axe hypothalamo-hypophysaire non dérégulé. Une anomalie diffuse de la SB avec des signes d'hypomyélinisation associés parfois à des aspects cavitaires était observée chez ces patientes. Du fait de ces anomalies évocatrices à l'IRM, huit patientes avec un phénotype d'ovarioleucodystrophie ont été

analysées pour les gènes *EIF2B*. Des mutations à l'état homozygote ou hétérozygote composite des gènes *EIF2B5* ou *EIF2B2*, impliquant avec une grande fréquence la mutation c.338G>A du gène *EIF2B5* ont été mises en évidence chez sept de ces patientes (Fogli et al., 2003b) puis, par la suite, chez d'autres patientes (van der Knaap et al., 2004; Peter et al., 2008; Damon-Perriere et al., 2008; Mathis et al., 2008). De plus, une corrélation entre l'âge d'apparition des signes neurologiques et la sévérité du déficit ovarien a pu être établie, suggérant une voie physiopathologique commune pour ces deux tissus (Fogli et al., 2003b; van der Knaap et al., 2004).

L'identification de ce large spectre clinique laissa alors émerger le concept de maladies liées à des mutations du facteur eIF2B ou **eIF2B-pathies** (Fogli et al., 2004a; Fogli et Boespflug-Tanguy, 2006).

Trois groupes de sévérité ont ainsi été définis :

- la forme infantile précoce symptomatique avant l'âge de 2 ans d'évolution sévère (forme 1),
- la forme infantile tardive survenant entre 2 et 5 ans (forme 2) : syndrome CACH/VWM décrit initialement,
- la forme juvénile/adulte avec un âge de début des symptômes après l'âge de 5 ans (forme 3).

2. Corrélation génotype-phénotype

De plus, une **corrélation entre l'âge d'apparition des symptômes et la sévérité de la maladie** a été mise en évidence à partir d'une cohorte de 83 patients atteints d'eIF2B-pathies (Fogli et al., 2004a). L'âge d'apparition de la maladie est corrélé à la survie (Figure 28) mais pas au gène muté ni à la position de la mutation. En effet, des variations phénotypiques entre patients porteurs de mêmes mutations ou entre patients d'une même fratrie ont pu être observées particulièrement dans les formes juvéniles/adultes suggérant que d'autres facteurs tels que des facteurs environnementaux seraient en cause dans l'évolution et la sévérité des eIF2B-pathies. En revanche, il pu être montré que la mutation p.Arg195His sur le gène *EIF2B5*, décrite dans la population d'indien Cree, était associée à des formes sévères, alors que les mutations p.Arg113His et p.Glu213Gly sur les gènes *EIF2B5* et *EIF2B2*, respectivement, étaient retrouvées, elles, dans des formes plus modérés avec un début généralement à l'âge adulte ou dans les ovarioleucodystrophies. De plus, une étude récente a montré que les patients homozygotes pour la mutation p.Arg113His avaient un phénotype plus modéré que les patients hétérozygotes composites pour cette même mutation et que donc la combinaison d'une mutation sévère et de la mutation p.Arg113His permettait de modérer le

phénotype, suggérant ainsi la détermination du phénotype clinique comme étant dépendante des deux mutations et non seulement de la plus sévère (van der Lei et al., 2010).

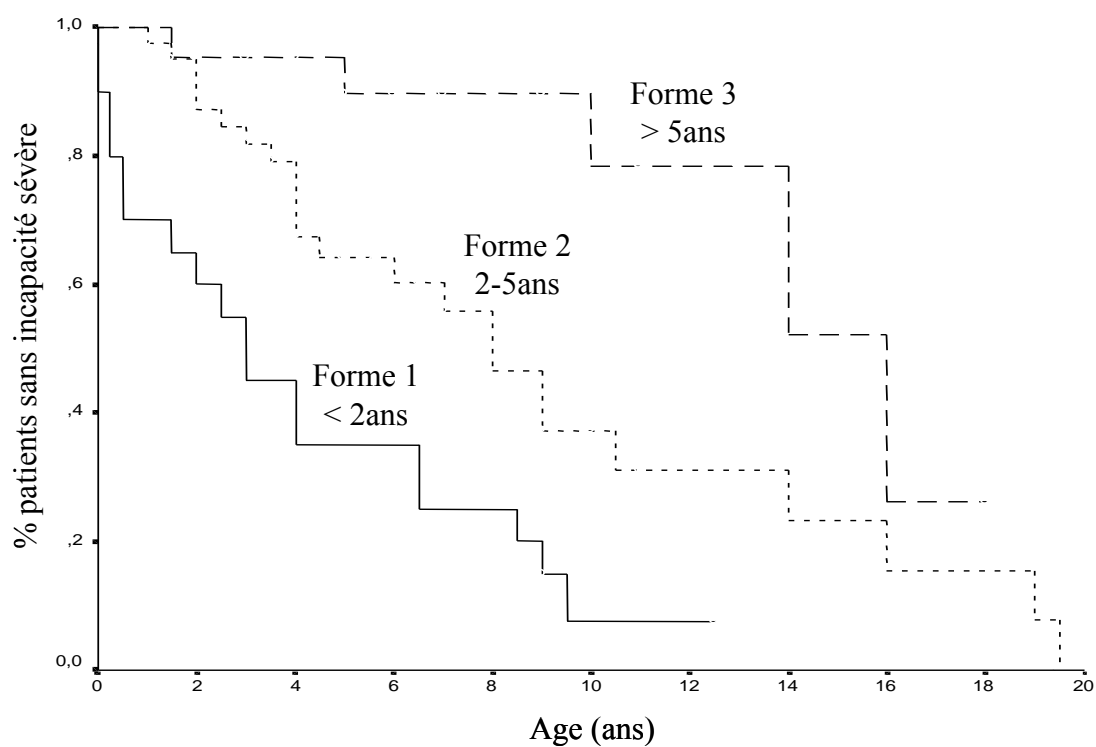


Figure 28 : Courbe de survie de 83 individus eIF2B mutés sans incapacité sévère en fonction de leur âge. D'après Fogli et al., 2004a.

V. eIF2B, régulation de la traduction et stress cellulaire

La **traduction** protéique est un mécanisme moléculaire complexe permettant l'assemblage spécifique des acides aminés en chaîne polypeptidique. La nature des acides aminés et leur ordre (et donc la structure de la protéine finale) sont déterminés par l'ARN messenger (ARNm). Les ARNm constituent donc le support essentiel de l'information génétique entre l'ADN et le ribosome où s'effectuera la traduction. L'addition d'une **queue polyadénylée** (« poly A ») à l'extrémité 3'UTR et d'une structure unique en « **coiffe** » composée d'un résidu 7-méthylguanosine lié à un triphosphate (m^7GpppN , où N représente n'importe quel nucléotide) à l'extrémité 5'UTR permet d'optimiser la traduction des ARNm (Figure 29).

Nous rappellerons donc les différentes étapes de la traduction, en détaillant particulièrement l'étape clé d'initiation de la traduction et ses régulations qui fait intervenir le facteur eIF2B et nous terminerons sur l'impact du stress cellulaire dans la physiopathologie des eIF2B-pathies.

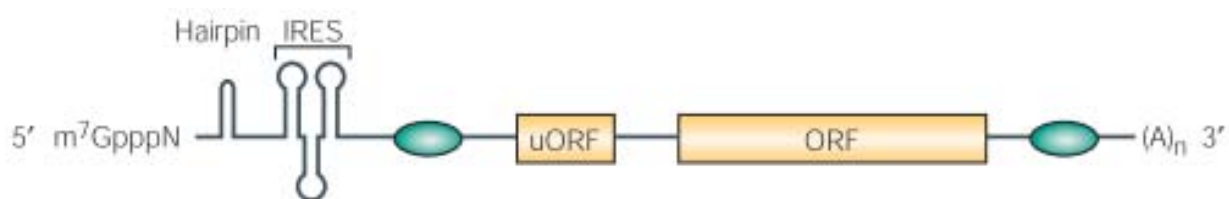


Figure 29 : Eléments qui influencent la traduction des ARNm. La coiffe en 5' de l'ARNm (m^7GpppN) et la queue poly A en 3' ($(A)_n$) sont des motifs canoniques permettant l'initiation de la traduction. Les structures secondaires telles que les boucles (hairpin) et les IRES (internal ribosome entry sequences) vont permettre une traduction indépendante de la coiffe. Les uORF (upstream Open Reading Frames) agissent normalement comme régulateurs négatifs de la traduction qui débute à l'ORF (Open Reading Frames) (Gebauer et Hentze, 2004).

A. Les étapes de la traduction

Au cours de ces dernières années, de nombreux travaux ont démontré l'importance du contrôle de la synthèse protéique comme instrument de modulation de l'expression des gènes eucaryotes. L'importance de ce mode de régulation a été décrite au cours de différents processus biologiques, tels que le développement, la croissance et la prolifération cellulaire. La synthèse protéique peut être modulée lors de chacune des trois étapes qui la composent : l'initiation, l'élongation et la terminaison.

1. Initiation de la traduction

Pour revue, Pain, 1996; Dever, 2002; Sonenberg et Dever, 2003; Gebauer et Hentze, 2004.

Le déclenchement de la synthèse des protéines chez les eucaryotes procède selon trois mécanismes distincts, qui peuvent être complémentaires. Ce sont : (1) le **balayage des ribosomes de la coiffe 5' au codon d'initiation**, majoritairement un AUG présent dans un contexte de type A/GCCAUGG ; (2) le recrutement direct, indépendant de la coiffe et en position interne, des ribosomes par un élément génétique appelé **IRES** (Internal Ribosome Entry Site), et (3) le **shunt** (court-circuit) au cours duquel les ribosomes reconnaissent l'extrémité 5', puis sont transférés au niveau du codon initiateur.

a. Initiation de la traduction dépendante de la coiffe

Le mécanisme de balayage est le processus par lequel le ribosome s'attache à l'ARNm et parcourt la région 5' non traduite pour se positionner au niveau du codon d'initiation. Chez les eucaryotes, cette étape est réglée par au moins 9 polypeptides distincts qui sont appelés facteurs d'initiation (eIF pour **eukaryotic initiation factors**, Tableau 3).

Les étapes de l'initiation de la traduction dépendante de la coiffe sont récapitulées dans la figure 30.

L'initiation de la traduction commence par le recrutement de l'ARN de transfert initiateur-méthionine ($\text{ARNt}_i^{\text{Met}}$) et d'une molécule de **GTP** (Guanosine Triphosphate) par le facteur d'initiation **eIF2**, formant ainsi un **complexe ternaire** eIF2-GTP- $\text{ARNt}_i^{\text{Met}}$. Le facteur eIF2 est composé de trois sous-unités α , β et γ . La sous-unité γ lie l' $\text{ARNt}_i^{\text{Met}}$ ainsi qu'une molécule de GTP. La sous-unité α est impliquée dans la reconnaissance du codon d'initiation AUG. La sous-unité β permet la liaison aux facteurs eIF2B, eIF5 et à l'ARN. Le complexe ternaire va alors interagir avec **eIF5** et **eIF3**, préalablement fixés à la **sous-unité 40S ribosomale**, pour former le **complexe 43S**. Le facteur eIF3 stabilise la sous-unité 40S du ribosome et empêche sa réassociation avec la sous-unité 60S car cela aboutirait à la formation de ribosomes 80S monomères inactifs. Le complexe 43S est alors recruté à l'extrémité 5' du transcrit *via* l'interaction d'eIF3 avec le complexe protéique **eIF4F** qui s'associe à la coiffe. Le complexe eIF4F est composé d'**eIF4E**, qui interagit physiquement avec la structure de la coiffe, d'**eIF4A**, une ARN hélicase qui déroule les structures secondaires de la région 5' et facilite la lecture de l'ARNm, et enfin, d'**eIF4G** qui fonctionne comme une protéine d'échafaudage en interagissant avec eIF4E, eIF4A, eIF3 ou encore **PABP** (Poly-A Binding Protein). PABP est une protéine d'échafaudage qui permet de rassembler des facteurs capables d'interagir à la fois avec la coiffe mais aussi avec la queue poly-A de l'ARNm afin

d'augmenter de façon synergique l'efficacité de l'initiation de la traduction. Elle permet ainsi la circularisation de l'ARNm grâce à son interaction avec d'une part le facteur eIF4G en 5' et d'autre part la queue poly-A en 3', permettant ainsi le recyclage des ribosomes après la terminaison de la traduction.

Le complexe 43S ainsi recruté au niveau de la coiffe démarre la lecture de la région 5' jusqu'à la rencontre d'un **codon d'initiation** dans un bon contexte nucléotidique : c'est l'étape de balayage. Lors de la progression du complexe de pré-initiation, l'activité hélicase d'eIF4A déroule les structures d'ARN, qui se trouvent sur le trajet du ribosome, en consommant de l'ATP. Cette étape de balayage est sous le contrôle d'eIF1 et d'eIF1A. En effet, ces deux protéines, qui rejoignent le complexe de pré-initiation au niveau de la coiffe, vont surveiller la progression du ribosome et empêcher qu'il initie à un site aberrant.

Au niveau du site d'initiation, le facteur eIF5 hydrolyse le GTP, provoquant la **dissociation du complexe de pré-initiation**. La **sous-unité ribosomale 60S** rejoint le complexe de pré-initiation, ainsi que le facteur eIF5B qui favorise l'association des sous-unités ribosomiques. Le facteur eIF2, couplé au GTP qui interagit avec l'ARN_{t_i^{Met}, perd son affinité particulière pour la méthionine quand le GTP est hydrolysé en GDP (Guanosine Diphosphate). Ceci participe au mécanisme de relâchement de l'ARN_{t_i} quand le codon d'initiation est reconnu. Quand le complexe ternaire atteint le codon d'initiation, et avant que la grande sous-unité ribosomale ne rejoigne le site d'initiation de la traduction, la **molécule de GTP est hydrolysée**. Le facteur eIF2 quitte alors le ribosome sous la forme d'un complexe binaire eIF2-GDP.}

Le facteur eIF2 est recyclé après un cycle d'initiation. Pour que ce facteur soit de nouveau actif, la molécule de GDP est échangée pour une molécule de GTP. Cette réaction est catalysée par le facteur eIF2B.

Nom	Sous-unités	Masse (kd)	Fonction
eIF1A	1	16,5	Reconnaissance du complexe ternaire Balayage Dissociation du ribosome
eIF1	1	12,6	Balayage Sélection du codon AUG
eIF2	3	126	Appartient au complexe ternaire Reconnaissance du codon AUG
eIF3	13	800	Assemblage du complexe ternaire Recrutement du complexe 43S à la coiffe État dissocié du ribosome
eIF4A	1	44	Hélicase
eIF4E	1	26	Reconnaissance de la coiffe
eIF4G	1	154	Protéine d'échafaudage ; liaison à PABP, eIF4E, eIF4A, eIF3 Balayage
eIF5	1	49	Stimule l'activité GTPase d'eIF2
eIF5B	1	139	Association des sous-unités ribosomiques
PABP	1		Liaison de la queue poly-A

Tableau 3 : Les facteurs d'initiation de la traduction dépendante de la coiffe chez les eucaryotes. eIF : eukaryotic Initiation Factor ; PABP : Poly-A Binding Protein. D'après Hellen et Sarnow, 2001.

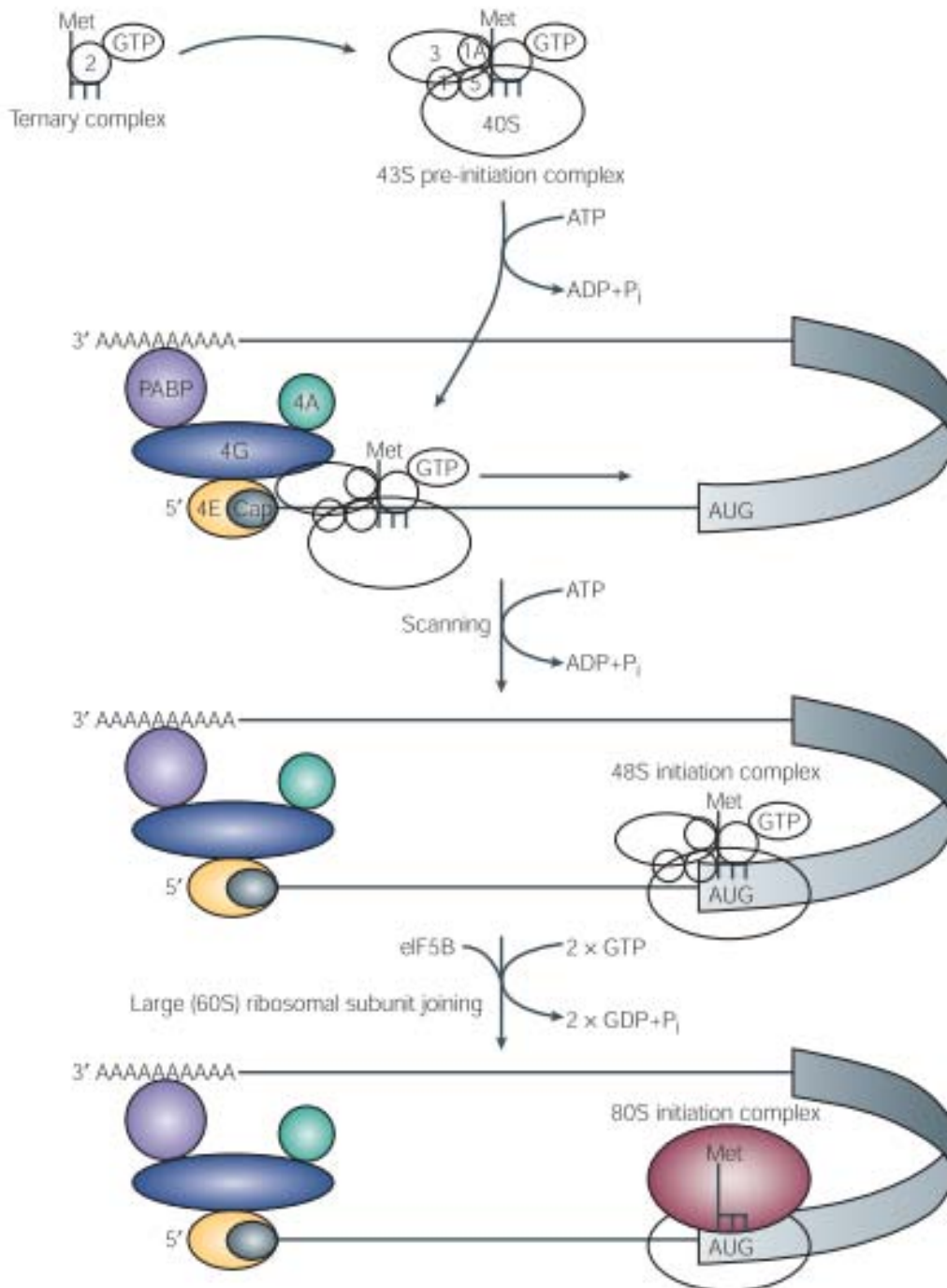


Figure 30 : Initiation de la traduction dépendante de la coiffe chez les eucaryotes. Le complexe ternaire formé d'un ARNt initiateur couplé à une méthionine et du facteur eIF2 lié au GTP interagit avec eIF3 et eIF5, préalablement fixés à la sous-unité 40S ribosomale, pour former le complexe 43S. Ce complexe se fixe alors à l'ARNm et forme, grâce à eIF4F, le complexe de pré-initiation (ou 48S). Celui-ci migre jusqu'au site d'initiation et eIF5 hydrolyse le GTP permettant ainsi la dissociation du complexe de pré-initiation et la liaison de la sous-unité ribosomale 60S. La synthèse peptidique peut alors ensuite commencer (Gebauer et Hentze, 2004).

b. Les mécanismes alternatifs de l'initiation de la traduction

L'initiation coiffée dépendante est le mécanisme général d'initiation de la traduction. Cependant, pour certains ARNm cellulaires, l'initiation de la traduction peut se produire par un mécanisme alternatif, qui ne nécessite pas l'utilisation d'eIF4E (qui lie physiquement la coiffe). Ces transcrits possèdent dans leur région 5' un site interne d'entrée du ribosome ou **IRES** qui correspond généralement à une région structurée riche en GC. L'IRES permet, indépendamment de la coiffe, le recrutement de la sous-unité 40S du ribosome à proximité du codon AUG en utilisant la machinerie d'initiation de la traduction (à l'exception d'eIF4E). Bien que les mécanismes de fonctionnement soient différents entre les IRES, des protéines cellulaires spécifiques sont le plus souvent nécessaires : les **ITAFs** (IRES Trans Acting Factors). L'IRES permet à certains ARNm cellulaires d'**échapper à l'inhibition globale de la traduction induite par un stress** tel qu'une infection virale ou un stress du RE. L'initiation interne de la traduction fut découverte chez les picornavirus : « petits virus à ARN » qui l'utilisent afin d'inhiber la traduction coiffée dépendante et ainsi détourner la machinerie de traduction à leur profit. Depuis, de nombreux IRES ont été détectés sur des ARN d'autres virus ainsi que sur des ARN cellulaires. Jusqu'à présent, 85 IRES sur des ARNm cellulaires et 39 sur des ARN viraux ont été décrites (Baird et al., 2006).

L'étude de certains virus a permis de mettre en évidence un troisième mécanisme de déclenchement de la traduction, le **shunt**, qui combine certains aspects du balayage classique et de l'initiation interne. Le complexe de pré-initiation se forme au niveau de la coiffe de l'ARNm puis commence à balayer jusqu'à la rencontre de régions d'ARN structurées qui pilotent son transfert en aval, où il peut atteindre le codon d'initiation. Comme pour l'initiation interne, ce processus permet de passer outre des structures très stables d'ARN qui ne pourraient pas être déroulées lors du balayage.

2. Etape d'élongation de la traduction

Le complexe eucaryote ribosome 80S-ARNt_i^{Met} correctement positionné est maintenant prêt à commencer l'addition séquentielle des acides aminés par la traduction de l'ARNm suivant le cadre de lecture correct. Comme c'est le cas pour l'initiation, un groupe de protéines spéciales, appelées facteur d'élongation ou eEF (**eukaryotic Elongation Factors**), est nécessaire pour exécuter le processus d'élongation de la chaîne.

La phase d'élongation est composée de quatre étapes : (1) fixation de l'aminoacyl-ARNt sur le site A du ribosome par le facteur eEF-1A, par reconnaissance codon/anticodon (formation d'un complexe ternaire: eEF-1-aminoacyl-ARNt-ribosome) et hydrolyse de GTP lié à eEF-1A ; (2) recyclage de GDP/GTP au niveau de eEF-1A ; (3) formation de la liaison peptidique entre le groupement carboxylique COO⁻ de l'acide aminé n et le groupement NH₃⁺ de l'acide aminé n+1, catalysée par une enzyme peptidyl-transférase portée par la sous-unité ribosomique 60S ; et (4) translocation du peptidyl-ARNt sur le site P du ribosome par eEF2, consommant un GTP (Figure 31). Le site A du ribosome est alors libre pour accueillir un nouvel aminoacyl-ARNt chargé (Lodish et al., 2005).

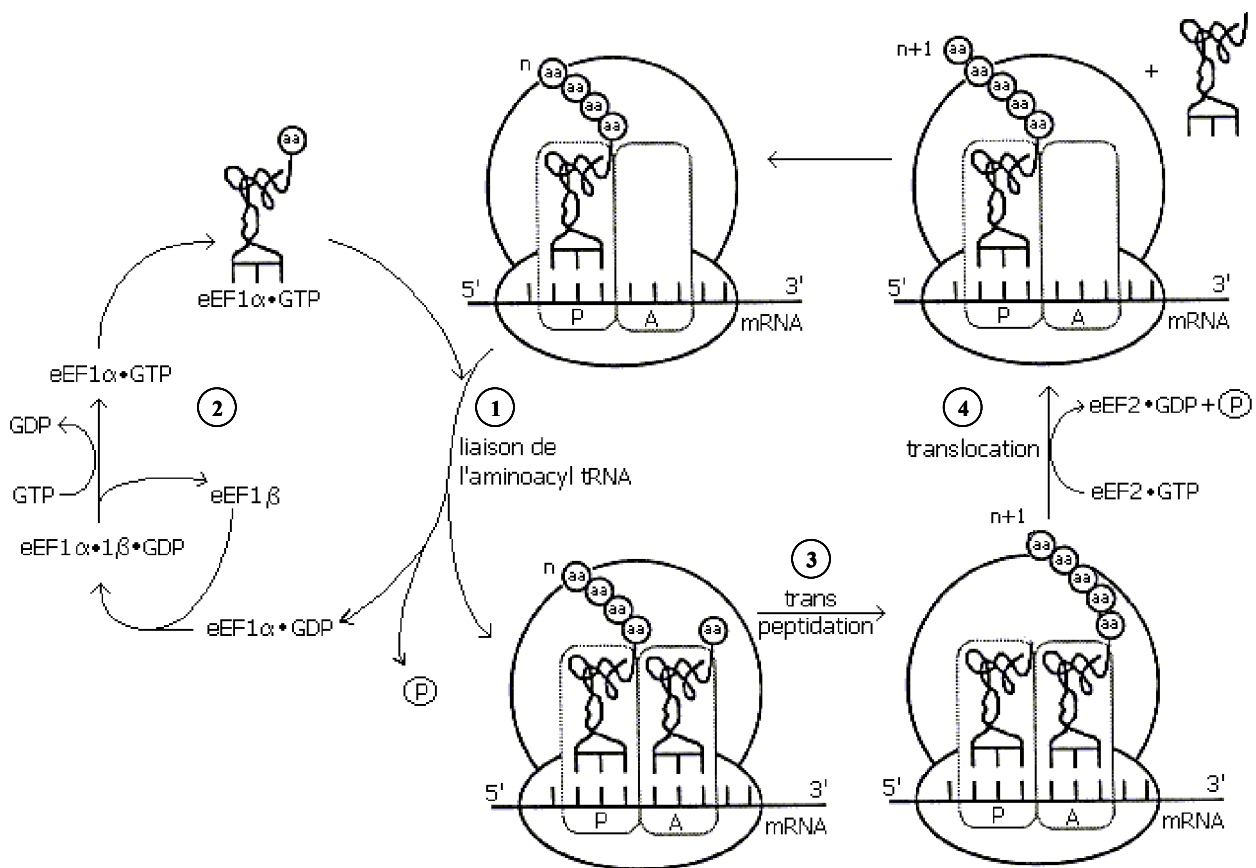


Figure 31 : Représentation schématique de la phase d'élongation de la traduction chez les eucaryotes. 1. L'aminoacyl-ARNt se lie sur le site A du ribosome *via* eEF-1A ; cette liaison nécessite l'hydrolyse du GTP lié à eEF-1A. 2. Recyclage du GDP en GTP au niveau d'eEF-1A. 3. Formation du pont peptidique. 4. Translocation du peptidyl-ARNt sur le site P du ribosome. eEF : eukaryotic Elongation Factor, ARNt : ARN de transfert (www.cours-de-biochimie.fr/traduction-arn-proteines.php#eucaryotes).

3. Etape de terminaison de la traduction

La dernière étape de la traduction, comme l'initiation et l'élongation, nécessite des signaux moléculaires hautement spécifiques qui décident du destin du complexe ARNm-ribosome-peptidyl-ARNt. Il existe deux types de protéines spécifiques, les facteurs de libération ou eRF (**eukaryotic Releasing Factors**). **eRF1** se fixe au site A du ribosome et reconnaît les codons stop. **eRF3** est une protéine qui fixe du GTP et le complexe eRF3-GTP agit de concert avec eRF1 pour déclencher le clivage du peptidyl-ARNt, libérant ainsi la chaîne protéique terminée. Après sa libération du ribosome, une protéine néosynthétisée adopte en se repliant sa **conformation tridimensionnelle** native, un processus facilité par d'autres protéines appelées **chaperones**. D'autres facteurs de libération provoquent ensuite la dissociation du ribosome, libérant ses sous-unités, l'ARNm et l'ARNt terminal pour un nouveau cycle de traduction (Lodish et al., 2005).

B. Implication du facteur eIF2B dans l'initiation de la traduction

Le facteur eIF2B a un rôle clé dans l'étape d'initiation de la traduction du fait de sa fonction d'activateur du facteur eIF2. La structure et les domaines fonctionnels de ce facteur protéique complexe sont importants pour son activité enzymatique hautement régulée d'échange du GDP en GTP au niveau d'eIF2.

1. Rôle du facteur eIF2B sur l'activation du facteur eIF2

Le facteur **eIF2** est un complexe multimérique constitué de **trois sous-unités** de masses moléculaires croissantes et exerçant chacune une fonction précise : eIF2 α , eIF2 β et eIF2 γ , codées respectivement par les gènes humains *EIF2S1* (14q24.1), *EIF2S2* (20pter-q12) et *EIF2S3* (Xp22.2-22.1). La sous-unité eIF2 α a un rôle dans la régulation par phosphorylation. Sa séquence en acides aminés présente un **site de phosphorylation au niveau de la sérine 51** (Ser⁵¹). Cette dernière est la cible de plusieurs kinases qui ont le rôle de réguler l'étape d'initiation de la traduction en cas de stress cellulaires, comme nous le verrons plus loin. La sous-unité eIF2 β contient un nombre important de sites de phosphorylation par les enzymes CK2 (caséine kinase 2), PKC (protéine kinase C) et PKA (protéine kinase AMPc-dépendante) (*pour revue*, Kimball, 1999). La sous-unité eIF2 γ

possède les caractéristiques canoniques d'un site de liaison au GTP et est également impliqué dans la liaison à l'ARNt_i^{Met} (Gaspar et al., 1994).

Le recyclage d'eIF2-GDP en eIF2-GTP est essentiel pour initier la synthèse protéique et cette activation est nécessaire entre chaque cycle d'initiation de la traduction. En effet, le complexe eIF2-GDP est incapable de lier l'ARNt_i^{Met}, probablement parce que la conformation d'eIF2 lié au GDP ne le permet pas, et est donc incapable d'initier la traduction. A la fin de l'étape d'initiation de la traduction, eIF2 est relâché du ribosome sous forme liée au GDP. Ce GDP doit ensuite être remplacé par du GTP pour permettre la formation d'un nouveau complexe ternaire. Etant donné que le facteur eIF2 a une forte affinité pour le GDP (Price et Proud, 1994), cette réaction doit être catalysée et c'est eIF2B qui remplit cette fonction en permettant l'échange de guanine (activité GEF) (Figure 32). Ceci est une des étapes limitantes de la traduction. Le complexe eIF2-GTP formé est instable jusqu'à ce qu'il rencontre l'ARNt_i^{Met} pour former le complexe ternaire (Erickson et al., 2001).

La quantité de ce facteur eIF2 semble évoluer au cours du développement : sa quantité, ainsi que l'activité du facteur eIF2B, diminuent avec l'âge dans le cerveau et le foie de rat (Kimball et al., 1992). Les facteurs eIF2B et eIF2 jouent donc un rôle important dans la synthèse protéique et interviennent dans les processus de régulation de l'étape d'initiation de la traduction au cours du développement.

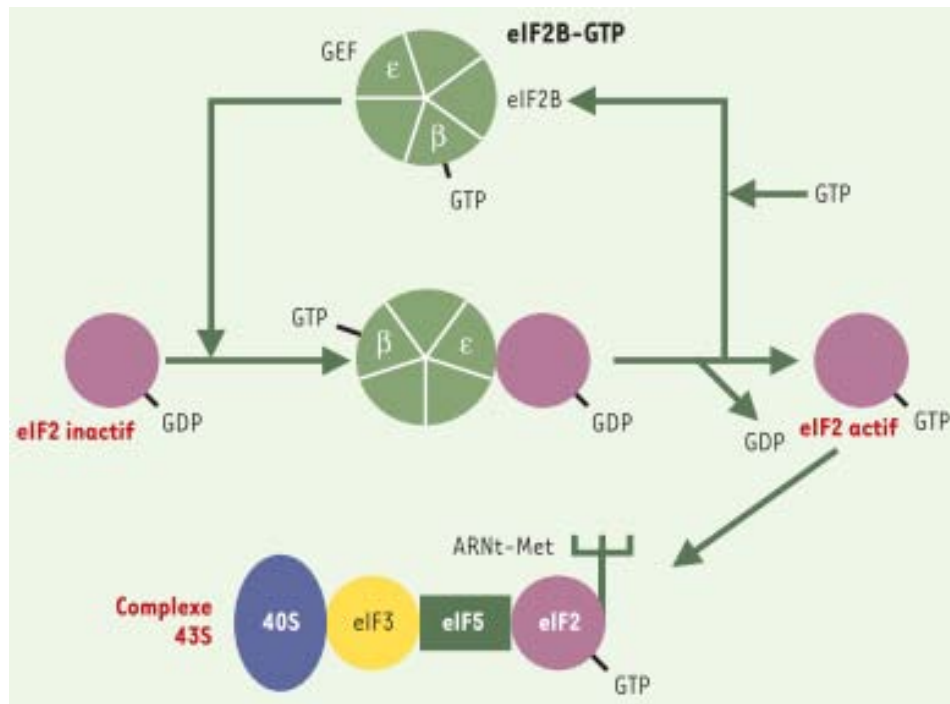


Figure 32 : Activation du facteur eIF2 par le facteur eIF2B lors de l'étape d'initiation de la synthèse protéique. Le facteur d'initiation de la traduction eIF2 (violet) est activé par échange du GDP en GTP grâce au facteur activé eIF2B-GTP (en vert, composé de cinq sous-unités différentes). La sous-unité eIF2B ϵ permet l'échange proprement dit du GDP en GTP (activité GEF: Guanine Exchange Factor), la sous-unité eIF2B β se lie au GTP. La forme activée eIF2-GTP se lie au complexe initiateur ARNt-méthionine, qui reconnaît spécifiquement le codon initiateur AUG de l'ARNm, et est inclus avec d'autres facteurs d'initiation et la molécule 40S ribosomale dans le complexe protéique d'initiation 43S (Fogli et al., 2003a).

2. Structure et domaines fonctionnels du facteur eIF2B

Le facteur eIF2B est un complexe protéique pentamérique constitué de cinq sous-unités relativement bien conservées de la levure à l'homme (Tableau 4). Chez les mammifères, il s'agit d'un complexe **hétéropentamérique** constitué des sous-unités eIF2B α , eIF2B β , eIF2B γ , eIF2B δ , eIF2B ϵ codées respectivement par les cinq gènes *EIF2B1* (12q24), *EIF2B2* (14q24), *EIF2B3* (1p36.23), *EIF2B4* (2p23) et *EIF2B5* (3q27). Chez la levure, les protéines correspondantes sont codées respectivement par les gènes *GCN3*, *GCD7*, *GCD1*, *GCD2* et *GCD6*. Chez la levure, chaque sous-unité, sauf eIF2B α , est essentielle à l'activité du facteur eIF2B. En effet, la délétion de l'une des quatre autres sous-unités est létale. L'analyse de la séquence de la sous-unité eIF2B α chez la levure a permis de mettre en évidence une

similarité de séquence avec eIF2B β et eIF2B δ dans leur partie C-terminale (Price et al., 1996b) suggérant une interaction de ces trois sous-unité pour réguler la fonction d'eIF2B. De la même manière, les protéines eIF2B γ et eIF2B ϵ présentent également des similarités de séquence entre elles et possèdent des motifs communs avec certaines enzymes ayant la particularité de lier les nucléotides (Price et al., 1996a), suggérant que le facteur eIF2B pouvait aussi avoir la capacité de lier de telles molécules. Les candidats potentiels pour cette liaison étaient les nucléotides adénine et guanine, ainsi que le Nicotinamide adénine dinucléotide / Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADH/NADPH), chacun pouvant agir comme régulateur allostérique d'eIF2B. En effet, une étude montra en 1988 que la sous-unité eIF2B β était impliquée dans la **liaison du GTP au facteur eIF2B** (Dholakia et Wahba, 1989).

Gène	<i>EIF2B1</i>	<i>EIF2B2</i>	<i>EIF2B3</i>	<i>EIF2B4</i>	<i>EIF2B5</i>
N° NCBI de l'ARN correspondant	NM001414	NM014239	NM020365	NM015636	NM003907
Nombre d'exons	9	8	11	13	16
Sous-unité protéique correspondant	eIF2B α	eIF2B β	eIF2B γ	eIF2B δ	eIF2B ϵ
N° NCBI de la sous-unité protéique	NP001405	NP055054	NP065098	NP751945	NP003898
Longueur de la sous-unité (en nombre d'acides aminés)	305	351	452	522	721
Homologie des sous-unités protéiques humaines avec celles de :					
<i>Mus musculus</i>	86%	94%	89%	79%	83%
<i>Rattus norvegicus</i>	85%	92%	88%	79%	83%
<i>Drosophila melanogaster</i>	46%	48%	34%	48%	29%
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	39%	32%	22%	36%	28%

Tableau 4 : Données concernant les cinq gènes humains *EIF2B* : correspondance protéique et homologies de séquences entre espèces.

De par cette homologie de séquence entre les sous-unités eIF2B α , eIF2B β et eIF2B δ d'une part, et eIF2B γ et eIF2B ϵ d'autre part, il a pu être montré chez la levure que les sous-unités eIF2B étaient capables de s'assembler en deux sous-complexes : le premier constitué de **eIF2B α , eIF2B β et eIF2B δ** étant le **sous-complexe régulateur** et le deuxième formé de **eIF2B γ et eIF2B ϵ** étant le **sous-complexe catalytique** (Figure 33) ; chacun pouvant se lier *in vitro* au facteur eIF2. Le sous-complexe régulateur se

lie à la forme phosphorylée d'eIF2 et n'a pas d'activité GEF (rôle régulateur sans activité). Tandis que le sous-complexe catalytique se lie de manière égale aux formes phosphorylées et non phosphorylées d'eIF2 et présente une **activité GEF** insensible au degré de phosphorylation d'eIF2 (rôle catalytique sans régulation possible) (Pavitt et al., 1997, 1998).

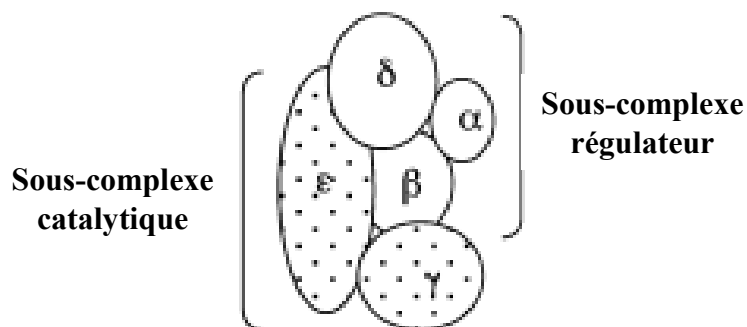


Figure 33 : Assemblage du complexe eIF2B. Le facteur eIF2B est composé d'un sous-complexe régulateur composé des sous-unités eIF2B α , eIF2B β et eIF2B δ et d'un sous-complexe catalytique composé des sous-unités eIF2B γ et eIF2B ϵ (Proud, 2005).

Il a été montré chez les mammifères que la sous-unité eIF2B ϵ , qui porte le domaine d'activité GEF, pouvait seule catalyser l'échange GDP/GTP. Mais cette activité est augmentée quand les autres sous-unités sont présentes, montrant que l'activité GEF optimale est celle mesurée quand les cinq sous-unités sont ensemble (Williams et al., 2001). Des études chez la levure ont permis d'identifier la région minimale contenant le domaine catalytique permettant à la fois l'activité d'échange du facteur eIF2B et la fixation du facteur eIF2. Cette région se situe à l'extrémité C-terminale du polypeptide et comprend les résidus 518 à 712 de *GCD6* (eIF2B ϵ) (Gomez et al., 2002). La présence de mutations faux-sens dans cette région réduit considérablement l'activité GEF du facteur eIF2B (Gomez et Pavitt, 2000). De plus, la liaison d'eIF2 au facteur eIF2B est nécessaire à son activité puisque la délétion des résidus 652 à 712 empêche à la fois la liaison stable d'eIF2 à eIF2B et l'activité GEF (Gomez et al., 2002).

La structure de ce domaine catalytique a été résolue chez la levure révélant la présence de huit hélices alpha et d'un résidu important : le glutamate en position 569 (E576 chez l'homme) très conservé entre les espèces (Boesen et al., 2004). Chez les mammifères, la région catalytique se trouve également au niveau de cette extrémité C-terminale (Anthony et al., 2000), (Figure 34).

A l'inverse, la partie N-terminale de la sous-unité eIF2B ϵ est nécessaire à son interaction avec les autres sous-unités, et notamment la sous-unité eIF2B β , pour une bonne

activité du complexe. En effet, des mutations faux-sens dans cette région affectent l'activité GEF sans pour autant altérer la liaison d'eIF2 (Gomez et Pavitt, 2000).

Au niveau du sous-complexe régulateur, des mutations dans une des trois sous-unités qui le compose altèrent la sensibilité de celui-ci à la régulation par la phosphorylation d'eIF2 α (Pavitt et al., 1998). Ce sous-complexe n'a pas d'activité GEF à lui seul, mais sa présence augmente l'activité du complexe eIF2B complet. La sous-unité eIF2B β intervient également dans la fixation du GDP/GTP (Dholakia et Wahba, 1989).

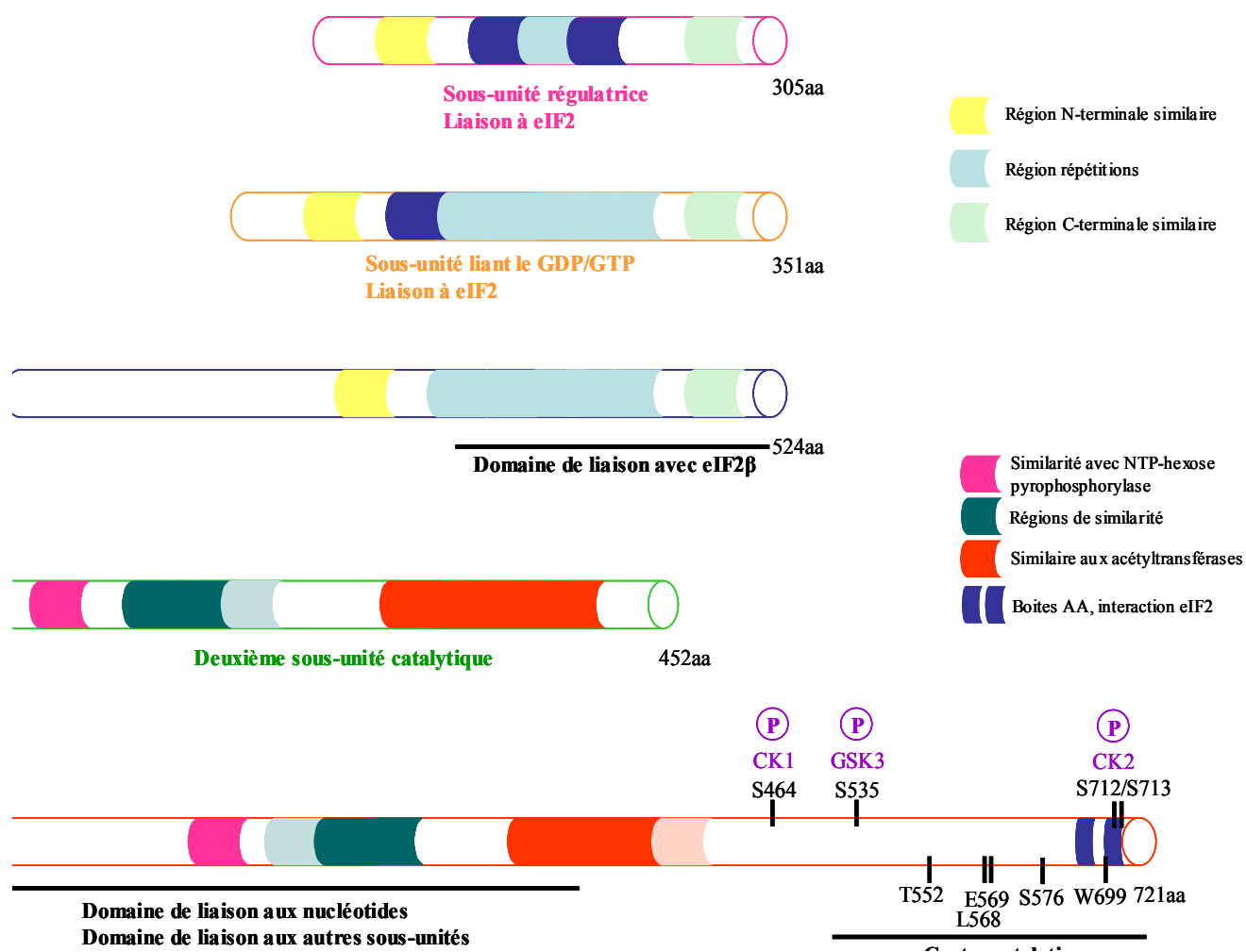


Figure 34 : Domaines fonctionnels des cinq sous-unités eIF2B, déduits à partir des séquences homologues de rat, homme et levure. Sx : sérine en position x, P : site de phosphorylation. La longueur des sous-unités est indiquée en nombre d'acides aminés. Les kinases catalysant les ajouts de groupement phosphate sont indiquées en violet. Les protéines sont regroupées selon leur homologie de séquence et leur appartenance à un sous-complexe. CK : Caséine Kinase, GSK3 : Glycogen Synthase Kinase 3. D'après Gomez et Pavitt, 2000; Anthony et al., 2000; Wang et al., 2001; Gomez et al., 2002; Mohammad-Qureshi et al., 2008.

C. Régulation de l'initiation de la traduction en cas de stress cellulaire

Le facteur eIF2B semble donc être le facteur clé limitant de la traduction et est la cible de divers contrôles, en particulier en réponse à des stress cellulaires. Alors qu'une large variété de traitements, tels que les hormones, et de facteurs de croissance ont été décrits comme activateur de la traduction, les conditions de **stress cellulaire** telles qu'une privation de nutriment, un choc thermique, ou encore un stress oxydatif **inhibent la synthèse protéique d'une manière générale**. L'exposition à de tels stress induit une réponse adaptative qui nécessite l'expression coordonnée de gènes spécifiques de la réponse au stress qui vont agir sur la survie cellulaire, l'apoptose, la progression du cycle cellulaire, ou encore la différenciation. La réduction générale de la synthèse protéique prévient, quant à elle, la synthèse de protéines malformées qui pourraient interférer avec la réponse au stress cellulaire. Paradoxalement, la réduction de la synthèse protéique globale est donc accompagnée à l'inverse de **l'activation de la traduction de gènes nécessaires à la survie de la cellule**.

1. Régulation directe du facteur eIF2B

a. Régulation allostérique

Divers mécanismes régulateurs allostériques ont été identifiés.

Il a été décrit l'**effet inhibiteur du NAD⁺ et du NADP⁺** sur l'activité des complexes eIF2B de mammifères (rat) purifiés alors que leurs formes réduites **NADH et NADPH la stimulent**. En effet, le facteur eIF2B lie du NADPH nécessaire à son activité (*pour revue*, Price et Proud, 1994). Karinch *et al.* ont démontré que l'activité d'eIF2B était réduite dans les muscles squelettiques mais pas dans le cœur de rats diabétiques, parallèlement à l'augmentation du ratio NADPH/ NADP⁺ dans le cœur uniquement, démontrant le fait que le NADPH empêche l'inhibition d'eIF2B dans ce tissu (Karinch *et al.*, 1993).

Un **site de liaison à l'ATP** a également été trouvé sur la séquence d'eIF2B et celui-ci aurait un **effet inhibiteur sur l'activité du facteur** (Kimball et Jefferson, 1995).

Des études ont montré que des **polyamines** ainsi que certains **sucre phosphorylés** (glucose-6-phosphate, fructose-6-phosphate et fructose 1,6-bis phosphate) sont impliqués dans **l'activation du facteur eIF2B** dans des lysats cellulaires (*pour revue*, Price et Proud, 1994).

Le **GTP** semble aussi être un **régulateur allostérique positif d'eIF2B**. L'activité d'échange GDP/GTP se fait en étroit lien avec l'état énergétique de la cellule (ratios

ATP/ADP et GTP/GDP) : un ratio GTP/GDP faible empêche la régénération du complexe ternaire et donc atténue la synthèse protéique.

b. Régulation par phosphorylation

Différentes protéines kinases vont pouvoir phosphoryler directement le facteur eIF2B au niveau de sa sous-unité eIF2Bε : CK1 et CK2 (Caséines Kinases 1 et 2), DYRK (Dual-specificity tyrosine phosphorylated and Regulated Kinase) et GSK3 (Glycogen Synthase Kinase 3).

Les enzymes **CK1** et **CK2** phosphorylent la sous-unité eIF2Bε *in vivo* et permettent ainsi d'augmenter l'activité GEF du facteur eIF2B. CK2 phosphoryle deux sérines conservées, les Ser⁷¹² et Ser⁷¹³ situés à l'extrémité C-terminale de la sous-unité eIF2Bε mammifère, permettant une activation cinq fois plus importante du facteur eIF2B (*pour revue*, Price et Proud, 1994), (Figure 33). Des études de mutagenèse dirigée ont montré que la mutation de ces résidus induisait une diminution de l'affinité de la sous-unité eIF2Bε pour le facteur eIF2, suggérant l'importance de la phosphorylation par CK2 dans la liaison entre eIF2B et eIF2. L'activité GEF du facteur eIF2B chez ces mutants est également abaissée de l'ordre de 25% par rapport à des cellules contrôles (Wang et al., 2001). CK1 phosphoryle la Ser⁴⁶⁴ qui est conservée dans les séquences eIF2Bε de mammifères mais qui ne semble pas intervenir dans la liaison d'eIF2B avec eIF2 (Wang et al., 2001).

DYRK phosphoryle la Ser⁵³⁹ sur la sous-unité eIF2Bε et agit ainsi comme une kinase d'amorçage pour permettre la phosphorylation de la Ser⁵³⁵ par GSK3 (Woods et al., 2001), (Figure 33).

L'activité de **GSK3** est régulée par l'insuline puisqu'en présence de cette molécule son activité est inhibée, eIF2B est ainsi déphosphorylé et la protéine est plus active. La phosphorylation du facteur eIF2B par GSK3 a un rôle dans l'apoptose puisque des cellules sur-exprimant un mutant eIF2Bε non phosphorylable sont protégées de l'apoptose induite par la surexpression de GSK3β (Pap et Cooper, 2002). Il existe en effet deux isoformes de GSK3 (GSK3α et GSK3β) qui sont, à leur tour, phosphorylées et inactivées au niveau de la Ser²¹ et de la Ser⁹ respectivement (Welsh et al., 1996).

c. Agrégation du facteur eIF2B en cas de choc thermique, rôle des HSP (Heat Shock Protein)

Scheper *et al.* ont montré que les complexes eIF2B formaient des agrégats *in vitro* dans des extraits hépatiques de rat exposés à des températures modérées (<44°C). Ces

résultats permettent d'émettre deux hypothèses sur le mécanisme d'inactivation du facteur eIF2B. Le premier mécanisme envisagé est une **inactivation directe d'eIF2B par la chaleur** (dénaturation). Le second mécanisme envisage l'**inactivation du facteur eIF2B par complexation avec des molécules thermo-protectrices**, dont le rôle serait de protéger eIF2B de la dénaturation thermique. Ce dernier mécanisme suggère un rôle des **HSP** dans le contrôle de l'activité eIF2B (Scheper et al., 1998). En effet, ces protéines HSP sont synthétisées en réponse à divers stress comme les chocs thermiques, des stimuli physiologiques (hormones, facteurs de croissance) ou physiopathologiques (infections, anoxie). Les HSP sont impliquées dans les fonctions essentielles de la cellule : certaines ont un rôle de chaperon (mise en place des repliements et assemblages corrects des protéines, protection de ces structures, repliement des protéines endommagées par un stress thermique par exemple), stimulent le système antioxydant (induction de la synthèse des enzymes de détoxification active des radicaux libres) et ont des propriétés cytoprotectrices et anti-apoptotiques.

2. Régulation par phosphorylation d'eIF2 α en réponse à un stress cellulaire

L'un des mécanismes les plus étudiés et conservés à travers l'évolution fait intervenir la phosphorylation de la sous-unité α du facteur eIF2. En réponse à divers stress, quatre protéines kinases peuvent être activées et vont phosphoryler la sérine 51 sur la sous-unité eIF2 α : i) **PKR** (Protéine Kinase R) qui est activée par les ARN double brin semblables à ceux produits lors de la réplication virale, elle provoque donc l'arrêt de la traduction dans les cellules infectées et empêche ainsi la multiplication virale ; ii) **HRI** (Heme-Regulated Inhibitor of translation) qui répond à une diminution de la concentration en hème, favorisant la régulation de la synthèse de globine dans les érythrocytes ; iii) **GCN2** (General Control Non-derepressible 2), activée par une déficience en acides aminés et enfin iv) **PERK** (PKR-like Endoplasmic Reticulum Kinase) qui répond à l'accumulation de protéines dénaturées dans le RE (*pour revue*, Proud, 2005). La phosphorylation du facteur eIF2 augmente son affinité pour le facteur eIF2B, bloquant son activité GEF et inhibant ainsi l'activation d'eIF2, la formation du complexe ternaire et aboutissant à une **inhibition de la synthèse protéique globale** (Krishnamoorthy et al., 2001). En parallèle, une réponse au stress est activée induisant l'**augmentation de la traduction d'ARNm** (réponse traductionnelle) ou de la transcription de gènes spécifiques (réponse transcriptionnelle) intervenants dans le rétablissement des conditions physiologiques ou dans l'apoptose (Figure 35) (*pour revue*, Holcik et Sonenberg, 2005).

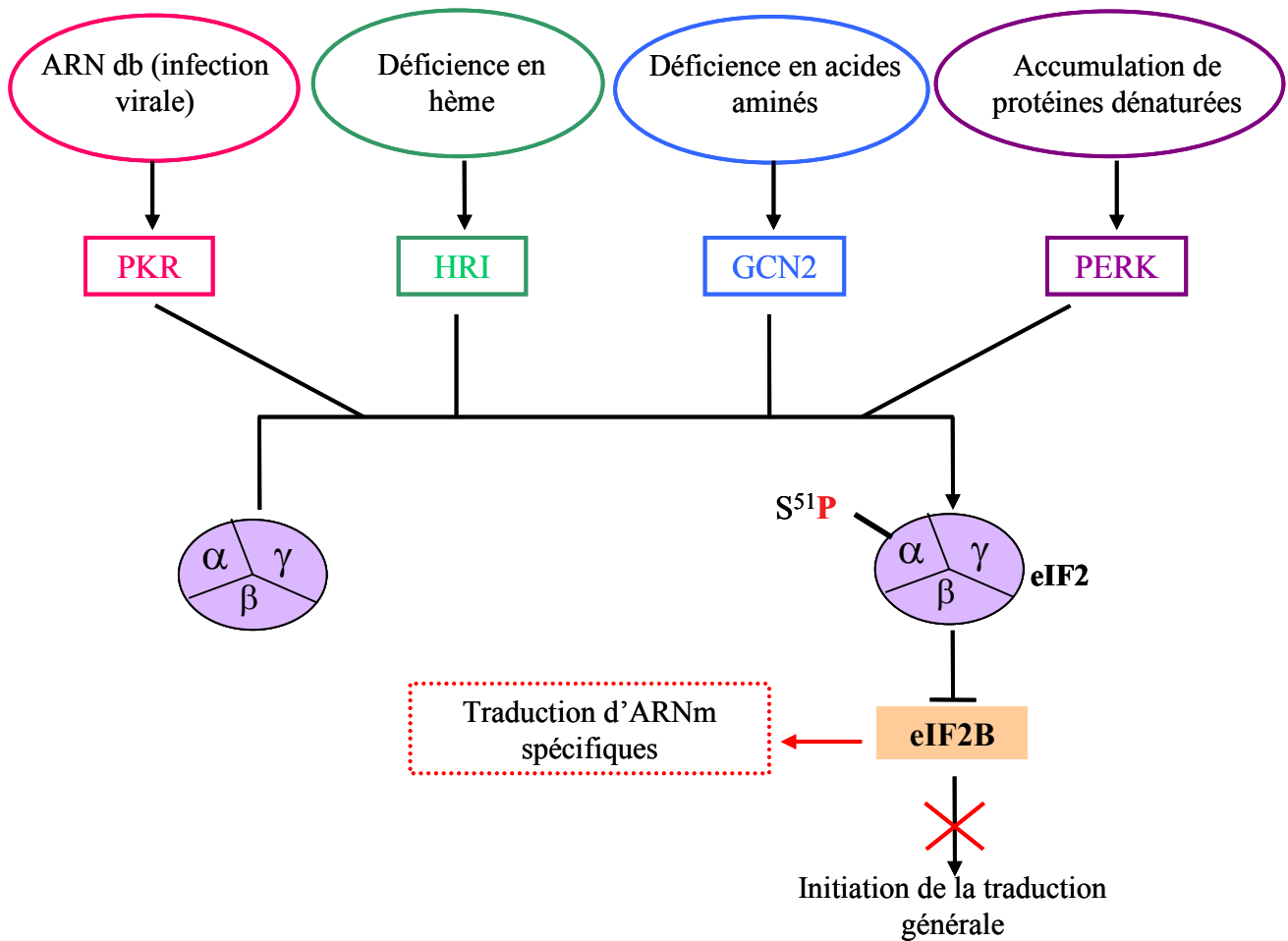


Figure 35 : Régulation de la traduction par différentes kinases en cas de stress cellulaire. Suite à différents stress, plusieurs protéines kinases (PKR : Protéine Kinase R, HRI : Heme-Regulated Inhibitor of translation, GCN2 : General Control Non-derepressible 2 et PERK : PKR-like Endoplasmic Reticulum Kinase) vont être activées et vont phosphoryler la sérine 51 de la sous-unité α du facteur eIF2. Cette phosphorylation induit une séquestration du facteur eIF2B, ce qui a pour conséquence d'inhiber son activité GEF. Cette inhibition entraîne, à son tour, une diminution du taux de complexe ternaire actif et cause ainsi une diminution de la traduction générale et parallèlement une augmentation de la traduction d'ARNm spécifiques. ARN db : ARN double brin.

Cette activation traductionnelle suite à un stress cellulaire a été décrite pour la première fois pour le gène *GCN4* chez la levure en réponse à une carence en acides aminés (Mueller et Hinnebusch, 1986). La région 5'UTR de *GCN4* contient quatre uORFs (upstream Open Reading Frames) ayant un rôle important dans le contrôle de la traduction de ce transcrit. Quand le niveau d'eIF2 α phosphorylé est faible, le ribosome initie la traduction à l'uORF1 et peut la ré-initier ensuite à l'uORF2, 3 ou 4. Par conséquent, l'initiation de la traduction ne se fera pas efficacement au niveau de l'ORF (Open Reading Frame) principal après la terminaison puisque les ribosomes vont avoir des difficultés à atteindre le codon d'initiation. Cependant, à de fort taux d'eIF2 α phosphorylé, peu de sous-unités ribosomales 40S vont pouvoir initier la traduction aux uORFs 2, 3 et 4, et, au lieu de cela, vont balayer la région 5' du transcrit jusqu'à atteindre le codon d'initiation au niveau de l'ORF principal de *GCN4* : c'est le mécanisme des IRES (Figure 36A). L'élévation d'expression de la protéine Gcn4p qui en résulte permet l'activation de la transcription de nombreux gènes permettant à la levure de s'adapter à la condition de privation imposée (*pour revue*, Holcik et Sonenberg, 2005).

De la même manière que *GCN4*, le gène humain *ATF4* (*Activating Transcription Factor 4*) code un activateur transcriptionnel. Il a ainsi été montré que la traduction de son messenger était activée après divers stress aboutissant à la phosphorylation d'eIF2 α tels que la déficience en acides aminés (activation de la kinase GCN2) et le stress du RE (activation de PERK) (Harding et al., 2000). La région 5'UTR du transcrit *ATF4* contient deux uORFs dont le deuxième chevauche avec l'ORF majeur et inhibe donc la traduction d'*ATF4*. Quand le nombre de complexes de pré-initiation de la traduction est abondant (c'est-à-dire quand le niveau de phosphorylation d'eIF2 α est faible), le ribosome traduit à l'uORF2. A l'inverse, à des niveaux faibles de complexe ternaire (dû à de forts taux de phosphorylation d'eIF2 α), le ribosome balaye l'uORF2 et initie la traduction au codon d'initiation d'*ATF4* (Vattem et Wek, 2004; Lu et al., 2004), (Figure 36B).

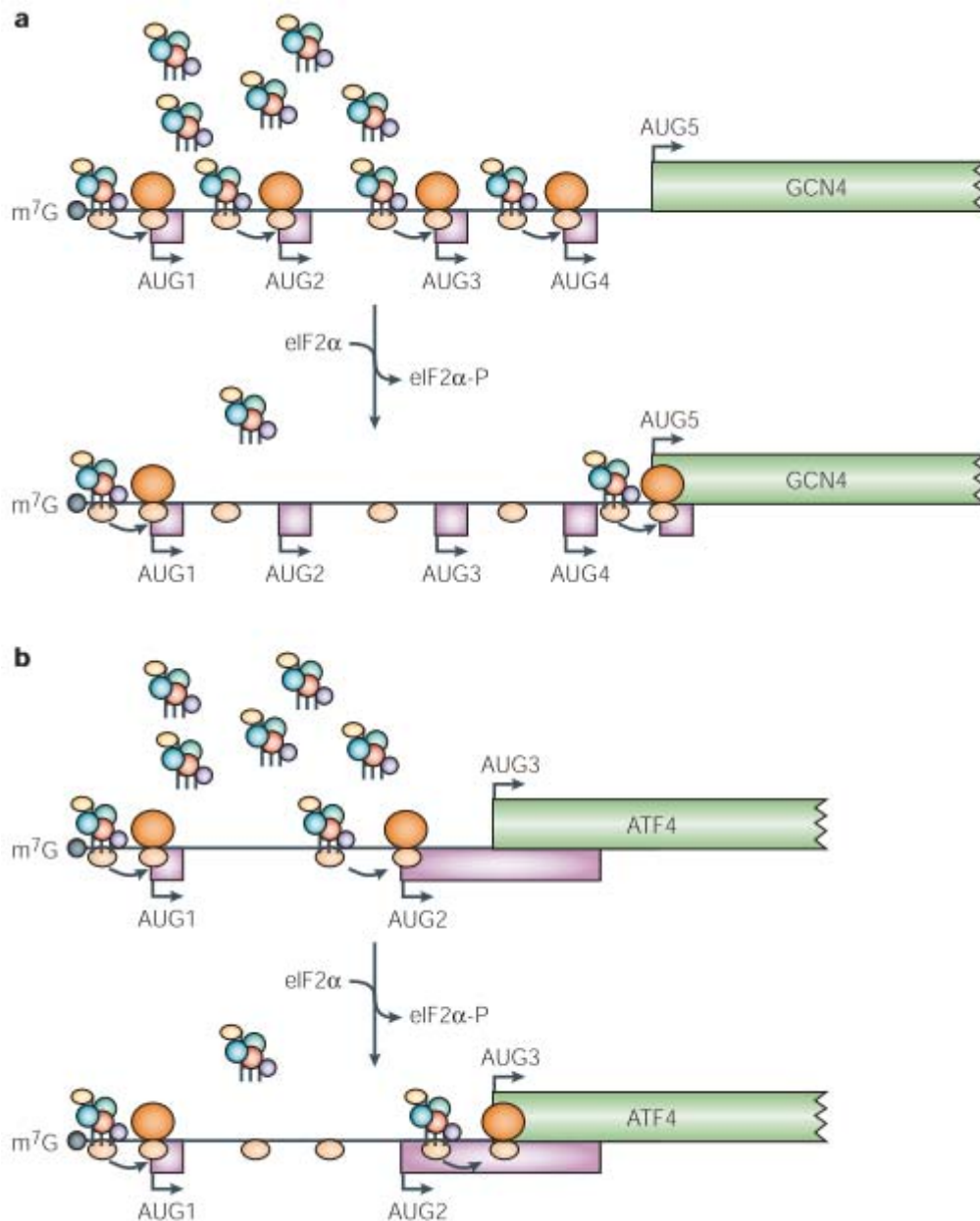


Figure 36 : Eléments régulateurs dans la région 5' des ARNm impliqués dans la traduction sélective. a) La traduction de l'activateur transcriptionnel GCN4 (General Control Non-derepressible 4) chez la levure est régulée par quatre uORFs (upstream Open Reading Frames). **b)** Celle d'ATF4 (*Activating Transcription Factor 4*) chez les mammifères est régulée par deux uORFs dont le deuxième chevauche avec l'ORF majeur codant ATF4 (Holcik et Sonenberg, 2005).

3. Cas particulier du stress du RE : la réponse UPR

Chez les eucaryotes supérieurs, la translocation de presque toutes les protéines à travers la membrane du RE intervient co-traductionnellement et est dirigée par un peptide signal N-terminal. De plus, la particule de reconnaissance du signal (SRP) se lie et impose l'arrêt de l'élongation de la traduction jusqu'à ce que le ribosome s'encre à la membrane du RE. La liaison de SRP à son récepteur et le transfert du polypeptide dans le RE à travers le canal membranaire Sec61 annule le blocage de l'élongation de manière à ce que le polypeptide soit simultanément synthétisé et transloqué à travers la bicouche lipidique. Ce mécanisme empêche une localisation incorrecte du polypeptide dans le cytosol. Seuls les polypeptides conformés et assemblés correctement dans le RE peuvent transiter vers l'appareil de Golgi. Les protéines mal conformées dans le RE sont retenues et éventuellement re-transloquées dans le cytosol par le canal Sec61 pour être dégradées par le protéasome 26S. Les protéines sont alors déglycosylées par une activité N-glyconase, ubiquitinylées puis dégradées (pour revue, Kaufman, 2004). Dans certaines conditions cellulaires, des protéines de conformation anormale s'accumulent dans le RE et induisent la **réponse UPR**. Chez les mammifères, la réponse UPR inclut une activation de la transcription de gènes cibles et une profonde inhibition de la traduction, ce qui **augmente les capacités de repliement et de dégradation et limite l'arrivée de nouvelles protéines dans le RE**. Les voies de signalisation intracellulaire déclenchées par ce stress sont très originales : elles activent des protéines transmembranaires du RE et mettent en jeu un épissage non conventionnel d'un ARN messenger. Lorsque cette réponse adaptative est insuffisante, une réponse apoptotique est déclenchée.

a. Activation de la transcription

Pour revue, Garlatti et Barouki, 2002; Forman et al., 2003; Malhotra et Kaufman, 2007.

Chez les mammifères, la réponse transcriptionnelle à un stress du RE met en jeu deux voies de signalisation impliquant deux familles de protéines transmembranaires : les protéines **IRE1** (Inositol-Requiring protein 1) et **ATF6** (Activating Transcription Factor 6).

Deux protéines IRE1 ont été identifiées chez l'homme et la souris : IRE1 α , exprimée de manière ubiquitaire, et IRE1 β spécifique de l'épithélium digestif. Ces protéines transmembranaires du RE sont douées d'activités kinase et endoribonucléase dans leur partie cytoplasmique, ce sont des sérine/thréonine kinases. Le domaine N-terminal de ces protéines, en collaboration avec le chaperon **GRP78/BiP** (Glucose-Regulated Protein 78 kDa / Binding Protein), est impliqué dans le déclenchement de la réponse UPR. Ainsi, en l'absence de

protéines dénaturées, le chaperon GRP78/BiP est présent à l'état basal dans le RE ; il interagit avec le domaine intraluminal d'IRE1 et maintient cette protéine à l'état de monomère inactif. Lorsque des protéines incorrectes sont formées dans le RE, elles sont reconnues par la protéine chaperone GRP78/BiP qui doit pour cela se dissocier des protéines IRE1. Les protéines IRE1 libérées peuvent s'oligomériser, ce qui stimule leur activité kinase et conduit à leur autophosphorylation en trans. L'activité endoribonucléasique des IRE1 aura pour rôle d'épisser certains ARNm tels que le facteur de transcription **XBPI** (X-box Binding Protein 1). En effet, l'expression du transcrit *XBPI* épissé est fortement induite par le stress du RE et cet ARNm est plus court de 26 bases en situation de stress du RE (Figure 37). La protéine XBPI épissée, alors puissant facteur de transcription, se lie sur les séquences ERSE (Elément de Réponse au Stress du RE) des promoteurs cibles de l'UPR et induit leur expression. Les gènes activés sont ceux intervenant dans le repliement des protéines (*GRP78/BiP*, *PDI* : *Protein Disulfide Isomerase*, *GRP94* : *Glucose-Regulated Protein 94 kDa*), le trafic intracellulaire au sein de la voie sécrétrice ou la dégradation des protéines incorrectes.

La caractérisation de la voie de signalisation UPR chez les mammifères a été aussi réalisée par l'étude des facteurs de transcription se liant aux promoteurs des gènes cibles. Il a été ainsi montré que les facteurs de transcription ATF6 appartenant à la famille ATF-CREB (Activating Transcription Factor/cAMP Response Element-Binding) activent les gènes cibles lors d'un stress du RE. Ainsi, à l'état basal, les protéines ATF6 α et ATF6 β sont exprimées de manière constitutive sous forme de précurseurs transmembranaires du RE. Comme pour IRE1, la libération d'ATF6 de son chaperon sera provoquée par un stress du RE. Cette dissociation va induire la translocation d'ATF6 dans l'appareil de Golgi dans lequel elle sera séquentiellement clivée par la protéase S1P (Site-1 Protéase) et la protéase S2P (Site-2 Protéase). Les domaines cytoplasmiques libérés, p50ATF6 α et p60ATF6 β , composés de domaines de liaison à l'ADN et d'activation de la transcription, sont capables de migrer vers le noyau et d'induire les gènes cibles (Figure 37).

Un lien très fort existe entre ces deux voies puisqu'en cas de stress du RE, les facteurs ATF6 se lient au promoteur du gène *XBPI* pour activer sa transcription (Figure 37).

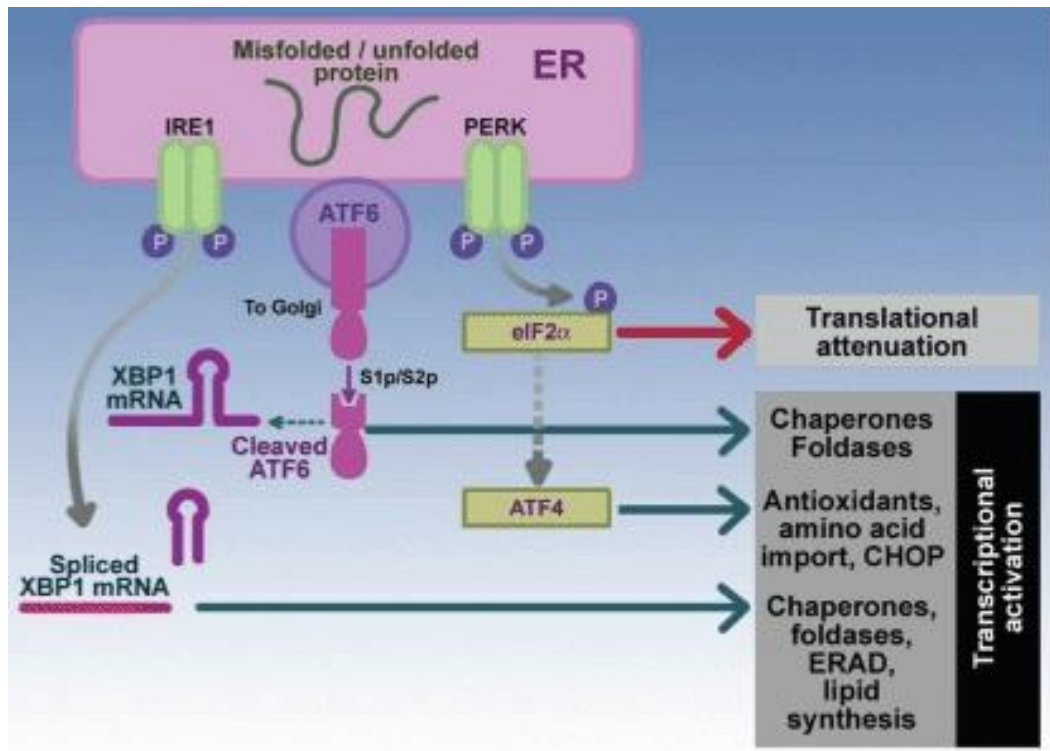


Figure 37 : Voies de signalisation principales impliquées dans la réponse UPR (Unfolded Protein Response). La réponse UPR est régulée de manière coordonnée par trois « senseurs » : IRE1 (Inositol Requiring kinase 1), ATF6 (Activating Transcription Factor 6) et PERK (PKR-like Endoplasmic Reticulum kinase) dont l'activation va mettre en jeu trois voies de signalisation. L'activation coordonnée de ces voies de signalisation permettra une réponse adaptée à l'intensité du stress. ERAD : ER-Associated protein Degradation, S1p/S2p : site-1 et site-2 protéases, CHOP : C/EBP Homologous Protein, XBP1 : X-box binding protein 1, ATF4 : Activating Transcription Factor 4 (Pandol et al., 2011).

a. Inhibition de la traduction

Pour revue, Dever, 2002; Ron, 2002; Proud, 2005; Holcik et Sonenberg, 2005.

La réponse UPR chez les mammifères engendre aussi une inhibition rapide et transitoire de la traduction. Ce blocage général de la traduction a pour but de diminuer l'afflux de protéines dans le RE afin d'en éviter la surcharge. L'inhibition de la traduction se fait par l'intermédiaire d'une troisième protéine transmembranaire du RE, **PERK** (Figure 37). PERK possède des homologies structurales avec les protéines IRE1 α et IRE1 β et le mécanisme d'activation de l'activité kinase de PERK est similaire à celui de ces protéines. En effet, les domaines N-terminaux intraluminaux de ces protéines sont interchangeables et interagissent avec GRP78/BiP. Ainsi, au cours d'un stress du RE, PERK est libérée du chaperon BiP ; elle peut alors s'oligomériser et s'autophosphoryler en trans. PERK appartient à la famille des kinases capables de phosphoryler la sous-unité α du facteur général d'initiation de la traduction eIF2. Ces kinases sont activées en réponse à des stress cellulaires variables, mais, dans tous les cas, la phosphorylation d'eIF2 α sur le résidu sérine 51 empêche la formation du complexe de pré-initiation de la traduction et donc l'interaction de l'ARNm avec la sous-unité 40S du ribosome. De par son mécanisme, l'inhibition de la traduction devrait toucher l'ensemble des protéines cellulaires, mais certaines protéines semblent échapper à cette régulation. En effet, comme cité précédemment, un travail portant sur le facteur transcriptionnel ATF4 montre que la traduction de son messager est activée par le stress du RE (Harding et al., 2000). Les sites de liaison du facteur ATF4, décrit comme étant à la fois un activateur ou un répresseur transcriptionnel, sont présents au niveau des promoteurs de nombreux gènes, la plupart étant impliqués dans les réponses aux stimuli environnementaux. Ainsi ATF4 va activer un autre facteur de transcription : **CHOP** (*C/EBP Homologous Protein*), qui contrôle l'expression de gènes cibles stress-dépendants impliqués dans la mort cellulaire programmée ou la régénération d'organes. ATF4 active aussi le gène **GADD34** (*Growth Arrest and DNA Damage induced gene 34*), connu comme étant un activateur de PP1 (Protéine Phosphatase 1) ayant un rôle dans la déphosphorylation du facteur eIF2. ATF4 active également la transcription de gènes ayant une fonction dans le métabolisme et le transport des acides aminés comme l'*Asparagine synthétase (ASNS)*, dans les réactions d'oxydo-réduction intervenant dans la résistance au stress oxydatif, et dans la biosynthèse du glutathion (Figure 38).

Le syndrome de **Wolcott-Rallison**, une maladie autosomique récessive caractérisée par l'apparition précoce durant l'enfance d'un diabète, est causée par des mutations du gène **PERK** (*EIF2AK3*) (Delépine et al., 2000).

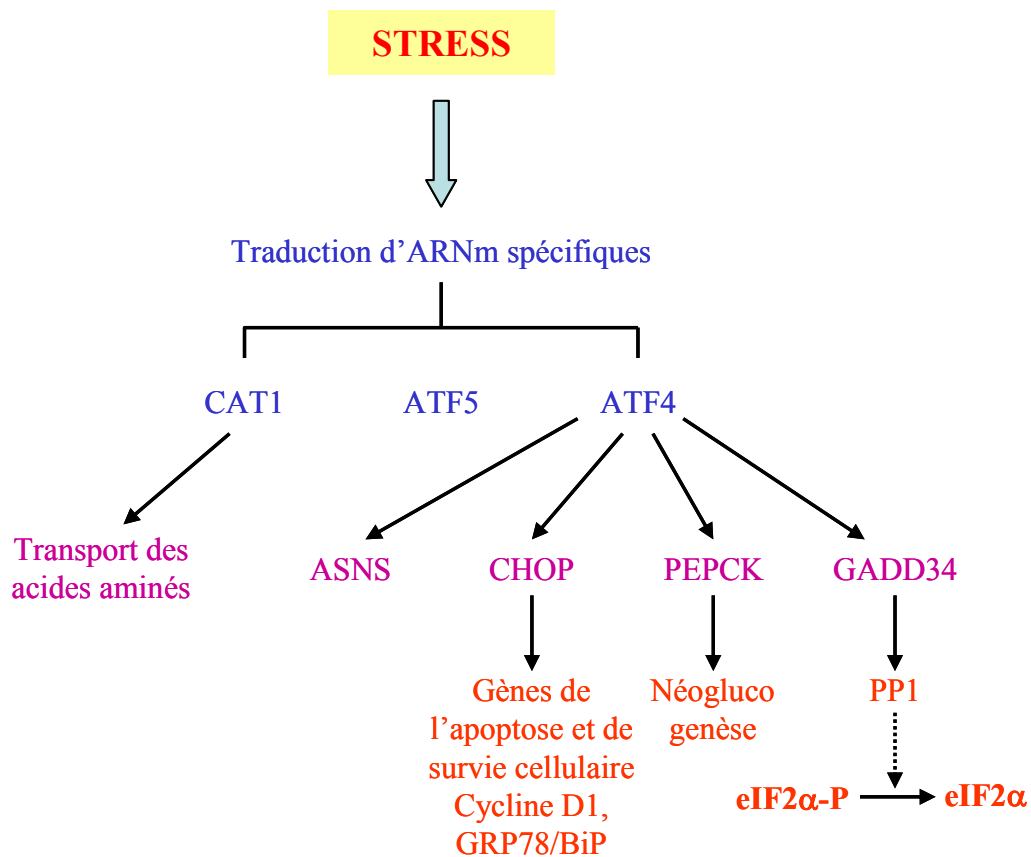


Figure 38 : Cascade du stress cellulaire. En cas de stress cellulaire, il y aura traduction d'ARNm spécifiques tels qu'*ATF4* (*Activating Transcription Factor 4*) et *CAT1* (*Cationic Amino acid Transporter 1*) qui vont induire une cascade de réponse du stress. La traduction de *CAT1* va permettre de récupérer les acides aminés essentiels à la cellule et ainsi permettre sa survie. *ATF4* va agir comme activateur transcriptionnel sur les gènes stress-dépendants : *ASNS* (*Asparagine Synthetase*), *CHOP* (*C/EBP HOMologous Protein*), la kinase *PEPCK* (*Phospho-Enol-Pyruvate Carboxylase Kinase*) et *GADD34* (*Growth Arrest and DNA Damage induced gene 34*). *CHOP* va ensuite activer la transcription de gènes de l'apoptose ou de survie cellulaire tels que la *Cycline D1* et *GRP78/BiP* (*Glucose-Regulated Protein 78 kDa/Binding Protein*). La kinase *PEPCK* va intervenir dans la néoglucogénèse pour permettre la survie cellulaire. Enfin, *GADD34* va activer la phosphatase *PP1* (Protein Phosphatase 1) qui va venir déphosphoryler la sous-unité α du facteur *eIF2* permettant ainsi un retour à un état normal. Le stress reste donc un état transitoire dans la cellule. *ATF5* : Activating Transcription Factor 5.

VI. Physiopathologie des eIF2B-pathies

A. Diminution de l'activité GEF dans les eIF2B-pathies

Il a été montré que les mutations affectant le centre catalytique de la sous-unité eIF2B ϵ sont responsables d'une **diminution importante de l'activité GEF** du facteur eIF2B, soit en affectant directement cette activité intrinsèque, soit en modifiant l'interaction eIF2-eIF2B (Mohammad-Qureshi et al., 2008).

La première étude démontrant l'effet des mutations du facteur eIF2B dans des cellules humaines a été réalisée en transfectant des cellules de rein humaines HEK293 avec des formes mutantes de la sous-unité eIF2B ϵ (mutations p.Thr91Ala et p.Trp628Arg) et de la sous-unité eIF2B β (mutation p.Val316Asp) (Li et al., 2004). Il a ainsi pu être démontré que ces mutants induisaient différents phénomènes tels qu'un **défaut d'assemblage du complexe eIF2B** ou encore une **diminution de la capacité du facteur eIF2B à se lier à eIF2**, entraînant dans tous les cas une diminution de son activité GEF.

Enfin, une étude de dosage de l'activité GEF a été réalisée dans les lymphocytes immortalisés par le virus Epstein-Barr (EBV), ou Ilb, de 30 patients porteurs de mutations dans les sous-unités eIF2B β à eIF2B ϵ en comparaison avec 10 des parents hétérozygotes sains et 22 contrôles sains non mutés (Fogli et al., 2004b). Ceci a permis de mettre en évidence une diminution significative de 20 à 70% de cette activité spécifiquement dans les Ilb des patients mutés à l'état homozygote ou hétérozygote composite (Figure 39A) sans modification d'expression d'eIF2 α ni de sa forme phosphorylée (Figure 39C). Une corrélation entre le taux d'activité GEF et la sévérité de la maladie a également pu être mise en évidence (Figure 39B). En effet, les taux d'activité GEF les plus faibles sont observés dans les Ilb des patients ayant un âge de début de la maladie inférieur à 2 ans. De manière intéressante, les Ilb des parents hétérozygotes sains présentent une activité normale suggérant que cette pathologie diffère des maladies métaboliques enzymatiques classiques pour lesquelles une diminution d'activité enzymatique de moitié est généralement observée pour les individus hétérozygotes.

La mesure de l'activité GEF réalisée dans des Fbs primaires de patients CACH/VWM n'a pas permis de mettre en évidence une diminution de cette activité (Kantor et al., 2005).

Ces études d'activité du facteur eIF2B dans les Ilb soulignent donc l'intérêt potentiel de ce test enzymatique dans le cadre d'aide au diagnostic des eIF2B-pathies et permettent également de poser des hypothèses physiopathologiques. En effet, les mutations du facteur eIF2B, facteur impliqué dans la régulation de la traduction protéique au cours d'un stress,

pourraient expliquer le rôle déclenchant et aggravant de facteurs environnementaux comme les infections virales ou les traumatismes crâniens. Les mutations du facteur eIF2B, en diminuant l'activité GEF, iraient ainsi à l'encontre du mécanisme protecteur visant à diminuer, lors du stress cellulaire, la synthèse de protéines dénaturées dans le RE. Cela pourrait expliquer en partie la susceptibilité au stress que semblent développer les patients atteints d'eIF2B-pathie.

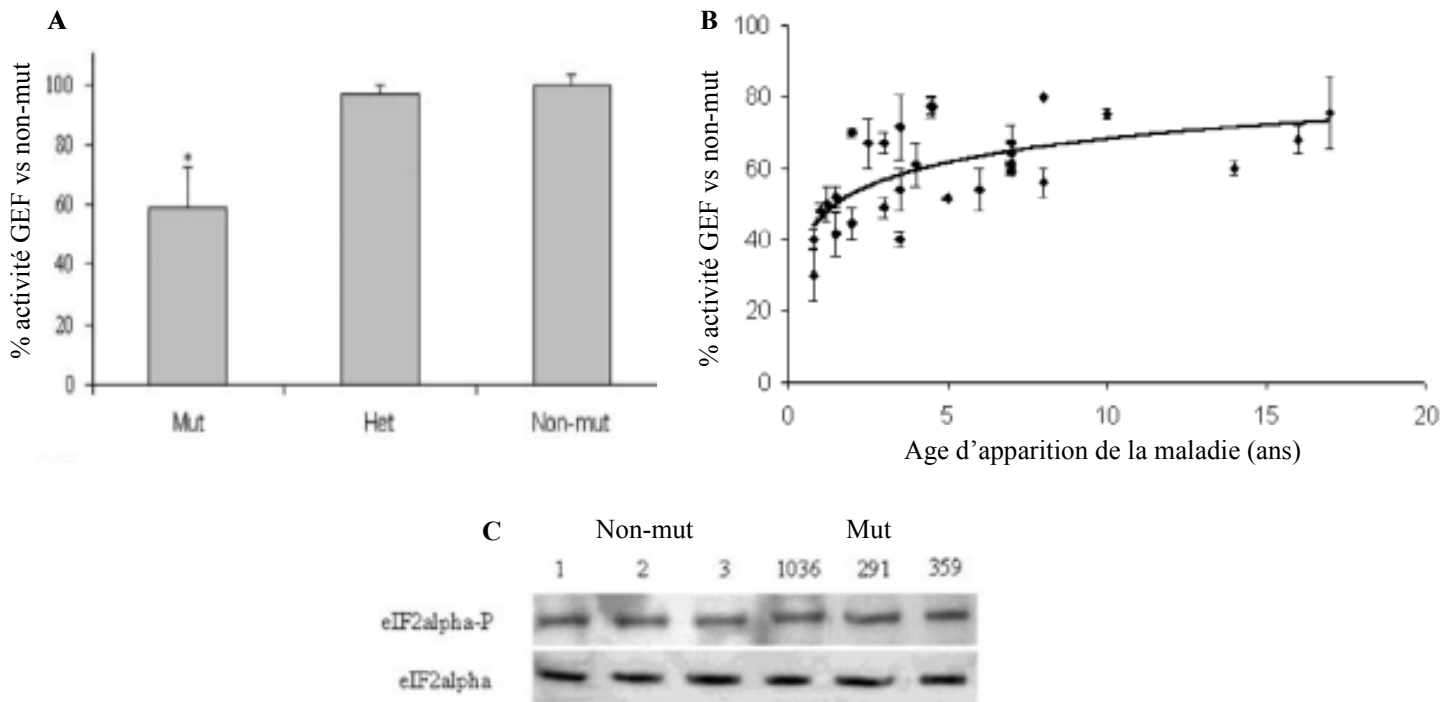


Figure 39 : A. Diminution de l'activité GEF (Guanine Exchange Factor) du facteur eIF2B dans les lymphoblastes (llb) d'une cohorte de 30 patients atteints d'eIF2B-pathie (Mut). Les parents hétérozygotes (Het) ainsi que les sujets contrôles (Non-mut) non porteurs de mutations du facteur eIF2B ont une activité GEF normale. B. Corrélation entre l'âge de début de la maladie et le taux d'activité GEF. Les patients ayant un âge de début de la maladie avant 2 ans ont tous une activité GEF faible (<50%). Par contre, les patients ayant un âge de début de la maladie >2 ans ont des taux d'activité GEF très variables allant de 40 à 80%. C. Quantité de facteur eIF2alpha et eIF2alpha phosphorylé (eIF2alpha-P) dans les llb de trois patients eIF2B mutés (Mut) en comparaison de trois contrôles sains (Non-mut) associés en âge et en sexe. D'après Fogli et al., 2004b.

B. Activation de la réponse au stress (UPR) dans les eIF2B-pathies

Le facteur eIF2B intervient dans la régulation de l'initiation de la traduction en cas de stress cellulaire. Divers stress induisent l'activation de kinases qui ont la capacité de phosphoryler la sous-unité α du facteur eIF2. La forme phosphorylée d'eIF2 devient ainsi un inhibiteur compétitif du facteur eIF2B, ce qui bloque son activité GEF. Cette inhibition de l'activité GEF conduit à une réduction de la synthèse protéique globale. Les mutations du facteur eIF2B entraînant une diminution de l'activité GEF du facteur eIF2B, de nombreuses études se sont ainsi focalisées sur les conséquences fonctionnelles d'une telle diminution sur la synthèse protéique mais aussi sur la réponse au stress cellulaire dans des modèles cellulaires et tissulaires (cerveaux) de patients atteints.

Compte tenu du rôle du facteur eIF2B dans la régulation du stress cellulaire et des données cliniques indiquant une dégradation neurologique des patients suite à divers stress, il a été proposé que les cellules porteuses de mutations du facteur eIF2B aient potentiellement une sensibilité accrue aux stress. Alors que le taux de synthèse protéique globale ne semble pas différer dans des cellules humaines eIF2B-mutées en comparaison de cellules non mutées en réponse à un stress cellulaire (Kantor et al., 2005; van Kollenburg et al., 2006), une augmentation accrue de l'expression de certains gènes spécifiques de la réponse au stress est détectée spécifiquement dans les cellules mutées. En effet, de récentes études ont montré que la réponse UPR, déclenchée en cas de stress et visant à éviter les surcharges de protéines dénaturées au niveau du RE, était activée de façon anormale (**augmentation d'expression d'ATF4 et de CHOP**) exclusivement dans la SB de cerveaux de patients atteints d'eIF2B-pathie et de manière prédominante dans les OLs et les astrocytes (van der Voorn et al., 2005). De la même manière, une activation d'ATF4 et de CHOP a pu être mise en évidence dans des Fbs de patients eIF2B-mutés en réponse à un stress cellulaire (privation de sérum ou traitement à la thapsigargine qui inhibe l'entrée de calcium dans le RE en bloquant une pompe calcique ATPase-dépendante entraînant donc un stress du RE) (Kantor et al., 2005). Une réponse anormale à la tunicamycine, qui bloque la première étape de la synthèse des glycoprotéines entraînant donc un stress du RE, a également été observée dans une lignée oligodendrogliale de rat DDR1 exprimant le gène *EIF2B5* humain muté (Kantor et al., 2008).

La mort par apoptose inappropriée des OLs aux stades précoces de la pathologie (Brück et al., 2001) pourrait résulter d'un déséquilibre dans l'activation de l'UPR, la diminution de l'activité GEF d'eIF2B pouvant conduire à une activation exagérée de la voie

PERK-CHOP, prédisposant ainsi les cellules à l'apoptose. De plus, l'augmentation d'expression d'ATF4 et de sa cible GADD34 pourrait donner lieu à une inhibition insuffisante de la synthèse protéique en réponse à un stress, conduisant à l'accumulation de protéines malformées dans le RE. La balance entre l'expression de GADD34 et celle de CHOP souligne les événements à la fois **anti-** et **pro-apoptotiques** observés dans les OLs des patients eIF2B-mutés (Van Haren et al., 2004) (Figure 40).

Etant donné l'importance des OLs et leurs fonctions hautement spécialisées dans la constitution de la gaine de myéline (ils doivent synthétiser environ 10^5 protéines spécifiques de la myéline par minute), il n'est pas très étonnant que ceux-ci soient très sensibles au stress du RE.

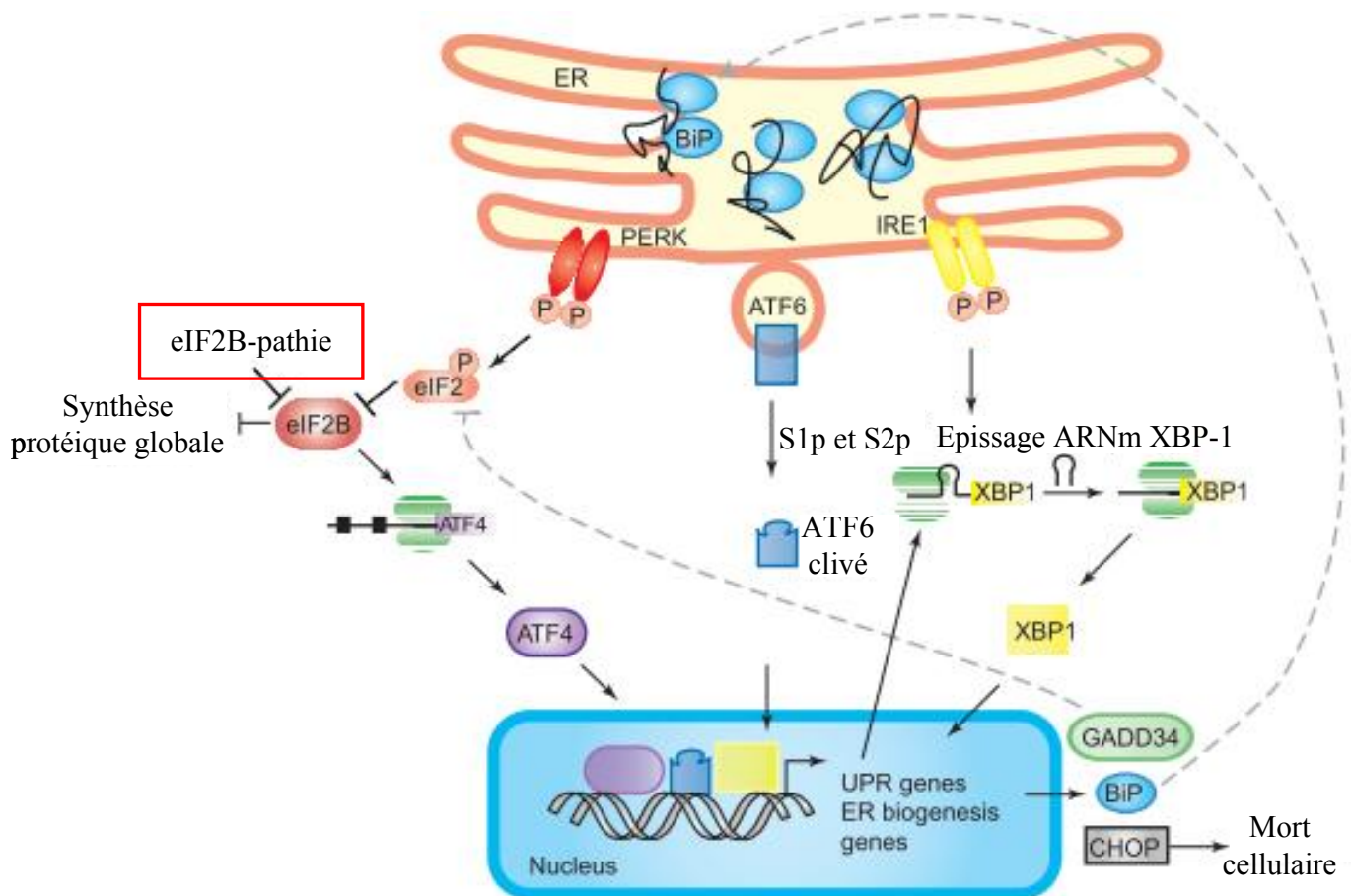


Figure 40 : La réponse UPR (Unfolded Protein Response) dans les eIF2B-pathies. Les mutations eIF2B entraînent une activation de la voie PERK (PKR-like Endoplasmic Reticulum Kinase) et donc une activation d'ATF4 (Activating Transcription Factor 4) conduisant à une augmentation d'expression de GADD34 (Growth Arrest and DNA Damage induced gene 34) et CHOP (C/EBP homologous protein) envoyant des signaux à la fois anti- et pro-apoptotiques à la cellule. IRE1 : Inositol Requiring kinase 1, ATF6 : Activating Transcription Factor 6, S1p/S2p : site-1 et site-2 protéases, XBP1 : X-box binding protein 1. D'après Scheper et al., 2006.

C. Trouble de l'ontogenèse des cellules gliales dans les eIF2B-pathies

Bien que le facteur eIF2B soit un complexe ubiquitaire, ses mutations affectent principalement la SB du SNC comme cela a été observé dans les analyses neuropathologiques (augmentation du nombre d'OLs d'aspect spumeux, voir paragraphe IV.C.). Toutefois, les caractéristiques cliniques associées aux formes les plus sévères des eIF2B-pathies montrent que ces mutations peuvent affecter d'autres tissus comme l'œil, le foie et le pancréas. De plus, chez certaines femmes atteintes de formes plus modérées, une dysgénésie ovarienne est observée (voir paragraphe IV.E.1.). Toutes ces caractéristiques ont permis d'émettre l'hypothèse que les mutations eIF2B pouvaient avoir des conséquences sur le développement, en particulier sur celui de la SB du SNC.

Une première réponse a été apportée par **Dietrich *et al.* en 2005**. En effet, les auteurs ont établi un système expérimental permettant de tester l'effet des mutations eIF2B sur les populations neurales en réalisant des cultures de cellules possédant des caractéristiques de précurseurs neurales à partir de différentes régions cérébrales (corps calleux (CC), cortex frontal, ZV latérale) d'un patient CACH/VWM décédé à l'âge de 12 ans (mutations hétérozygotes p.Thr91Ala et p.Trp628Arg dans la sous-unité eIF2Bε). Les cellules dérivées ont été cultivées dans des conditions permettant la croissance des précurseurs neurales et des types cellulaires différenciés. Les premières observations réalisées à partir des cultures de cellules dérivées du CC du patient CACH/VWM ont permis de montrer une **préservation du nombre d'OLs matures** exprimant les protéines GalC et MBP ayant une morphologie normale et une **diminution du nombre d'astrocytes matures** (expression de GFAP) en comparaison avec des cultures dérivées d'un cerveau contrôle (3% des cellules sont des astrocytes dans les cultures dérivées du cerveau du patient CACH/VWM contre 11% dans les cellules dérivées du cerveau contrôle). Les cellules dérivées de la ZV latérale ont ensuite été utilisées pour étudier la différenciation des précurseurs neurales. Après enrichissement en précurseurs neurales, les cellules ont été cultivées en présence de différents facteurs permettant leur différenciation en astrocytes. Il a ainsi été observé que les astrocytes eIF2B-mutés GFAP positifs présentaient des anomalies de structure avec présence de **très longs prolongements** et des **pieds astrocytaires anormaux** (Figure 25). De plus, les précurseurs neurales eIF2B-mutés exposés au BMP4, un inducteur puissant de la différenciation astrocytaire, produisent des cellules ayant un **phénotype mixte** d'astrocytes (GFAP positifs)

et d'OLs (GalC positifs) qui n'a jamais été retrouvé dans des cultures de précurseurs neuraux non mutés. Les analyses histologiques du cerveau du même patient ont permis de confirmer les résultats déjà connus comme l'augmentation du nombre d'OLs dont certains ont un aspect spumeux et la raréfaction du nombre d'astrocytes. Elles confirment également les résultats de l'étude *in vitro* avec la présence d'astrocyte ayant de longs prolongements cytoplasmiques.

Afin de vérifier qu'il existe bien un lien direct entre l'altération de la fonction eIF2B et un défaut de maturation astrocytaire, les auteurs ont réalisé une expérience d'extinction de l'expression du gène *EIF2B5* par siARN dans des précurseurs gliaux humains (hGPC : human Glial Progenitor Cells). Il a ainsi pu être montré que la réduction du taux de protéines eIF2Bε dans les progéniteurs neuraux était associée à une altération spécifique de la différenciation des astrocytes. De même la surexpression d'une sous-unité eIF2Bε mutée dans les hGPCs induit spécifiquement un défaut de maturation des astrocytes avec une diminution du nombre de cellules GFAP positives (Dietrich et al., 2005).

De plus, une étude histologique récente sur une cohorte de huit patients porteurs d'eIF2B-pathie (de 4 mois et demi à 36 ans) en comparaison de six patients contrôles sans atteinte neurologique (de 29 semaines d'aménorrhée : SA à 63 ans) et de quatre patients porteurs d'une autre LD (une ALD, un Krabbe, un AxD et une sclérose en plaques, de 1 à 66 ans) confirme l'**augmentation de densité cellulaire** dans les cerveaux de ces patients (avec une augmentation du nombre d'OPC) associée à une **morphologie anormale des astrocytes** (Bugiani et al., 2011).

D'autre part, cette étude montre que les astrocytes et les OLs à l'état prolifératif sont plus nombreux dans les cerveaux atteints (co-marquage GFAP/Ki67 ou PDGFRα/Ki67) et que les cellules GFAP positives marquent également la nestine, marqueur des précurseurs neuraux, suggérant une immaturité de ces astrocytes. Certains d'entre eux ont également un phénotype mixte aberrant puisqu'ils co-expriment les marqueurs astrocytaires GFAP et vimentine avec les marqueurs oligodendrocytaires GalC et OLIG2.

De plus, dans les astrocytes matures, OLIG2 est transloqué du noyau vers le cytoplasme, condition indispensable à la différenciation astrocytaire puisque OLIG2 ne peut alors plus agir en tant que facteur de transcription dans le noyau. Ceci suggère que la présence de nouveaux astrocytes dans les cerveaux de patients atteints d'eIF2B-pathie pourrait provenir de progéniteurs gliaux adultes qui s'engageraient vers le lignage astrocytaire après la translocation d'OLIG2 du noyau vers le cytoplasme.

De manière intéressante, cette étude identifie pour la première fois une surexpression du transcrit et de la protéine GFAP δ , issu d'un épissage alternatif de GFAP, alors que l'expression de l'isoforme majeure GFAP α n'est pas modifiée dans les cerveaux atteints d'eIF2B-pathie.

Enfin, les astrocytes eIF2B-mutés sont également positifs à l' α B-crystalline, protéine chaperone qui entre dans la composition des FRs de l'AxD, suggérant que l'altération du ratio GFAP δ /GFAP α pourrait perturber les interactions entre filaments intermédiaires dans ces astrocytes, contribuant ainsi à leur morphologie aberrante et à leur dysfonctionnement.

D. Modèles levure et murin de la pathologie

Un premier **modèle levure** a été mis au point en 2004 dans lequel des mutations eIF2B ont été introduites dans l'ADNc de *Saccharomyces cerevisiae* par mutagenèse dirigée puis transfectées dans des souches de levures délétées pour la sous-unité endogène (Richardson et al., 2004). Le modèle levure est un excellent outil pour étudier les conséquences fonctionnelles des mutations eIF2B sur sa structure, sa fonction et ses régulations en cas de stress cellulaire du fait notamment de la conservation du complexe de la levure à l'homme. Ainsi, l'effet de mutations équivalentes à celles retrouvées chez l'homme a pu être déterminé dans ce modèle. Toutes les levures mutées sont **viables** mais certaines présentent un **retard de croissance**. D'autre part, il a été décrit une activation de la **réponse UPR** suite à une privation en acides aminés chez la levure et cette réponse a lieu *via* une **augmentation de traduction de GCN4** même en l'absence de privation dans les levures eIF2B-mutées similaires à celle retrouvée pour ATF4 dans les cerveaux de patients atteints (van der Voorn et al., 2005). De plus, l'activité GEF mesurée chez le mutant p.Val341Asp est trouvée diminuée, le complexe eIF2B semble moins stable lorsqu'une sous-unité est mutée. Des essais de surexpression de la sous-unité eIF2B ϵ sauvage ont ensuite été menées afin d'essayer de restaurer le phénotype. Au lieu de cela, la traduction de GCN4 reste élevée même en l'absence de stress, suggérant que **la sous-unité en excès favoriserait la formation de sous-complexes** et donc **réduirait le niveau d'eIF2B fonctionnel à cinq sous-unités**.

Ce modèle levure peut être d'un grand intérêt d'un point de vue thérapeutique puisqu'il peut permettre le **criblage** à haut débit de molécules **restaurant la fonction eIF2B**. A l'heure actuelle, 27199 molécules ont été criblées dans le modèle levure d'eIF2B-pathies sur la base de la mesure de la croissance cellulaire et de l'activation de GCN4 mais aucune n'a permis de restaurer les fonctions du facteur eIF2B muté (Motlekar et al., 2009).

Un **modèle murin** de la pathologie a très récemment été mis au point. Le knock-out (KO) *Eif2b5* constitutif étant létal, une première approche alternative a été développée par l'équipe du Docteur Elroy-Stein qui a généré un modèle de souris knock-in (KI) portant une mutation homozygote dans le gène *Eif2b5* : **p.Arg132His**, correspondant à la mutation p.Arg136His entraînant un phénotype sévère chez l'homme (Geva et al., 2010). Les résultats montrent tout d'abord que les souris mutées sont **viables** et **fertiles**. La synthèse protéique dans les cerveaux de ces souris n'est pas modifiée et elles présentent une **activité GEF cérébrale à 77%**, ce qui correspond à des valeurs de formes très modérées dans les cellules de patients. Contrairement à la forme humaine, les souris mutées ont une **durée de vie normale** et ne développent pas de signes cliniques sévères, elles ont seulement un **léger déficit moteur transitoire**. Elles présentent un développement cérébral retardé et un **profil de myélinisation anormal**. L'étude de marqueurs astrocytaires et oligodendrocytaires dans les cerveaux de ces souris mutées montre des **anomalies précoces de maturation et de différenciation des cellules gliales**. En effet, l'expression de MBP est augmentée à 3 semaines de vie dans l'hippocampe des souris mutées alors que celle de PLP/DM20 et GFAP est diminuée. En revanche, ces taux d'expression sont normalisés à 4 mois. D'une manière générale, le phénotype de ces souris reste donc très modéré par rapport à la forme humaine, suggérant le besoin d'un autre modèle murin plus proche du phénotype clinique grave observé chez les patients atteints d'eIF2B-pathie.

Deux processus interviendraient donc dans l'expressivité des pathologies liées aux anomalies du gène *EIF2B* : d'une part un **trouble du développement** dont la sévérité serait corrélée à l'âge de début de la maladie et à l'altération de l'activité GEF, et d'autre part une **susceptibilité au stress cellulaire** faisant intervenir des facteurs environnementaux mais aussi d'autres gènes impliqués dans la lutte contre le stress cellulaire pouvant expliquer la variabilité d'expression des formes adultes.

VII. Conclusion de la partie bibliographique : hypothèses physiopathologiques des eIF2B-pathies

La LD étudiée ici est une maladie neurodégénérative causée par des mutations du facteur ubiquitaire pentamérique eIF2B qui a un rôle clé dans l'initiation de la traduction et ses régulations notamment en cas de stress cellulaire. Les conséquences fonctionnelles de ces mutations sont multiples et permettent de mieux comprendre les mécanismes en cause dans la pathologie.

La conséquence première des mutations joue sur la **formation et la stabilité du complexe eIF2B** lui-même conduisant ainsi à un défaut de son activité enzymatique GEF. Cette activité étant cruciale pour l'initiation de la traduction, une réduction de l'initiation de la synthèse protéique globale constitue une des conséquences fonctionnelles importantes des mutations du facteur eIF2B. En effet, au cours du développement, les cellules de l'organisme ont besoin de produire une grande quantité de protéines, phénomène qui pourrait être compromis par une diminution de la fonctionnalité du facteur eIF2B.

La présence d'une **anomalie de la réponse au stress cellulaire** constitue la deuxième conséquence fonctionnelle des mutations du facteur eIF2B. En effet, les modèles cellulaires ainsi que les études de cerveaux de patients ont permis de montrer une hyper-activation de la réponse UPR. Les régulations de celle-ci sont nécessaires au cours du développement général et de la différenciation du SNC mais également à l'âge adulte pour lutter contre le stress cellulaire. Les anomalies de la régulation de l'UPR dans les eIF2B-pathies pourraient donc contribuer aux défauts développementaux observés dans différents organes et à l'anomalie de maturation des astrocytes du SNC. L'aggravation phénotypique des patients suite à divers stress pourrait également expliquer l'incapacité des cellules de la SB à répondre normalement au stress cellulaire.

Enfin, l'identification d'un **défaut de maturation des astrocytes** place ces cellules comme des acteurs majeurs de la physiopathologie des eIF2B-pathies. En effet, les astrocytes sont au cœur de la régulation de l'homéostasie cérébrale et, de leur bon fonctionnement, dépend la survie des autres cellules du SNC. La modification de leur maturation et de leurs régulations métaboliques (synthèse protéique et réponse aux stress) par un défaut de la fonction du facteur eIF2B induirait une perturbation de la communication astrocytaire.

OBJECTIFS DU TRAVAIL

Les objectifs de ce travail de thèse se sont articulés autour de l'analyse moléculaire des eIF2B-pathies, initiée quelques années plus tôt au laboratoire, et de l'étude des conséquences cellulaires directes et indirectes des mutations du facteur eIF2B, dans un but d'aide au diagnostic mais également de compréhension de la physiopathologie.

Ainsi, dans un premier temps, mon travail a porté sur l'évaluation et la validation d'un outil moléculaire pour l'aide au **diagnostic et au pronostic** de ces pathologies, basés sur les conséquences biochimiques directs (activité GEF du facteur eIF2B) induits par les mutations du facteur eIF2B dans les cellules des patients. En effet, il avait été montré avant ma thèse une diminution du taux d'activité GEF du facteur eIF2B dans les cellules de patients atteints d'eIF2B-pathie en comparaison de contrôles. J'ai participé à compléter l'étude de spécificité de ce marqueur en évaluant les taux d'activité GEF des cellules de patients atteints d'eIF2B-pathie en comparaison de ceux de cellules de patients atteints d'autres types de LDs et de sujets sains.

Le facteur eIF2B ubiquitaire muté ayant une activité abaissée et à la vue de son rôle dans la synthèse protéique et sa régulation au cours du stress, je me suis intéressée dans un deuxième temps aux **conséquences fonctionnelles des mutations** de ce facteur dans les cellules de patients, afin de comprendre une partie des mécanismes physiopathologiques en cause. Ainsi, j'ai participé à l'étude des voies de la réponse UPR dans des IIB d'une cohorte de 12 patients atteints d'eIF2B-pathie soumis ou non à un stress du RE en comparaison avec des contrôles, afin de mettre en évidence une potentielle dysrégulation due à la perte de fonction partielle du facteur eIF2B.

De plus, j'ai réalisé une approche globale d'analyse transcriptomique différentielle à partir de Fbs primaires de 10 patients atteints d'eIF2B-pathie en comparaison de Fbs primaires de patients atteints d'autres types de LDs et de sujets sains, soumis ou non à un stress du RE. Cette analyse visait à identifier les **voies métaboliques** potentiellement en cause dans les eIF2B-pathies.

Enfin, suite aux récentes hypothèses d'une **anomalie de maturation et de différenciation des cellules gliales** au cours du développement décrites chez les patients porteurs d'eIF2B-pathie, je me suis focalisée sur l'étude de la conséquence des défauts génétiques du facteur eIF2B sur la différenciation de ces cellules. Le modèle choisi pour cette étude est le modèle original des **cellules souches embryonnaires murines** (mESC) par une

double approche complémentaire de sous-expression de la sous-unité eIF2B ϵ et de surexpression du gène *EIF2B5* humain muté dans ces cellules. Cette étude participe, en partie, à la validation des hypothèses physiopathologiques avancées à ce jour pour les eIF2B-pathies, à savoir que celles-ci seraient la conséquence d'un développement anormale très précoce des cellules gliales du SNC.

TRAVAUX EXPERIMENTAUX

*PREMIERE PARTIE : VALIDATION
D'UN BIOMARQUEUR DES eIF2B-
PATHIES*

I. Validation de la mesure de l'activité GEF comme outil d'aide au diagnostic et au pronostic des eIF2B-pathies

A. Contexte scientifique

Depuis quelques années, la recherche d'un **marqueur diagnostique** des eIF2B-pathies est devenue en enjeu important pour permettre l'identification rapide des patients atteints. Mes travaux se sont donc concentrés dans un premier temps sur la validation d'un biomarqueur précédemment décrits : la **diminution de l'activité GEF** du facteur eIF2B.

Une première étude dans les llb de 30 patients avec eIF2B-pathie portant des formes de sévérité clinique allant de 1 à 3 en comparaison de 10 parents hétérozygotes non atteints et de 22 contrôles atteints avait permis de mettre en évidence une diminution significative de cette activité dans les llb de patients avec eIF2B-pathies porteurs de mutations homozygotes ou hétérozygotes composites (Fogli et al., 2004b). Une certaine **corrélation** entre la sévérité de la maladie (âge de début) et la diminution de l'activité GEF du facteur eIF2B avait alors été démontrée, avec une diminution particulièrement sévère pour les patients porteurs d'une forme sévère 1. Les llb des parents hétérozygotes sains présentent une activité normale, tout comme les llb des contrôles, suggérant que cette pathologie diffère des maladies métaboliques enzymatiques classiques pour lesquelles une diminution d'activité enzymatique de moitié est généralement observée pour les individus hétérozygotes.

Dans un second temps, nous avons donc voulu évaluer la **spécificité** de la diminution de l'activité GEF du facteur eIF2B dans les llb de patients avec eIF2B-pathies afin de valider sa valeur diagnostique.

B. Méthodologie

L'activité GEF a été mesurée dans les llb de 33 nouveaux patients atteints d'eIF2B-pathies (soit au total 63 patients porteurs de mutations dans les gènes *EIF2B2* à 5 et représentant le large spectre clinique avec un âge de début allant de 0,8 à 57 ans), comparée à celle de 19 patients CACH/VWM-like avec critères clinico-IRM CACH/VWM mais sans mutations du facteur eIF2B, de 19 patients atteints d'autres types de LDs (AxD, PMD et MLC) et de 18 sujets cliniquement sains.

C. Résultats et discussion

Malgré l'étendue des taux d'activité GEF mesurés dans les cellules porteuses de mutations eIF2B (30 à 111,6%, moyenne $63,4 \pm 17,6\%$), une diminution significative ($F^3_{115}=71,05$, $p < 0,001$) des taux d'activité GEF dans les llb des 63 patients porteurs de mutations du facteur eIF2B a pu être mise en évidence en comparaison des autres groupes testés. La corrélation entre la sévérité de la maladie et l'activité GEF trouvée initialement dans le groupe des 30 patients avec eIF2B-pathies ($r=0,59$, $p < 0,01$) (Fogli et al., 2004b) a été confirmée mais trouvée plus faible dans cette cohorte étendue à 63 patients mutés ($r=0,3997$, $p=0,0012$). Nous pouvons notamment remarquer que les patients ayant un âge de début de la maladie inférieur à 2 ans ont toujours un taux d'activité GEF inférieur à 55% (moyenne de $45,1 \pm 7,8\%$ pour un âge de début moyen de 1,2 an).

Dans cette étude, notre but était d'évaluer la spécificité de la diminution de l'activité GEF dans les llb de patients mutés pour le facteur eIF2B comme un marqueur diagnostic. Nous avons tout d'abord pu observer que 4,8% des 63 patients testés présentaient une activité GEF supérieure à 100%. De plus, un chevauchement des taux d'activité GEF des 38 patients non porteurs de mutations du facteur eIF2B (CACH/VWM-like et autres LD, étendue de 80 à 133,6%) et des 63 patients atteints d'eIF2B-pathie (étendue de 30 à 111,6%) est observé. L'établissement des courbes ROC (Receiver Operating Characteristics) entre les taux d'activité GEF obtenus dans le groupe des patients atteints d'eIF2B-pathie et le groupe des autres patients a permis de déterminer un seuil pathognomonique. Ainsi une **spécificité de 100%** et une **sensibilité de 88,9%** est obtenue pour un seuil $\leq 77,5\%$ (AUC (Area Under Curve)= $0,955 \pm 0,0244$, $p < 0,0001$). Seuls 7/63 patients porteurs de mutations du facteur eIF2B ont une activité GEF supérieure à 77,5%. Ces derniers présentent des formes classiques à modérées de la maladie avec un âge de début allant de 3 à 57 ans, une progression lente et portent des mutations dans différents gènes *EIF2B*. Ceci suggère que cette activité GEF élevée n'est pas liée au gène muté, ni à l'âge de début ou au degré de sévérité clinique.

D. Conclusion

Notre étude a donc permis de confirmer l'effet délétère des mutations du facteur eIF2B sur son activité enzymatique dans les llb de patients atteints d'eIF2B-pathie. De plus, nous avons pu établir que la diminution de l'activité GEF pouvait être un bon outil pour l'aide au diagnostic des patients présentant les caractéristiques de syndrome CACH/VWM puisque

dans la limite de 77,5%, cette mesure montre une sensibilité de 100% et une spécificité de 88,9%. Pour les patients présentant des symptômes cliniques de syndrome CACH/VWM et des taux d'activité GEF supérieurs à 77,5%, il existe une probabilité de 26,9% de trouver des mutations dans les gènes *EIF2B1-5*. Ce haut pourcentage justifie de rechercher systématiquement ces mutations dans ce cas.

Notre étude permet également d'établir que la mesure de l'activité GEF a une **valeur pronostique relative** puisque tous les patients qui ont un âge de début de la maladie inférieur à 2 ans ont un taux d'activité GEF très faible, suggérant une certaine **corrélation génotype-phénotype pour les formes les plus sévères** d'eIF2B-pathie. Une telle corrélation est plus faiblement retrouvée pour les patients présentant un âge de début de la maladie supérieur à 2 ans. En effet ces patients présentent un large spectre de taux d'activité GEF allant de 33,9 à 111,6% et de plus, des taux d'activité GEF variables peuvent être observés au sein d'une fratrie mais également chez des patients non apparentés porteurs des mêmes mutations. Ceci démontre que le taux d'activité GEF n'est corrélé ni au type de mutation et/ou au gène muté, ni à la sévérité de la maladie pour les patients avec un âge de début supérieur à 2 ans. De plus, ces résultats suggèrent que dans ces phénotypes, d'autres facteurs génétiques et/ou environnementaux interviennent dans le taux d'activité GEF mesuré dans les llb.

E. Perspectives

La mesure de l'activité GEF du facteur eIF2B nécessite l'utilisation de **substrat eIF2**, actuellement purifié à partir de foie de rat dans le laboratoire de Scot Kimball (Hershey, USA). Au total, la quantité de substrat nécessaire est importante et coûteuse et constitue le point limitant de cette technique. L'équipe du Dr. Graham Pavitt (Manchester, UK), qui a développé et décrit le modèle levure des eIF2B-pathies (Richardson et al., 2004), a eu en charge la production du substrat eIF2 humain dans ce modèle afin de diminuer les coûts. Les trois sous-unités humaines du facteur eIF2 ont été clonées par recombinaison homologue chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, puis les protéines recombinantes ont été purifiées. Dans le cadre du projet européen Leukotreat coordonné par le Pr. Odile Boespflug-Tanguy, ce substrat recombinant est actuellement en cours de validation au laboratoire sur la mesure de l'activité GEF dans les llb de patients.

D'autre part, ce test biochimique pourra également être utile pour rechercher des **molécules rétablissant l'activité GEF**. A l'heure actuelle, 27199 molécules ont été criblées

dans le modèle levure d'eIF2B-pathies mais aucune n'a permis de restaurer les fonctions du facteur eIF2B muté (Motlekar et al., 2009).

Des molécules potentiellement intéressantes à tester sur la restauration de la fonction du facteur eIF2B sont les **corticoïdes**. Les glucocorticoïdes ont un rôle crucial dans le développement cérébral car ils interviennent dans la maturation des OLs, l'initiation de la myélinisation et induisent la synthèse des composants de la myéline (Antonow-Schlorke et al., 2009). La prescription de corticoïdes (bolus d'hydrocortisone), déjà réalisée dans d'autres maladies démyélinisantes telles que la sclérose en plaque, semble permettre une stabilisation de l'état des patients avec eIF2B-pathies, suggérant un rôle potentiel de ces anti-inflammatoires sur l'évolution ponctuelle favorable des eIF2B-pathies.

PUBLICATION N°1

Horzinski L., **Huyghe A.**, Cardoso MC., Gonthier C., Ouchchane L., Blanc P., Boespflug-Tanguy O., Fogli A. Eukaryotic Initiation Factor 2B (eIF2B) GEF activity as a diagnostic tool for eIF2B-related disorders. (2009) PLoS ONE 4(12) : e8318.

Eukaryotic Initiation Factor 2B (eIF2B) GEF Activity as a Diagnostic Tool for EIF2B-Related Disorders

Laetitia Horzinski^{1,2}, Aurélie Huyghe^{1,2}, Marie-Céleste Cardoso^{1,2,3}, Céline Gonthier¹, Lemlih Ouchchane^{4,5}, Raphael Schiffmann⁶, Pierre Blanc^{1,3}, Odile Boespflug-Tanguy^{1,2,7}, Anne Fogli^{1,2,3*}

1 INSERM U931-CNRS 6247- Université Clermont, GReD, Clermont-Ferrand, France, **2** Université Clermont 1, UFR Médecine, Clermont-Ferrand, France, **3** CHU de Clermont-Ferrand, Service de Biochimie Médicale et Biologie Moléculaire, Clermont-Ferrand, France, **4** Université de Clermont, UFR Médecine, EA3295, Equipe de Recherche en signal et Imagerie Médicale, Clermont-Ferrand, France, **5** CHU de Clermont-Ferrand, Hôpital Gabriel Montpied, Laboratoire de Biostatistiques, Télématique et Traitement d'Images, Clermont-Ferrand, France, **6** Institute of Metabolic Disease, Baylor Research Institute, Dallas, Texas, United States of America, **7** CHU de Clermont-Ferrand, Service de Génétique Médicale, Centre de Référence Leucodystrophies, Hôpital Hôtel-Dieu, Clermont-Ferrand, France

Abstract

Background: In recent years, the phenotypes of leukodystrophies linked to mutations in the eukaryotic initiation factor 2B genes have been extended, classically called CACH/VWM (Childhood ataxia with central hypomyelination/vanishing white matter disorder). The large clinical spectrum observed from the more severe antenatal forms responsible for fetal death to milder adult forms with an onset after 16 years old and restricted to slow cognitive impairment have led to the concept of eIF2B-related disorders. The typical MRI pattern with a diffuse CSF-like aspect of the cerebral white matter can lack particularly in the adult forms whereas an increasing number of patients with clinical and MRI criteria for CACH/VWM disease but without eIF2B mutations are found. Then we propose the use of biochemical markers to help in this difficult diagnosis. The biochemical diagnosis of eIF2B-related disorder is difficult as no marker, except the recently described asialotransferrin/transferrin ratio measured in cerebrospinal fluid, has been proposed and validated until now. Decreased eIF2B GEF activity has been previously reported in lymphoblastoid cell lines from 30 eIF2B-mutated patients. Our objective was to evaluate further the utility of this marker and to validate eIF2B GEF activity in a larger cohort as a specific diagnostic test for eIF2B-related disorders.

Methodology/Principal Findings: We performed eIF2B GEF activity assays in cells from 63 patients presenting with different clinical forms and eIF2B mutations in comparison to controls but also to patients with defined leukodystrophies or CACH/VWM-like diseases without eIF2B mutations. We found a significant decrease of GEF activity in cells from eIF2B-mutated patients with 100% specificity and 89% sensitivity when the activity threshold was set at $\leq 77.5\%$.

Conclusion: These results validate the measurement of eIF2B GEF activity in patients' transformed-lymphocytes as an important tool for the diagnosis of eIF2B-related disorders.

Citation: Horzinski L, Huyghe A, Cardoso M-C, Gonthier C, Ouchchane L, et al. (2009) Eukaryotic Initiation Factor 2B (eIF2B) GEF Activity as a Diagnostic Tool for EIF2B-Related Disorders. PLoS ONE 4(12): e8318. doi:10.1371/journal.pone.0008318

Editor: Antoni L. Andreu, Hospital Vall d'Hebron, Spain

Received: October 13, 2009; **Accepted:** November 13, 2009; **Published:** December 15, 2009

Copyright: © 2009 Horzinski et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by grants from the ELA Foundation (2006–08). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: anne.fogli@inserm.u-clermont1.fr

Introduction

Mutations in the *EIF2B1-5* genes (OMIM 606686, 606454, 606273, 606687, 603945) encoding the subunits of the ubiquitously expressed eukaryotic initiation factor 2B (eIF2B) have been reported in a group of clinically heterogeneous leukodystrophies termed eIF2B-related disorders [1,2,3,4]. Disease severity is correlated with age at disease onset, with stress onset trigger or aggravating factors [5,6]. A large clinical spectrum is observed and several distinct forms have been proposed: i) the classical childhood ataxia with central hypomyelination/vanishing white matter disease (CACH/VWM, OMIM 603896), with progressive neurological deterioration between age 2–5 years [1,3], ii) the infantile severe forms with disease onset <2 years and rapid fatal evolution [7], iii) the most severe antenatal forms responsible for

fetal death [8], and iv) the milder forms with disease onset >5 years and restricted to slow cognitive impairment [6,9].

The typical MRI pattern shows a diffuse CSF-like aspect of the cerebral white matter of the cerebral hemispheres and this pattern recognition permits the selection of patients eligible for the *EIF2B1-5* genes sequencing [10]. But MRI can lack particularly in the adult forms whereas an increasing number of patients with clinical and MRI criteria for CACH/VWM disease but without *EIF2B1-5* genes mutations (CACH/VWM-like) are found, underlining the necessity to have biochemical markers to help in the diagnosis process and in the selection of patients eligible for *EIF2B1-5* direct sequencing.

Two biochemical markers have been recently proposed as potential tools for the screening of eIF2B-related disorders: the decrease of asialotransferrin/total transferrin in CSF [11,12], and

Table 1. Clinical data and eIF2B GEF activity measured in lymphoblasts from the 63 eIF2B-mutated patients.

Patient ^a	Age at disease onset (y)	Disease evolution (y)	Score of disability ^b	Mutated gene	Amino-acid change ^c	eIF2B GEF activity (%) ^d	% AT ^e
1187-1	57	11	3	<i>EIF2B3</i>	p.Ser14Phe/p.Ala87Val	111.6±3.6	NA
1074-1	8	NA	NA	<i>EIF2B5</i>	p.Arg113His/p.Arg113His	108±11.2	NA
971-1	5	11	1	<i>EIF2B3</i>	p.Glu136Pro/?	105.5±6.8	NA
1135-1	5	1.1	2	<i>EIF2B5</i>	p.Arg113His/p.Arg315Cys	99±7.4	NA
*432-1	3	8.2	5	<i>EIF2B5</i>	p.Arg113His/p.Trp628X	90.4±1.8	2.11
356-1	3	16	5	<i>EIF2B4</i>	p.Pro243Leu/p.Pro243Leu	80.4±2.8	NA
736-1	8	4	1	<i>EIF2B4</i>	p.Arg374Cys/p.Arg374Cys	80±0	NA
630-1	4.5	10.5	4	<i>EIF2B5</i>	p.Arg113His/p.Arg113His	77.5±2.5	5.50
*370-2	4.5	5	3	<i>EIF2B5</i>	p.Arg113His/p.Arg195His	77±2.5	NA
1304-1	18	32	2	<i>EIF2B5</i>	p.Arg113His/p.Arg113His	76.1±4.3	NA
1008-1	18	7	5	<i>EIF2B5</i>	p.Arg113His/p.Arg113His	76.1±2.6	NA
954-1	3.5	4	4	<i>EIF2B5</i>	p.Arg113His/p.Arg269Leu	75.9±1.6	7.77
*76-1	17	8	1	<i>EIF2B2</i>	p.Glu213Gly/p.Lys273Arg	75.5±10	NA
299-1	11	17	4	<i>EIF2B5</i>	p.Arg113His/p.Arg113His	75.2±5.5	NA
338-1	10	16	5	<i>EIF2B5</i>	p.Arg113His/p.Arg113His	75.2±1.5	NA
1407-1	24	2	1	<i>EIF2B5</i>	p.Arg113His/p.Arg222Trp	74.9±0.8	NA
*370-1	3.5	7	3	<i>EIF2B5</i>	p.Arg113His/p.Arg195His	71.5±9	NA
73-1	4	11	3	<i>EIF2B5</i>	p.Arg113His/p.Arg113His	70.8±7	NA
904-1	2	1.5	1	<i>EIF2B5</i>	p.Arg113His/p.Gly481fs493X	70±1.2	4.52
1014-1	16	0.5	0	<i>EIF2B5</i>	p.Arg113His/p.Arg195Cys	68±4	NA
*470-2	2	4	1	<i>EIF2B5</i>	p.Glu81Lys/p.Arg113His	67.9±1.8	NA
1240-1	17	4	0	<i>EIF2B3</i>	p.Ala202Thr/p.Arg438X	67.7±2	NA
1627-1	7	24	3	<i>EIF2B5</i>	p.Pro87Leu/p.Arg113His	67.1±1.8	NA
*76-2	7	11	3	<i>EIF2B2</i>	p.Glu213Gly/p.Kys273Arg	67±5.1	NA
807-1	6	4.5	3	<i>EIF2B5</i>	p.Arg113His/p.Arg113His	67±4.3	NA
435-1	3	5.5	3	<i>EIF2B5</i>	p.Arg113His/p.Arg422X	67±3	NA
1467-1	25	19	1	<i>EIF2B5</i>	p.Tyr483Cys/p.Arg195His	66.3±0.6	NA
1232-1	28	3	1	<i>EIF2B5</i>	g.IV58+59A/G/?	64.3±7.8	NA
*648-2	7	3	1	<i>EIF2B2</i>	p.Glu213Gly/p.Glu213Gly	64±4	4.11
1108-1	3.5	1.5	4	<i>EIF2B5</i>	p.Arg113His/c.[+2081delG]	63.6±2.3	NA
1115-1	2	6	2	<i>EIF2B5</i>	p.Pro427Leu/p.Pro427Leu	63.4±8.2	NA
1441-1	2.8	3.2	4	<i>EIF2B5</i>	p.Leu106Phe/p.Arg113His	63.2±2	NA
997-1	7	4	1	<i>EIF2B5</i>	p.Arg113His/p.Arg113His	61.3±0.3	NA
*823-1	4	2	4	<i>EIF2B3</i>	p.His341Gln/p.His341Gln	61±6	NA
*576-2	7	5	0	<i>EIF2B5</i>	p.Tyr343Cys/p.Ile385Val	61±0.2	NA
1012-1	14	10	5	<i>EIF2B2</i>	p.Glu213Gly/p.Glu213Gly	60±2	NA
663-1	3.5	1.5	1	<i>EIF2B5</i>	p.Arg113His/p.Arg113His	59.9±3.8	NA
1004-1	2	1	1	<i>EIF2B2</i>	p.Glu213Gly/p.Glu213Gly	59.9±0.8	NA
*375-2	2.5	3	5	<i>EIF2B5</i>	p.Arg113His/p.Glu650Leu	59.4±0.7	NA
*648-1	7	14	4	<i>EIF2B2</i>	p.Glu213Gly/p.Glu213Gly	59±1	NA
442-1	2.5	NA	NA	<i>EIF2B5</i>	p.Glu81Lys/p.Arg113His	58.8±0.3	NA
308-1	5	8	4	<i>EIF2B5</i>	p.Arg113His/p.Arg113His	57.1±6.1	NA
*576-1	8	11	1	<i>EIF2B5</i>	p.Val73Gly/p.Arg113His	56±4	NA
359-1	6	1.5	5	<i>EIF2B4</i>	p.Pro243Leu/p.Pro243Leu	54±6	NA
522-1	3.5	3.5	3	<i>EIF2B5</i>	p.Ala16Asp/p.Arg113His	54±6	4.80
*432-2	2	8.2	5	<i>EIF2B5</i>	p.Arg113His/W628stop	53.9±0.9	NA
*570-2	1.5	6.5	4	<i>EIF2B4</i>	p.Arg209Gln/p.Arg209Gln	52±3	NA
*470-1	3	4	1	<i>EIF2B5</i>	p.Glu81Lys/p.Arg113His	51.5±4.5	NA
984-1	5	4	2	<i>EIF2B2</i>	p.Glu213Gly/p.Glu213Gly	51.5±0.5	NA

Table 1. Cont.

Patient ^a	Age at disease onset (y)	Disease evolution (y)	Score of disability ^b	Mutated gene	Amino-acid change ^c	eIF2B GEF activity (%) ^d	% AT ^e
*571-2	1.2	9	5	<i>EIF2B5</i>	p.Phe56Val/p.Arg315His	50±5	NA
928-1	3	5	1	<i>EIF2B5</i>	p.Arg113His/p.Arg113His	49±3	NA
995-1	1	2	4	<i>EIF2B5</i>	p.Arg113His/p.Leu425Arg	48±2	NA
*590-2	1	4	5	<i>EIF2B5</i>	p.Tyr343Cys/p.Ile385Val	<u>45.8±2.2</u>	4.36
949-1	4	9	4	<i>EIF2B4</i>	p.Pro243Leu/p.Pro243Leu	<u>45.6±1.8</u>	NA
*590-1	3	4	3	<i>EIF2B5</i>	p.Tyr343Cys/p.Ile385Val	<u>44.9±4.3</u>	NA
357-1	2	2	5	<i>EIF2B5</i>	p.Arg136Cys/p.Arg339Trp	44.5±4.5	NA
291-1	1.5	6.5	4	<i>EIF2B5</i>	p.Arg113His/p.Arg113His	41.5±6	NA
*571-1	0.8	9	5	<i>EIF2B5</i>	p.Phe56Val/p.Arg315His	40±3	NA
569-1	3.5	19.5	4	<i>EIF2B5</i>	p.Arg113His/p.256_281del	40±2	NA
1388-1	22	17	1	<i>EIF2B5</i>	p.His214Arg/p.Arg269X	39±7	NA
942-2	6	7	1	<i>EIF2B4</i>	p.Cys465Arg/p.Tyr489TThr	<u>34.5±1</u>	NA
137-1	5	7.5	1	<i>EIF2B2</i>	p.Glu213Gly/p.Glu213Gly	<u>33.9±3.2</u>	NA
1036-1	0.8	0.5	5	<i>EIF2B5</i>	p.Pro323Ser/p.Pro427Leu	30±7.5	NA

^a* = Familial form; two affected children in the same family; underlined: new patients whose genotype has not been reported in our previous studies [5,13].

^bscore of disability as previously described [5]: 0: no neurologic signs, 1: stiff gait, 2: walk with help, 3: wheelchair-bound, 4: help for daily living, 5: death.

^cAmino-acid numbers refer to the eIF2B peptide corresponding sequence. ? = mutation not yet identified.

^dExpressed as % control value ± standard deviation (assays performed in triplicate); underlined: new eIF2B GEF activity measured and not reported in [13].

^eAsialotransferrin ratio (AT) in % already described [11,12]. NA: Not available.

doi:10.1371/journal.pone.0008318.t001

the decrease of the eIF2B GEF activity measured in Epstein-Barr Virus (EBV)-transformed lymphocytes or lymphoblasts (LLB) [13]. In fact, eIF2B is a key regulator of the protein synthesis particularly under cellular stresses through its nucleotide guanine exchange (GEF) activity: it converts the initiation factor 2 (eIF2) from an inactive GDP-bound form to an active eIF2-GTP complex [14]. Measurement of eIF2B GEF activity in patients' LLB has been proposed as a potential diagnostic tool relating to a previous work showing decrease of this GEF activity in LLB from 30 affected eIF2B-mutated patients in comparison to controls. In order to further evaluate the specificity and sensitivity of eIF2B GEF activity in patients' LLB regarding the diagnosis of eIF2B-related disorders, we extended this initial cohort of 30 to 63 mutated patients and compared the results not only to healthy non mutated subjects but also to patients with defined leukodystrophies or CACH/VWM-like diseases.

Methods

Objectives

Our hypothesis is that eIF2B GEF activity measurement in LLB is a specific and sensitive marker that would be powerful to select patients eligible for the *EIF2B1-5* genes sequencing and then to help in the molecular diagnosis of eIF2B-related disorders. Our objective is then to extend our initial cohort of 30 [13] to 63 eIF2B-mutated patients and to compare the results to healthy subjects but also to CACH/VWM-like patients, in order to evaluate the specificity and sensitivity of eIF2B GEF activity in patients' LLB regarding the diagnosis of eIF2B-related disorders.

Participants

The GEF activity was measured in LLB from 63 eIF2B-mutated patients (including 30 patients already reported [13] and 13 patients never reported to date, (Table 1), 18 clinically healthy

subjects (controls) and 38 patients with leukodystrophies of other causes, termed eIF2B-unrelated leukodystrophic group (Table 2). This last group included:

- 19 leukodystrophic patients with an identified genetic defect and termed OL (other leukodystrophy)-patients: 9 *GFAP*-mutated patients (with Alexander disease, OMIM 203450), 5 *MLC1*-mutated patients (with megalencephalic leukoencephalopathy with cysts, OMIM 604004) and 5 *PLP1*-mutated patients (with Pelizaeus-Merzbacher disease, PMD, OMIM 312080);
- 19 patients with the presence of clinical and/or MRI features observed in eIF2B-related disorders but screened negative for mutations in the coding regions of the five *EIF2B1-5* genes genes, and termed CACH-VWM-like patients.

Measurement of eIF2B GEF Activity in Transformed Lymphocytes

The direct GEF activity of the eIF2B complex was measured in triplicate in protein extracts from patients'EBV-transformed lymphocytes (LLB) as already described [13,15].

Ethics

An Institutional Review Board of the participating centers (Comité de Protection des Personnes Sud-Est VI, 2009-A00188-49) approved the use of human subjects for this study. A written informed consent was obtained from all patients.

Statistical Methods

The eIF2B GEF activity was considered as a continuous variable and results are displayed as mean ± SEM (standard error of the mean). Since the normality of eIF2B GEF (assessed by a Kolmogorov-Smirnov test) was not rejected, a one-way analysis of variance (ANOVA 1) was performed to assess the links between

Table 2. eIF2B GEF activity measured in lymphoblasts from the 38 leukodystrophic patients (19 OL and 19 CACH/VWM-like) and the 18 controls.

Patient	Disease ^a	Mutated gene	Mutation ^b	eIF2B GEF activity (%) ^c
81	PMD	<i>PLP1</i>	duplication	108.6±10.4
1437	AD	<i>GFAP</i>	p.Asp114Glu	103.8±6.6
940	MLC	<i>MLC1</i>	p.Leufs	109.6±0.4
002	PMD	<i>PLP1</i>	duplication	98.4±1.3
672	AD	<i>GFAP</i>	p.Asn77Tyr	133.6±9
958	AD	<i>GFAP</i>	p.Arg407Met	113.2±5.1
150	PMD	<i>PLP1</i>	duplication	103.4±4.5
42	PMD	<i>PLP1</i>	duplication	86.2±4.4
726	AD	<i>GFAP</i>	p.Arg239Cys	119.8±1.6
989	AD	<i>GFAP</i>	p.Met74Lys	101.5±8.4
256	MLC	<i>MLC1</i>	NA	102.6±4.3
737	AD	<i>GFAP</i>	p.Arg88Cys	101±14.8
1047	MLC	<i>MLC1</i>	p.Ser289Tyr/7	98.7±13
750-1	AD	<i>GFAP</i>	p.Arg79His	105.6±1.8
750-2	AD	<i>GFAP</i>	p.Arg79His	79.9±3.9
613	MLC	<i>MLC1</i>	NA	101.8±2.5
968	PMD	<i>PLP1</i>	duplication	105.9±6.3
1207	MLC	<i>MLC1</i>	p.Cys46fs	107.7±5.3
758	AD	<i>GFAP</i>	p.Arg88Cys	96.4±4.4
1011-1	CACH-L	-	-	104.43±6.5
1242-1	CACH-L	-	-	105.29±8.8
1469-1	CACH-L	-	-	103.30±1.7
1479-1	CACH-L	-	-	99.75±2.2
1082-1	CACH-L	-	-	89.5±8.8
1196-1	CACH-L	-	-	110.4±3.3
1290-2	CACH-L	-	-	105.9±2.7
1211-1	CACH-L	-	-	87.4±5.1
1200-1	CACH-L	-	-	108.5±2
798-1	CACH-L	-	-	119.0±2.3
1253-1	CACH-L	-	-	107.6±6.6
1206-1	CACH-L	-	-	94.67±8.2
K80	CACH-L	-	-	89.27±2.6
K128	CACH-L	-	-	84.76±1.2
K112	CACH-L	-	-	100.41±2.5
1313-1	CACH-L	-	-	82.02±1.2
1283-1	CACH-L	-	-	101.40±6.8
1454-1	CACH-L	-	-	111±16.6
331-1	CACH-L	-	-	88.3±9.5
N1	C	-	-	100
N2	C	-	-	99
N3	C	-	-	101
N4	C	-	-	100
N5	C	-	-	102
N6	C	-	-	100
N7	C	-	-	98
N8	C	-	-	100
N9	C	-	-	94.3±7

Table 2. Cont.

Patient	Disease ^a	Mutated gene	Mutation ^b	eIF2B GEF activity (%) ^c
N10	C	-	-	100±0.3
N11	C	-	-	95.3±7.5
N12	C	-	-	88.5±1.5
N13	C	-	-	97.5±2.5
N14	C	-	-	99.5±7
N15	C	-	-	99.3±6.1
N16	C	-	-	93.5±0.5
N17	C	-	-	96.5±0.5
N18	C	-	-	102±2

^aOL: PMD; Pelizaeus-Merzbacher disease, AD: Alexander disease, MLC: Megalencephalic Leukoencephalopathy with Cysts; and CACH/VWM-like: CACH-L.

^b?: second mutation not yet identified; NA: not available.

^cExpressed as % control value ± standard deviation (assays performed in triplicate); underlined: new eIF2B GEF activity measured and not reported in [13].

doi:10.1371/journal.pone.0008318.t002

GEF activity and the patients' groups. On condition of a significant F-test for the ANOVA 1, a post-hoc multiple comparisons procedure was performed controlling for a 5% family-wise type I error using the Tukey honestly significant difference (THSD) test. A Spearman correlation coefficient (r) was calculated between GEF activity and age at disease onset (correlated to disease severity [5]). The Receiver Operating Characteristic, or ROC curve analysis (graphical plot of the sensitivity *versus* (1-specificity) for a binary classifier system as its discrimination threshold is varied), was performed on MedCalc[®] (v10.4, Mariakerke, Belgium) to determine the optimal threshold of GEF activity which best discriminates between eIF2B-mutated ($n = 63$) and eIF2B-unrelated leukodystrophic patients ($n = 38$), aiming a 100% specificity and the best associated sensitivity. The area under the ROC curve (AUC) was also estimated (with its 95% confidence limits) and tested towards 0.5. All remaining statistical analyses were performed on SAS[®] (v9.1, Cary, USA) with a type I error set at 5%.

Results

eIF2B GEF Activity in 63 eIF2B-Mutated Patients in Comparison to the Other Groups

The eIF2B GEF activity was measured in LLB of 63 affected patients exhibiting various eIF2B mutations, age of onset and disease severity (Table 1). Despite the wide range of GEF activity in eIF2B-mutated cells ($63.2 \pm 17.1\%$, range: 30–111.6%) (Figure 1A), multiple comparisons demonstrated a significant difference between the group of eIF2B-mutated patients ($n = 63$) and the three other groups of patients [OL-patients ($104.1 \pm 11.4\%$, range: 80–133.6%, $n = 19$), CACH/VWM-like ($99.6 \pm 10.3\%$, range: 82–119%, $n = 19$) and controls ($98 \pm 3.3\%$, range: 88.5–102%, $n = 18$)] ($F(3,115) = 71.1$, $p < 0.001$) (Tables 1 and 2, Figures 1A and 2). The OL, CACH/VWM-like and controls groups had similar GEF activity (THSD test). The THSD test further detailed that only the eIF2B-mutated group had significantly lower GEF activity compared with each of the three other groups (OL, CACH/VWM-like and controls).

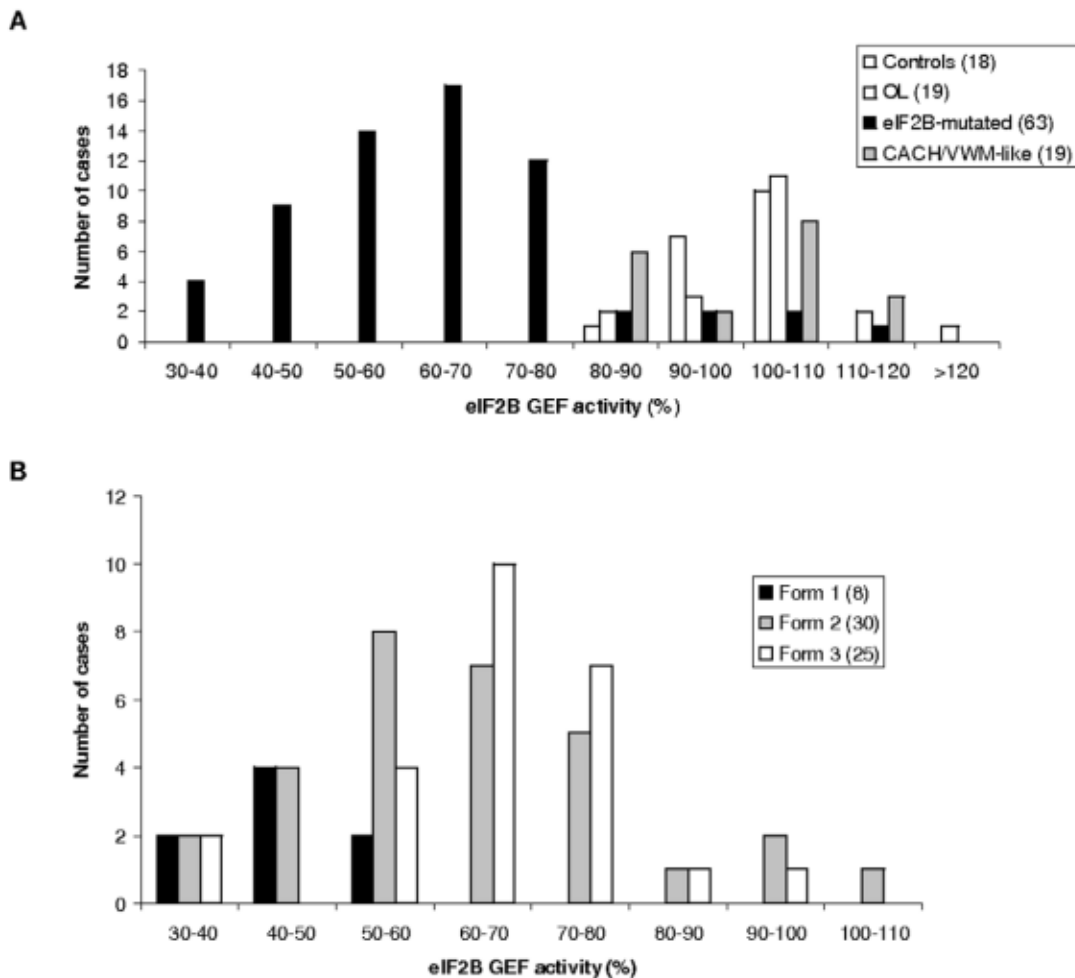


Figure 1. Distribution of patients per classes of eIF2B GEF activity. **A.** Distribution of the patients' groups per classes of eIF2B GEF activity in %. The patients' groups are healthy controls, eIF2B-mutated, others leukodystrophies (OL) and CACH-VMW-like. **B.** Distribution of the 63 eIF2B-mutated patients per classes of eIF2B GEF activity. The mutated patients have been classified into three clinical groups depending of their clinical severity, according to previous studies [5]. Form 1: disease onset before 2 years, form 2: disease onset between 2 and 5 years, form 3: disease onset >5 years. doi:10.1371/journal.pone.0008318.g001

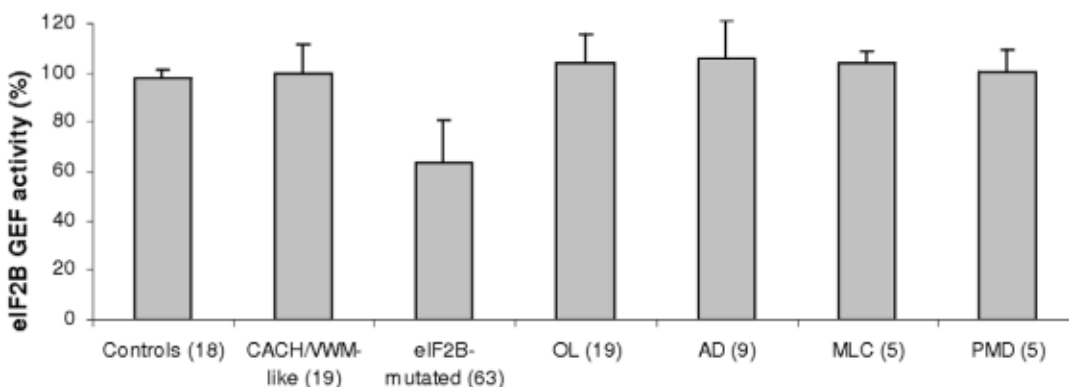


Figure 2. Decreased eIF2B GEF activity in eIF2B-mutated patients' lymphoblasts (LLB). The eIF2B GEF activity was measured in LLB from 63 eIF2B-mutated patients in comparison to 8 healthy controls, 19 patients carrying other leukodystrophies (OL: 9 patients with Alexander disease, AD, 5 patients with Pelizaeus-Merzbacher disease, PMD, and 5 patients with Megalencephalic leukoencephalopathy with cysts, MLC), and 19 CACH/VWM-like patients without eIF2B mutations. Experiments were carried out in triplicate. Data are presented as percentage of exchange activity of control LLB. The statistical multiple comparisons analysis between all the seven groups showed significant differences (*) only for the eIF2B-mutated group ($p < 0.001$). doi:10.1371/journal.pone.0008318.g002

Pooling CACH/VWM-like patients and OL-patients (group of eIF2B-unrelated leukodystrophic patients, $n = 38$), the aforementioned comparison of GEF activity led still to a significant result ($F(2,116) = 106.1$, $p < 0.0001$) and the THSD test showed again the same significantly lower GEF activity in the eIF2B-mutated group as compared with each of the two other groups (eIF2B-unrelated leukodystrophic and controls). Then difference in GEF activity remained statistically significant between eIF2B-mutated patients and the other groups tested.

Correlation between Age at Disease Onset and GEF Activity

A weak correlation was found between GEF activity measured in the eIF2B-mutated LLB and age at disease onset ($r = 0.4309$, $p = 0.0004$). Two patients 356-1 and 432-1 (Table 1) exhibited high GEF activities (respectively $80.4 \pm 2.8\%$ and $90.4 \pm 1.8\%$) despite a classical clinical form (disease onset at 3 years followed by severe disability within 3 years and death occurring after 16 years in one patient). On the other hand, patient 1388-1 affected with an adult onset, slowly progressive form (only stiff gait after 17 years of disease progression), exhibited a low GEF activity ($39 \pm 7\%$) (Table 1). However, the eight patients with onset ≤ 2 years (disease severity form 1) always had eIF2B GEF activity $< 55\%$ ($45.1 \pm 7.8\%$, mean age at disease onset: 1.2 year) (Table 1B). The correlation coefficient is higher in this group of eight patients ($r = 0.68$, $p = 0.06$) compared to the 30 patients carrying the clinical severity form 2 with onset between 2 and 5 years ($r = 0.11$, $p = 0.52$), and to the 25 patients carrying the severity form 3 with onset > 5 years ($r = 0.45$, $p = 0.0218$) (Table 1B).

ROC Curve Analysis of eIF2B GEF Activity in the Leukodystrophic Groups

Three out of the 63 eIF2B-mutated patients (4.8%) had GEF activity $> 100\%$. They expressed a mild juvenile/adult form of the disease with onset ≥ 5 years of age (Table 1). The ROC curve analysis of eIF2B GEF activity performed towards differential diagnosis between eIF2B-related ($n = 63$) and eIF2B-unrelated ($n = 38$) leukodystrophy patients lead to a pathognomonic threshold " $\leq 77.5\%$ of GEF activity", achieving 100% specificity (95% CI = 90.7–100%) and 88.9% sensitivity (95% CI = 78.4–95.4%), with an almost perfect discrimination ($AUC = 0.96 \pm 0.024$, $p < 0.0001$) (Figure 3). Only 7/63 (11.1%) eIF2B-mutated patients had GEF activities $> 77.5\%$. These patients presented with classic to milder clinical forms with onset ranging from 3 to 57 years, slow disease progression, and carrying mutations in different *EIF2B1-5* genes (Table 1). This group illustrates that the high level of GEF activity found is not linked to the type of mutated gene nor to a specific degree of clinical severity. However, none of these patients had a disease onset < 3 years.

Discussion

Analysis of this extended cohort showed that eIF2B GEF activity measured in patients' LLB distinguishes eIF2B-mutated patients from those with eIF2B-unrelated leukodystrophies with 100% positive predictive value (PPV) and 89% negative predictive value at $\leq 77.5\%$ threshold. At this threshold, the assay systematically excludes patients without eIF2B mutations. Therefore, it represents an interesting screening tool to select patients for a direct sequencing of the *EIF2B1-5* genes. For leukodystrophic patients with $> 77.5\%$ GEF activity, the probability to find eIF2B mutations is 15% (7/45) and increases to 26.9% (7/26) if patients have clinical and/or MRI features typical to eIF2B-related disorder. Therefore, *EIF2B1-5* sequencing is still indicated for

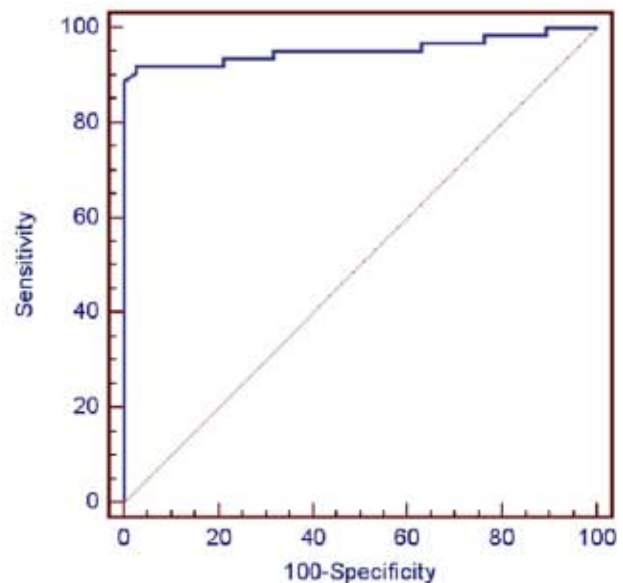


Figure 3. ROC (Receiver Operating Characteristic) curve of eIF2B GEF activity regarding the diagnosis of eIF2B-related disorders. The ROC curve analysis was performed to determine the optimal threshold of GEF activity which best discriminates between eIF2B-mutated ($n = 63$) and eIF2B-unrelated leukodystrophic patients ($n = 38$). The $\leq 77.5\%$ threshold achieves 100% specificity (95% CI = 90.7–100%) and 88.9% sensitivity (95% CI = 78.4–95.4%). The area under the ROC curve (AUC) = 0.955; standard error = 0.0244; 95% confidence interval: 0.894 to 0.986; test for the: $AUC = 0.5$, $p = 0.0001$. doi:10.1371/journal.pone.0008318.g003

patients who are clinically suspected of eIF2B-related disorder with GEF activity $> 77.5\%$, particularly in milder forms.

The wider range of disease onset reported in this cohort in comparison to previous work [13] may explain the weaker correlation found between age at disease onset and GEF activity. Such correlation is better in severe forms with GEF activity $< 55\%$ for patients with onset < 2 years (Figure 1B). Discrepancies in the GEF activity values were found among patients of the same group of disease onset or with the same mutations such as siblings 432-1 and 432-2 (GEF activities at respectively 90% and 53.9%), confirming that GEF activity in LLB is modulated by factors other than eIF2B mutations.

Determination of the asialotransferrin/total transferrin ratio in CSF is also a reliable marker to distinct eIF2B-mutated from non-mutated patients with 100% sensitivity and 94% specificity associated to 8%-ratio threshold [12]. This marker has been determined in parallel for five of our 63 eIF2B-mutated patients and a decreased ratio has been found in CSF (Table 1) in all five, including patient 432-1 with a surprisingly normal eIF2B GEF activity ($90.4 \pm 1.8\%$) compared to his sibling. This suggests that these two biomarkers, if available for the same patient, may be complementary in order to assess with 100% sensitivity, specificity and PPV.

Limitations

Limitations of this study are:

- the relatively small number of patients overall, as eIF2B-related disorders are rare disorders;
- the age of disease onset, that may be imprecise for some patients, since it is determined retrospectively.

Acknowledgments

We gratefully acknowledge the participation of the patients' families. We acknowledge Scot Kimball to provide us the eIF2 substrate.

References

- Schiffmann R, Møller JR, Trapp BD, Shih HH, Farrer RG, et al. (1994) Childhood ataxia with diffuse central nervous system hypomyelination. *Ann Neurol* 35: 331–40.
- van der Knaap MS, Barth PG, Gabreëls FJ, Franzoni E, Begeer JH, et al. (1997) A new leukoencephalopathy with vanishing white matter. *Neurology* 48: 845–55.
- Leegwater PA, Vermeulen G, Konst AA, Naidu S, Mulders J, et al. (2001) Subunits of the translation initiation factor eIF2B are mutant in leukoencephalopathy with vanishing white matter. *Nat Genet* 29: 383–8.
- van der Knaap MS, Leegwater PA, Konst AA, Visser A, Naidu A, et al. (2002) Mutations in each of the five subunits of translation initiation factor eIF2B can cause leukoencephalopathy with vanishing white matter. *Ann Neurol* 51: 264–70.
- Fogli A, Schiffmann R, Bertini E, Ughetto S, Combes P, et al. (2004) The effect of genotype on the natural history of eIF2B-related leukodystrophies. *Neurology* 62: 1509–17.
- Labauge P, Horzinski L, Ayrignac X, Blanc P, Vukusic S, et al. (2009) Natural history of adult-onset eIF2B-related disorders: a multi-centric survey of 16 cases. *Brain* 132: 2161–9.
- Fogli A, Wong K, Eymard-Pierre E, Wenger J, Bouffard JP, et al. (2002) Cree leukoencephalopathy and CACH/VWM disease are allelic at the EIF2B5 locus. *Ann Neurol* 52: 506–10.
- van der Knaap MS, van Berkel CG, Herms J, van Coster R, Baethmann M, et al. (2003) eIF2B-related disorders: antenatal onset and involvement of multiple organs. *Am J Hum Genet* 73: 1199–207.
- Fogli A, Rodriguez D, Eymard-Pierre E, Bouhour F, Labauge P, et al. (2003) Ovarian failure related to eukaryotic initiation factor 2B mutations. *Am J Hum Genet* 72: 1544–50.
- Schiffmann R, van der Knaap (2009) Invited article: an MRI-based approach to the diagnosis of white matter disorders. *Neurology* 72: 750–9.
- Vanderver A, Schiffmann R, Timmons M, Kellersberger KA, Fabris D, et al. (2005) Decreased asialotransferrin in cerebrospinal fluid of patients with Childhood-onset ataxia and central nervous system hypomyelination/Vanishing white matter disease. *Clin Chem* 51: 2031–42.
- Vanderver A, Hathout Y, Malekovic J, Gordon ES, Mintz M, et al. (2008) Sensitivity and specificity of decreased CSF asialotransferrin for eIF2B-related disorder. *Neurology* 70: 2226–32.
- Fogli A, Schiffmann R, Hugendubler L, Combes P, Bertini E, et al. (2004) Decreased guanine nucleotide exchange factor activity in eIF2B-mutated patients. *Eur J Hum Genet* 12: 561–6.
- Gomez E, Pavitt GD (2000) Identification of domains and residues within the epsilon subunit of eukaryotic translation initiation factor 2B (eIF2Bepsilon) required for guanine nucleotide exchange reveals a novel activation function promoted by eIF2B complex formation. *Mol Cell Biol* 20: 3965–76.
- Neitzel H (1986) A routine method for the establishment of permanent growing lymphoblastoid cell lines. *Hum Genet* 73: 320–36.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: OBT AF. Performed the experiments: LH AH MCC AF. Analyzed the data: LO RS PB OBT AF. Contributed reagents/materials/analysis tools: CG. Wrote the paper: RS OBT AF.

DEUXIEME PARTIE:
CONSEQUENCES FONCTIONNELLES
DES MUTATIONS DU FACTEUR
eIF2B

I. Etude de la réponse UPR dans les lymphoblastes de patients porteurs de mutations du facteur eIF2B

A. Contexte scientifique

Il est établi que le facteur eIF2B est impliqué dans la régulation de l'initiation de la traduction au cours de stress cellulaires divers (traumatisme crânien, infections virales, etc). De la même manière que lors d'un stress, nous avons vu que les mutations du facteur eIF2B induisent une diminution de son activité GEF dans les llb des patients, ceci nous conduisant tout d'abord à émettre l'hypothèse d'un état de **stress permanent** dans ces cellules. Il a en effet été rapporté une sensibilité anormale au stress dans des Fbs de patients porteurs de mutations du facteur eIF2B (Kantor et al., 2005) et dans une lignée oligodendrogliale de rat transformée par un gène *EIF2B5* humain muté (Kantor et al., 2008), ainsi que dans les cerveaux de patients porteurs de mutations du facteur eIF2B (van der Voorn et al., 2005; van Kollenburg et al., 2006). Si les mutations du facteur eIF2B induisent un état de stress cellulaire permanent, elles sensibiliseraient aussi de manière accrue ces cellules à un stress supplémentaire. En effet, une dégradation clinique des patients est observée à la suite d'infections virales, de traumatismes crâniens ou encore d'anesthésie générale ou de grossesse suggérant une susceptibilité aux stress des patients atteints d'eIF2B-pathie, cette susceptibilité étant plus visible chez les patients ayant une forme adulte de la maladie.

B. Méthodologie

L'objet de notre travail a donc été d'évaluer l'**hyper-activation de la réponse UPR dans les llb de patients avec eIF2B-pathies**. Ces llb mutés sont les seules cellules de patients à exprimer une diminution significative de l'activité GEF du facteur eIF2B. Nous avons donc étudié l'activation transcriptionnelle et traductionnelle de la réponse UPR dans ces cellules. Pour cela, les llb d'une cohorte de 12 patients porteurs de mutations du facteur eIF2B ont été soumis ou non à un **stress du RE**. La réponse transcriptionnelle de quatre gènes de la réponse UPR (*ATF4*, *CHOP*, *ASNS* et *GRP78/BiP*) a été étudiée par PCR quantitative et l'activation traductionnelle de la protéine ATF4 a été analysée en collaboration avec le laboratoire du Dr. Orna Elroy-Stein (Tel Aviv University, Israel) en conditions basales et suite au stress du RE induit à la thapsigargine.

C. Résultats et discussion

La mesure de l'activité GEF a tout d'abord été réalisée dans les llb des 12 patients mutés de la cohorte et de 6 contrôles. Ceci a permis de confirmer une diminution significative de l'activité GEF dans les llb des patients (allant de 40 à 78%) en comparaison des llb des sujets contrôles.

L'effet des mutations du facteur eIF2B a tout d'abord été évalué sur le **taux global de synthèse protéique** dans les llb de 11 patients de la cohorte en comparaison des sujets sains en présence ou non de thapsigargine (inducteur d'un stress du RE). Aucune différence entre contrôles et patients n'a pu être mise en évidence quelle que soit la condition testée.

L'effet des mutations du facteur eIF2B a ensuite été analysé sur la **réponse transcriptionnelle et traductionnelle au stress du RE** médiée par le facteur de transcription ATF4 dans les llb des 12 patients et de sujets sains en absence ou présence d'un stress du RE. Aucune hyper-activation traductionnelle de la protéine ATF4 n'est retrouvée dans les llb des patients en comparaison des llb des sujets sains que ce soit en conditions basales ou suite au stress du RE. De plus, la mesure de l'activation transcriptionnelle des quatre gènes *ATF4*, *CHOP*, *ASNS* et *GRP78/BiP* par PCR quantitative n'a également pas montré d'activation anormale de la réponse UPR dans les llb des patients atteints d'eIF2B-pathie en comparaison des sujets sains quel que soit l'état stressé ou non des cellules. Il est intéressant de noter qu'il existe une **variabilité interindividuelle** des réponses transcriptionnelle et traductionnelle dans le groupe des contrôles mais aussi chez les patients.

Ces résultats montrent que les llb mutés pour le facteur eIF2B ne diffèrent pas de façon significative des llb normaux dans leur réponse au stress du RE médiée par ATF4 quelles que soient les conditions de stress et ce malgré leur capacité à exprimer une diminution de l'activité GEF du facteur eIF2B. Ceci est donc en désaccord avec les précédentes études menées dans les Fbs primaires ou dans les cerveaux de patients (van der Voorn et al., 2005; Kantor et al., 2005).

L'une des explications possibles de cette différence entre Fbs primaires et llb de patients dans l'hyper-activation de la réponse UPR est l'immortalisation des lymphocytes par le virus EBV. En effet, Kantor *et al.* ont démontré que la transformation des Fbs de patients eIF2B-mutés avec l'antigène SV40 large-T abolissait l'hyper-activation de la réponse UPR identifiée dans les Fbs primaires de ces mêmes patients (Kantor et al., 2005).

Ainsi, nous avons testé cette hypothèse en analysant l'induction de la réponse au stress du RE, dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment, dans les **llb en comparaison des lymphocytes non transformés** de 4 patients avec eIF2B-pathie et de 3 contrôles sains. L'induction de la réponse UPR a été mesurée dans ces cellules par la mesure de l'activation transcriptionnelle des quatre gènes *ATF4*, *CHOP*, *ASNS* et *GRP78/BiP* par PCR quantitative. Suite à un stress du RE, l'expression de ces quatre gènes est activée dans les deux types cellulaires avec une expression dans les lymphocytes primaires de l'ordre de 2 à 12 fois plus importante que dans les llb. Mais la comparaison des cellules de patients atteints *versus* contrôles ne montre **pas de différence dans cette activation transcriptionnelle**.

Les modifications cellulaires induites dans les llb par l'immortalisation à l'EBV ne sont donc pas responsables de l'absence de réponse différentielle au stress du RE entre les cellules contrôles et les cellules eIF2B-mutées.

Nos résultats sont en accord avec ceux de van Kollenburg *et al.*, qui ont décrit une **absence de réponses anormales des llb** de patients eIF2B-mutés en comparaison de llb contrôles suite à l'établissement d'un stress de type choc thermique (42°C pendant 1 heure) (van Kollenburg *et al.*, 2006).

D. Conclusion

L'activation anormale de la **réponse au stress cellulaire** paraît donc être **cellule-dépendante**. La transformation des lymphocytes de patients porteurs de mutations eIF2B en llb induit une activation de leur cycle cellulaire leur permettant d'avoir un taux de renouvellement rapide. Nos résultats démontrent que ces cellules, malgré leur taux diminué d'activité GEF, **répondent normalement au stress du RE** ce qui suggère qu'elles ne sont pas aussi vulnérables au stress que des cellules qui se divisent moins rapidement comme les Fbs. Dans cette optique, nous pouvons donc formuler l'hypothèse qu'au cours du développement, les cellules qui sont en **division active** ne seraient **pas ou peu sensibles aux stress** et que les **cellules matures seraient plus susceptibles aux stress** de part leur caractère de cellules quiescentes. Dans le SNC, les cellules gliales et neuronales sont hautement différenciées et se renouvellent très peu. Les mutations du facteur eIF2B rendraient donc ces cellules plus susceptibles aux stress induisant ainsi une dysrégulation de leur réponse cellulaire ce qui pourrait être à l'origine de la dégradation et la perte de la myéline observée chez les patients après des infections virales bénignes ou des traumatismes crâniens.

Ainsi les I1b, à la différence des Fbs primaires, ne semblent donc pas être un modèle de choix pour l'étude des **conséquences fonctionnelles cellulaires** des mutations du facteur eIF2B.

PUBLICATION N°2

Horzinski L., Kantor L., **Huyghe A.**, Schiffmann R., Elroy-Stein O., Boespflug-Tanguy O., Fogli A. Evaluation of the endoplasmic reticulum-stress response in eIF2B-mutated lymphocytes and lymphoblasts from CACH/VWM patients. (2010) BMC Neurology 10 : 94.

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Evaluation of the endoplasmic reticulum-stress response in eIF2B-mutated lymphocytes and lymphoblasts from CACH/VWM patients

Laetitia Horzinski^{1,2}, Liraz Kantor³, Aurélie Huyghe^{1,2}, Raphael Schiffmann⁴, Orna Elroy-Stein³, Odile Boespflug-Tanguy^{1,2,5}, Anne Fogli^{1,2,6*}

Abstract

Background: Eukaryotic translation initiation factor 2B (eIF2B), a guanine nucleotide exchange factor (GEF) and a key regulator of translation initiation under normal and stress conditions, causes an autosomal recessive leukodystrophy of a wide clinical spectrum. EBV-immortalised lymphocytes (EIL) from eIF2B-mutated patients exhibit a decrease in eIF2B GEF activity. eIF2B-mutated primary fibroblasts have a hyper-induction of activating transcription factor 4 (ATF4) which is involved in the protective unfolded protein response (UPR), also known as the ER-stress response. We tested the hypothesis that EIL from eIF2B-mutated patients also exhibit a heightened ER-stress response.

Methods: We used thapsigargin as an ER-stress agent and looked at polysomal profiles, rate of protein synthesis, translational activation of *ATF4*, and transcriptional induction of stress-specific mRNAs (*ATF4*, *CHOP*, *ASNS*, *GRP78*) in normal and eIF2B-mutated EIL. We also compared the level of stress-specific mRNAs between EIL and primary lymphocytes (PL).

Results: Despite the low eIF2B GEF activity in the 12 eIF2B-mutated EIL cell lines tested (range 40-70% of normal), these cell lines did not differ from normal EIL in their ATF4-mediated ER-stress response. The absence of hyper-induction of ATF4-mediated ER-stress response in eIF2B-mutated EIL in contrast to primary fibroblasts is not related to their transformation by EBV. Indeed, PL exhibited a higher induction of the stress-specific mRNAs in comparison to EIL, but no hyper-induction of the UPR was noticed in the eIF2B-mutated cell lines in comparison to controls.

Conclusions: Taken together with work of others, our results demonstrate the absence of a major difference in ER-stress response between controls and eIF2B-mutated cells. Therefore, components of the ER-stress response cannot be used as discriminatory markers in eIF2B-related disorders.

Background

The eukaryotic initiation factor 2B (eIF2B) is a ubiquitously expressed protein with guanine nucleotide exchange factor (GEF) activity that is involved in the translation initiation step by activating the eIF2 factor. Mutations in any one of the *EIF2B1-5* genes [SwissProt: Q14232, P49770, Q9NR50, Q9UI10, Q13144], encoding the five eIF2B subunits, have been initially described in an autosomal recessive form of inherited

disorders, the childhood ataxia with central hypomyelination (CACH)/Vanishing white matter (VWM) syndrome [1-4]. This leukoencephalopathy is characterized in infants by a progressive neurological deterioration exacerbated by episodes of stress and a cerebrospinal fluid (CSF)-like signal intensity of the WM on brain magnetic resonance imaging (MRI) [1,2]. The use of a typical MRI pattern to select patients with undetermined leukodystrophies for *EIF2B1-5* genes analysis demonstrated the wide clinical *spectrum* of eIF2B-mutated patients from congenital and rapidly lethal forms to slowly progressive or even asymptomatic adult forms associated in some cases with ovarian failure [5,6]. The

* Correspondence: anne.fogli@inserm.u-clermont1.fr

¹INSERM U931-CNRS 6247-Génétique, Reproduction et Développement (GRéD)-Faculté de Médecine, Clermont-Ferrand, France

Full list of author information is available at the end of the article

need for a reliable and quick diagnostic marker, useful to select patients eligible for *EIF2B1-5* sequencing became obvious.

eIF2B is a key regulator of the translation initiation step by its nucleotide guanine exchange activity (GEF activity) that converts the eIF2 factor from an inactive GDP-bound form to an active GTP-bound form followed by initiation of the first step of the translation process. We previously reported a decrease eIF2B GEF activity in Epstein-Barr virus (EBV)-immortalised lymphocytes (EIL, or lymphoblasts) from patients with eIF2B-related disorder that seemed to correlate with disease severity [7]. eIF2B GEF activity is subjected to diverse modes of regulation. One of the inhibitory mechanisms is mediated by phosphorylation of Ser 51 of eIF2 α subunit by four specific kinases (PERK, GCN2, PKR and HRI), each of which is activated by specific stress conditions including endoplasmic reticulum (ER)-stress [8]. eIF2 phosphorylation mediates the inhibition of eIF2B, leading to reduction of global translation initiation which is accompanied by translational activation of specific sub-class of mRNAs encoding rescue proteins. One example is translational induction of the mRNA encoding activating transcription factor 4 (ATF4) under stress conditions.

ATF4-mediated heightened stress response was demonstrated in several eIF2B-mutated models [9-16]. In yeast, it has been shown that eIF2B mutations induce a decrease of eIF2B GEF activity, leading to the translation activation of *GCN4* mRNA, the yeast homolog of ATF4 involved in stress regulation [10,11]. Later on, heightened ER-stress response mediated by hyper-induction of ATF4 was observed in primary fibroblasts from eIF2B-mutated patients [9], and in rat oligodendroglial-derived cells expressing mutated human *EIF2B5* gene [12]. Similarly, increased levels of ER-stress markers were detected in cerebral white matter from eIF2B-mutated patients [13,14]. Surprisingly, although eIF2B mutations render the mutated cells hyper-sensitive to stress, eIF2B GEF activity was not significantly decreased in most of the above mentioned cell types. The only human cell lines exhibiting a measurable decrease of eIF2B GEF activity were lymphoblasts from eIF2B-mutated patients [7,16]. A single study reported stress-related differences between control and eIF2B-mutated patient's EIL: mutated EIL lost their ability to respond to heat stress by eIF2 α phosphorylation, suggesting a lack of inhibition of eIF2B GEF activity under stress conditions [17] leading to a potentially disturbed cellular response.

In the current study, we tested the hypothesis that EIL from eIF2B-mutated patients would also express a heightened ER-stress response that would be useful in understanding the mechanism of the disease. For this

purpose, we compared the effect of ER-stress on eIF2B-mutated and control EIL by looking at i) polysomal profiles; ii) rate of protein synthesis; iii) translational induction of *ATF4* mRNA; and iv) transcriptional induction of mRNA encoding ATF4, C/EBP-Homologous Protein (CHOP), Asparagine synthetase (ASNS) and Glucose-Regulated protein 78 kDa (GRP78).

Methods

Selection of patients and generation of lymphoblasts

Fourteen eIF2B-mutated patients from 13 affected families were selected according to age at disease onset (from age 0.8 to 16 years) and type of eIF2B mutations (Table 1) [16], in comparison to nine age- and sex-matched healthy patients used as controls. An Institutional Review Board of the participating centers (Comité de Protection des Personnes Sud-Est VI, 2009-A00188-49) approved the use of human subjects for this study. A written informed consent was obtained from all patients.

Patients' lymphocytes (PL) were immortalized with the Epstein-Barr virus (EBV) according to classical procedures [18].

Twelve eIF2B-mutated EIL were used to compare the protein and transcript expression after ER-stress, in comparison to six associated control EIL. PL and EIL from four eIF2B-mutated patients (Table 1) were used to analyze the impact of PL immortalization on the transcript ER-stress response, in comparison to PL and EIL from three healthy controls (C1, C2, 1283-1).

eIF2B GEF activity

The GEF activity of eIF2B was measured in triplicate as previously described [7].

ER-stress induction

Patients' EIL and PL were incubated with 0.5, 1 or 2 μ g/ml Thapsigargin (Tg) for 4 h or 1.5 h at 37°C, harvested just after the treatment or submitted to recovery for 1 h, 3 h, 6 h, 12 h, 15 h, 18 h or 24 h under normal.

Global protein synthesis rate and polysomal profiles

Global protein synthesis rates were determined as described previously [19] by using EIL incubated in the absence or presence of 2 μ g/ml Tg for 1 hour for labeling with [³⁵S]-methionine/[³⁵S]-L-cysteine mix for 20 min. Polysomal profiles were performed on 0-50% sucrose gradients according to Sivan *et al.* [19] using 1×10^7 EIL per gradient.

Immunodetection of ATF4

Western blot analysis of ATF4 was performed as previously described [9] using EIL, incubated in the absence or presence of 2 μ g/ml Tg for 4 hours.

Table 1 List of the eIF2B-mutated patients selected for this study

Patients' number	DNA mutation (<i>mutated gene</i>)	Protein mutation	GEF activity (%)
569-3	c.338G > A/c.766-1G > A (<i>EIF2B5</i>)	p.Arg113His/p.256_281del	40 ± 2
571-1	c.166T > G/c.944G > A (<i>EIF2B5</i>)	p.Phe56Val/p.Arg315His	40 ± 3
357-2	c.406C > T/c.1015C > T(<i>EIF2B5</i>)	p.Arg136Cys/p.Arg339Trp	44.5 ± 4.5
1078-1	c.407G > A/c.407G > A (<i>EIF2B5</i>)	p.Arg136His/p.Arg136His	49.6 ± 5.7
432-2	c.271A > G/c.1015C > T (<i>EIF2B5</i>)	p.Thr91Ala/p.Arg339Trp	53.9 ± 0,9
522-1	c.47C > A/c.338G > A (<i>EIF2B5</i>)	p.Ala16Asp/p.Arg113His	54 ± 6
648-1*	c.638A > G/c.638A > G (<i>EIF2B2</i>)	p.Glu213Gly/p.Glu213Gly	59 ± 1
648-2*	c.638A > G/c.638A > G (<i>EIF2B2</i>)	p.Glu213Gly/p.Glu213Gly	64 ± 4
1014-1	c.338G > A/c.583C > T(<i>EIF2B5</i>)	p.Arg113His/p.Arg195Cys	68 ± 4
338-1	c.338G > A/c.338G > A (<i>EIF2B5</i>)	p.Arg113His/p.Arg113His	75.2 ± 1.5
370-2	c.338G > A/c.584G > A(<i>EIF2B5</i>)	p.Arg113His/p.Arg195His	77 ± 2.5
630-1	c.338G > A/c.338G > A (<i>EIF2B5</i>)	p.Arg113His/p.Arg113His	77.5 ± 2.5
1241-1*	c.338G > A/c.338G > A (<i>EIF2B5</i>)	p.Arg113His/p.Arg113His	NA
807-1*	c.338G > A/c.338G > A (<i>EIF2B5</i>)	p.Arg113His/p.Arg113His	67 ± 4.3

The clinical and genetic status of these patients has previously been described [16]. Patients' lymphoblasts were used to quantify the protein and transcript expression of the ER-stress genes in comparison to associated controls. * Patients for whom ER-stress responses were compared between lymphoblasts and lymphocytes.

NA: not available.

Table adapted from Horzinski et al. [16]

Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction (QRT-PCR)

Total RNA was extracted from pellets of $15 \cdot 10^6$ cells using TRIZOL solution (Invitrogen Life Technology) according to classical procedures. One μg RNA was subjected to RT, performed in duplicate, with 0.5 mM dNTP, 0.025 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ oligodT, 1 \times First Strand Buffer, 10 mM DTT, 40 U Rnase Out and 200 U SuperScript^{III} Rnase H-Reverse Transcriptase (Invitrogen) at 42°C during 1 h then 70°C during 15 min. Quantitations of *ATF4*, *CHOP*, *ASNS*, *GRP78* and $\beta 2$ -*microglobulin* (*B2M*) mRNA levels were carried-out in duplicate on Light Cycler (Roche) using the SybrGreen technology and the specific set of primers: *ATF4*-F: 5'-CCCC TTCACCTTCTTACAACC-3'; *ATF4*-R: 5'-GGGCTCA TACAGATGCCACAT-3'; *CHOP*-F: 5'-CAGAACCAG CAGAGGTCACA 3'; *CHOP*-R: 5'-AGCTGTGCCAC TTTCCTTTC-3'; *GRP78*-F: 5'-GGTTGATTATCAGA AGCTGTAG-3'; *GRP78*-R: 5'-CGTATGGTGCTGCT GTCCAGG-3'; *ASNS*-F: 5'-ATCACTGTCGGGAT-GAACCC-3'; *ASNS*-R: 5'-CTTCAACAGAGTGGCAG-CAA-3'; *B2M*-F: 5'-TGTCTTTCAGCAAGGACTGG-3'; *B2M*-R: 5'-TTCTCTGCTCCCCACCTCTA-3'. One μl of 1:10 cDNA dilution was amplified with 1 \times LightCycler FastStart Reaction Mix (Roche), 3 mM MgCl_2 and 0.5 mM of each primer in a final volume of 15 μl . The program included an initial denaturation (95°C, 10 min) followed by 45 cycles of 95°C for 10 seconds, 60°C for 30 seconds and 72°C for 30 seconds. The cycle of threshold value (Ct) was used to calculate the relative expression

of the genes of interest *ATF4*, *CHOP*, *ASNS* or *GRP78*, normalized to $\beta 2M$.

Results

Effects of eIF2B mutations on eIF2B GEF activity and on the translation rates in lymphoblasts

eIF2B GEF activities measured in the 12 eIF2B-mutated EIL were significantly lower (range 40%-78% of normal) in comparison to the six controls. However, the translational machineries of both normal and mutated EIL were inhibited to the same extent by the presence of the ER-stress agent, as judged by the incorporation rate of [³⁵S]L-methionine/[³⁵S]L-cysteine which was reduced to 40 ± 5% or 39 ± 3% for patients or control EIL, respectively; and by the similar decrease in heavy polysomes (data not shown).

These results demonstrate the absence of significant effect of eIF2B mutations on the intensity of the ER-stress response despite decrease eIF2B GEF activity.

Effects of eIF2B mutations on the ER-stress response mediated by ATF4 in lymphoblasts

Next, we evaluated the impact of stress response by measuring ATF4 protein level in EIL incubated for 4 hours in the presence or absence of 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Tg. As expected, an increase in ATF4 protein expression was found under ER-stress conditions (Figure 1A). However, no differences were observed between controls and eIF2B-mutated EIL, in ATF4 basal levels and ATF4 induced upon ER-stress. In the Tg-treated EIL, an

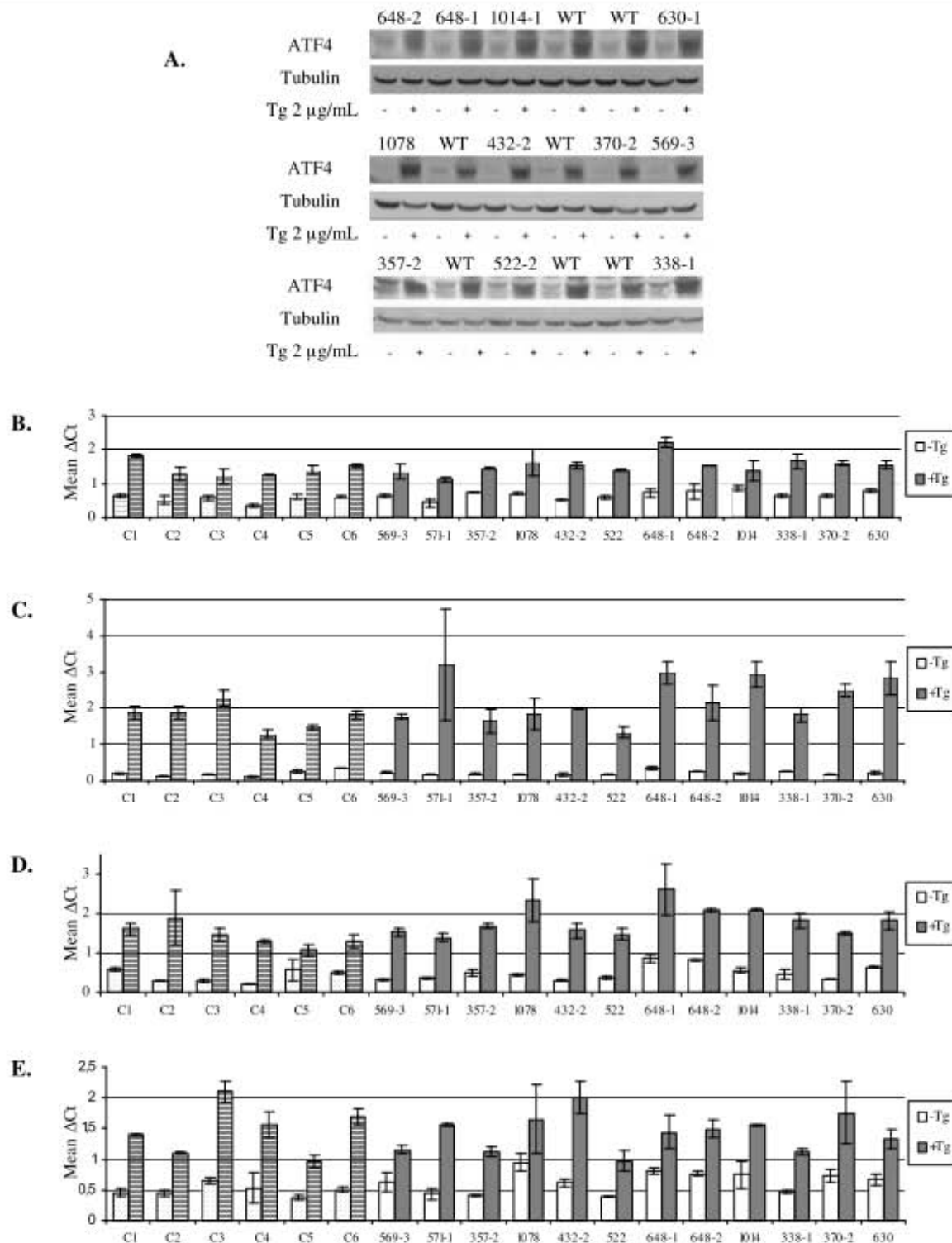


Figure 1 Expression level of ATF4 protein and four mRNA markers of the ER-stress response in lymphoblasts from eIF2B-mutated patients. **(A)** ATF4 protein induction (Western-blot); WT: control individuals; (+), (-): with or without 4 h thapsigargin (Tg) treatment. **(B-E)** Expression levels of ATF4 **(B)**, CHOP **(C)**, ASNS **(D)** and GRP78 **(E)** mRNA determined by quantitative real-time polymerase chain reaction; from eIF2B-mutated patients (non-stippled bars), control individuals (stippled bars); under normal conditions (white bars) or following 4 h Tg treatment (grey bars); mean ΔC_t values: mean C_t values of genes of interest corrected for the C_t value of the $\beta 2M$ gene.

expected significant increase in the level of *ATF4*, *CHOP*, *ASNS* and *GRP78* mRNAs was also observed, which was similar in normal and eIF2B-mutated EIL, confirming the comparable activation of the ER-stress response in the two cell types (Figure 1B-E). An inter-individual variability was high in stressed as well as non-stressed cells, and no significant differences between controls and patients were observed. Moreover, we did not find any correlation between the rate of eIF2B GEF activity and the level of ATF4 translational induction or transcriptional activation of *ATF4*, *CHOP*, *ASNS* and *GRP78*. Likewise, other ER-stress conditions (0.5 or 1 µg/ml Tg for 4 h or 1.5 h) before or after different recovery times (1 h, 3 h, 6 h, 12 h, 15 h, 18 h and 24 h) did not result in any significant difference in the intensity of the stress response between eIF2B-mutated and non-mutated EIL (data not shown).

Effect of the EBV immortalization on the ER-stress response mediated by ATF4

As primary eIF2B-mutated fibroblasts exhibit heightened ER-stress response mediated by hyper-induction of ATF4 [6], a possible explanation for the lack of difference between eIF2B-mutated and normal EIL on the ER-stress activation could be the immortalization of the PL by EBV. Therefore, we evaluated the impact of EBV immortalization on ER-stress response by comparing EIL and PL from four eIF2B-mutated patients (Table 1) and three healthy individuals using the same stress induction procedure. We found an expected increase in the level of *ATF4*, *CHOP*, *ASNS* and *GRP78* mRNA in all the cells, but it was more profound in PL (Figure 2). No significant differences were found in the activation of ER-stress response between eIF2B-mutated and control PL, as was demonstrated in EIL (Figure 1), and extended here to PL (Figure 2). Therefore, modifications induced by EBV-immortalization of PL are not responsible for the absence of differential ER-stress response between eIF2B-mutated and control cells.

Together, these results show that the eIF2B-mutated EIL or PL do not differ from normal cells in their ATF4-mediated ER-stress response induced by Tg despite the low eIF2B GEF activity found in mutated EIL.

Discussion

In the present study, we evaluated the ER-stress response pathway mediated by ATF4 in eIF2B-mutated EIL in comparison to control cells. Our results confirmed that eIF2B activity was reduced in mutated EIL, but without significant hyperactivation of the UPR pathway. However, an abnormal heightened stress response was identified earlier in patients' brains [13] and in primary fibroblasts [9]. Cells from the same four patients (1048-1, 432-2, 522-1 and 1241-1) were analysed in this

study and in the Kantor *et al.* paper [9]. We previously demonstrated that transformation of primary fibroblasts from eIF2B-mutated patients by SV40 large-T antigen abolished the heightened stress response identified in eIF2B-mutated compared to normal fibroblasts [9]. Accordingly, we anticipated that EBV-transformation may abolish the possible hyper-sensitivity of eIF2B-mutated lymphocytes to ER-stress agents. EBV-transformation activates cyclin D2 and additional proteins involved in cell cycle progression, including E2Fs, pRb and BCL-2, reflecting cellular resistance to apoptosis [20]. Moreover, lymphoblasts have a modified metabolism towards an anti-apoptotic phenotype, exerted by EBV antigen 3A (*EBNA3A*)-mediated induction of protective chaperones and co-chaperones such as Hsp70 [21]. In contrast to our prediction, we found that EBV-transformation of PL is not responsible for the absence of the anticipated heightened ER-stress response of eIF2B-mutated compared to control PL. However, EBV-transformation did reduce the strength of the ER-stress response in both cell types, as demonstrated by the higher induction of ATF4 and GRP78 in PL compared to EIL (Figure 2).

Our data are in agreement with results of van Kollenburg *et al.* [17], who studied stress-related differences between eIF2B-mutated and normal lymphoblasts after heat shock and who found a lesser increase in eIF2 α phosphorylation in patients' EIL in response to the heat-shock. Although the experimental variables involved in the current study do not allow to reproducibly pick subtle changes in eIF2 α phosphorylation level, even a slight eIF2 α hypo-phosphorylation response may explain the absence of heightened ER-stress response in eIF2B-mutated PL and EIL used here. None of the mutations studied here correspond to mutations in yeast previously shown to render eIF2B resistant to the effects of eIF2 α phosphorylation [10,11,15]. Immortalization of mouse fibroblasts was found to increase eIF2B expression leading to increased GEF activity and to reduced sensitivity to eIF2 phosphorylation [22]. We therefore hypothesize that eIF2 expression is increased in EIL in comparison to PL, making i) the GEF assay more robust in EIL in which differences in GEF activity between control and eIF2B-mutated patients are more easily discerned, and ii) EIL are less sensitive to increased eIF2 phosphorylation following UPR in comparison to PL [22]. Further analyses are needed to determine if the normal ER-stress response found in eIF2B-mutated EIL despite a low eIF2B GEF activity is also a trait of other non-transformed, yet actively dividing eIF2B-mutated cells during the course of development. This could contribute to the observation of a cell fate impairment restricted to glial cell development in the large majority of eIF2B-mutated patients [23].

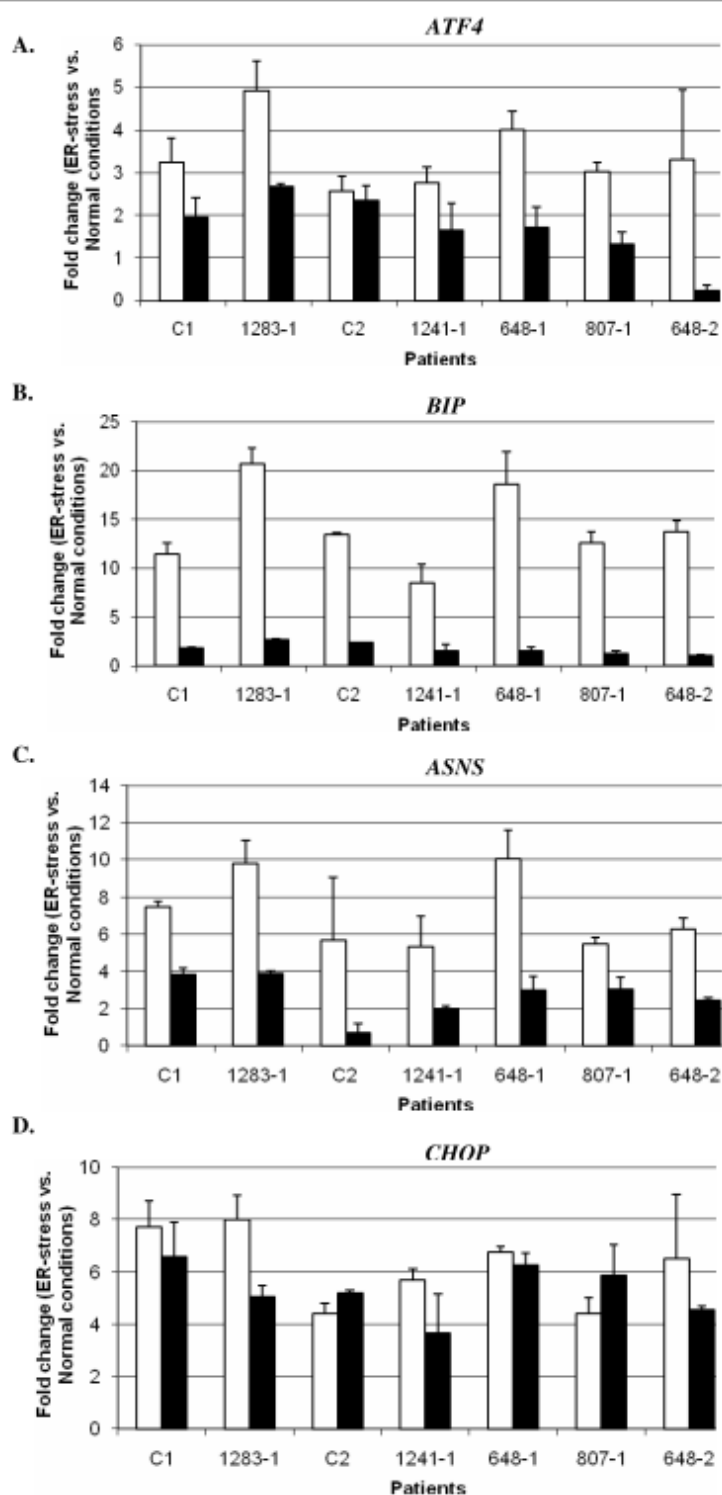


Figure 2 Effect of the lymphocytes EBV-transformation on the expression level of the four mRNA markers of the ER-stress response. Thapsigargin (incubation with Thapsigargin (Tg) at 2 µg/ml for 4 h) was used to induce ER-stress in lymphoblastoid cell lines (EIL, black bars) and primary lymphocytes (PL, white bars) from control (C1, C2 and 1283-1) and eIF2B-mutated (1241-1, 807-1, 648-1 and 648-2) patients. Expression levels of *ATF4* (A), *GRP78* (B), *ASNS* (C) and *CHOP* (D) mRNA were determined by quantitative real-time polymerase chain reaction. The level of each transcript was calculated using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method, followed by normalization of the primary Ct data to beta2M level. Results are shown as fold-change between ER-stress (Tg incubation) compared to normal conditions.

Conclusions

Lymphoblasts generated from patients' blood samples demonstrated a decrease in eIF2B GEF activity, a test already proposed for the diagnostic screening and prognosis of eIF2B-related disorders. However, measurement of EIL and PL ER-stress response did not show any differences between eIF2B-mutated and control cells and therefore is not useful as a supplementary test to improve diagnosis.

Acknowledgements

The authors thank the European Leukodystrophy Association (ELA), grant 2005-2007 (project #11).

Author details

¹INSERM U931-CNRS 6247-Génétique, Reproduction et Développement (GRéD)-Faculté de Médecine, Clermont-Ferrand, France. ²Université Clermont1, UFR Médecine, Clermont-Ferrand, France. ³Department of Cell Research and Immunology, George S. Wise Faculty of Life Sciences, Tel-Aviv University, Tel-Aviv, Israel. ⁴Institute of Metabolic Disease, Baylor Research Institute, Dallas, Texas, USA. ⁵CHU de Clermont-Ferrand, Service de Génétique Médicale, Centre de Référence Leucodystrophies, Hôpital Hôtel-Dieu, F-63058 Clermont-Ferrand, France. ⁶CHU de Clermont-Ferrand, Service de Biochimie Médicale et Biologie Moléculaire, Clermont-Ferrand, France.

Authors' contributions

LH performed stress assay and carried out the mRNA analysis of EIL. LK performed stress assay and carried out the protein analysis of EIL. AH participated to the cell culture. RS performed the clinical diagnosis of eIF2B-mutated patients, provided fibroblasts and helped to draft the manuscript. OES participated in the design of the study and helped to draft the manuscript. OBT participated in the design of the study, performed the clinical diagnosis of eIF2B-mutated patients, provided fibroblasts and helped to draft the manuscript. AF performed stress assay and carried out the mRNA analysis of PL in comparison to EIL, participated in the design of the study and helped to draft the manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 7 April 2010 Accepted: 19 October 2010

Published: 19 October 2010

References

- Schiffmann R, Moller JR, Trapp BD, Shih HH, Farrer RG, Katz DA, et al: Childhood ataxia with diffuse central nervous system hypomyelination. *Ann Neurol* 1994, **35**:331-40.
- van der Knaap MS, Barth PG, Gabreëls FJ, Franzoni E, Begeer JH, Stroink H, Rotteveel JJ, Valk J: A new leukoencephalopathy with vanishing white matter. *Neurology* 1997, **48**:845-55.
- Leegwater PA, Vermeulen G, Könst AA, Naidu S, Mulders J, Visser A, Kersbergen P, Mobach D, Fonds D, van Berkel CG, Lemmers RJ, Frants RR, Oudejans CB, Schutgens RB, Pronk JC, van der Knaap MS: Subunits of the translation initiation factor eIF2B are mutant in leukoencephalopathy with vanishing white matter. *Nat Genet* 2001, **29**:383-88.
- van der Knaap MS, Leegwater PA, Könst AA, Visser A, Naidu S, Oudejans CB, Schutgens RB, Pronk JC: Mutations in each of the five subunits of translation initiation factor eIF2B can cause leukoencephalopathy with vanishing white matter. *Ann Neurol* 2002, **51**:264-70.
- Fogli A, Rodriguez D, Eymard-Pierre E, Bouhour F, Labauge P, Meaney BF, Zeesman S, Kaneski CR, Schiffmann R, Boespflug-Tanguy O: Ovarian failure related to eukaryotic initiation factor 2B mutations. *Am J Hum Genet* 2003, **72**:1544-50.
- Fogli A, Boespflug-Tanguy O: The large spectrum of eIF2B-related disease. *Biochem Soc Trans* 2006, **34**:22-29.

- Fogli A, Schiffmann R, Hugendubler L, Combes P, Bertini E, Rodriguez D, Kimball SR, Boespflug-Tanguy O: Decreased guanine nucleotide exchange factor activity in eIF2B-mutated patients. *Eur J Hum Genet* 2004, **12**:561-6.
- Pavitt GD, Ramaiah KV, Kimball SR, Hinnebusch AG: eIF2 independently binds two distinct eIF2B subcomplexes that catalyze and regulate guanine-nucleotide exchange. *Genes Dev* 1998, **12**:514-26.
- Kantor L, Harding HP, Ron D, Schiffmann R, Kaneski CR, Kimball SR, Eitoy-Stein O: Heightened stress response in primary fibroblasts expressing mutant eIF2B genes from CACH/WWM leukodystrophy patients. *Hum Genet* 2005, **118**:99-106.
- Richardson JP, Mohammad SS, Pavitt GD: Mutations causing childhood ataxia with central nervous system hypomyelination reduce eukaryotic initiation factor 2B complex formation and activity. *Mol Cell Biol* 2004, **24**:2352-63.
- Li W, Wang X, van der Knaap MS, Proud CG: Mutations linked to leukoencephalopathy with vanishing white matter impair the function of the eukaryotic initiation factor 2B complex in diverse ways. *Mol Cell Biol* 2004, **24**:3295-306.
- Kantor L, Pinchasi D, Mintz M, Hathout Y, Vanderver A, Eitoy-Stein O: A point mutation in translation initiation factor 2B leads to a continuous hyper stress state in oligodendroglial-derived cells. *PLoS ONE* 2008, **3**: e3783, Epub 2008 Nov 21.
- van der Voorn JP, van Kollenburg B, Bertrand G, Van Haren K, Scheper GC, Powers JM, van der Knaap MS: The unfolded protein response in vanishing white matter disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 2005, **64**:770-5.
- van Kollenburg B, van Dijk J, Garberm J, Thomas AA, Scheper GC, Powers JM, van der Knaap MS: Glia-specific activation of all pathways of the unfolded protein response in vanishing white matter disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 2006, **65**:707-15.
- Pavitt GD, Proud CG: Protein synthesis and its control in neuronal cells with a focus on vanishing white matter disease. *Bioch Soc Trans* 2009, **37**:1298-1310.
- Horzinski L, Huyghe A, Cardoso MC, Gonthier C, Ouchchane L, Schiffmann R, Blanc P, Boespflug-Tanguy O, Fogli A: Eukaryotic initiation factor 2B (eIF2B) GEF activity as a diagnostic tool for EIF2B-related disorders. *Plos One* 2009, **4**:e8318.
- van Kollenburg B, Thomas AA, Vermeulen G, Bertrand GA, van Berkel CG, Pronk JC, Proud CG, van der Knaap MS, Scheper GC: Regulation of protein synthesis in lymphoblasts from vanishing white matter patients. *Neurobiol Dis* 2006, **21**:496-504.
- Neitzel H: A routine method for establishment of permanent growing lymphoblastoid cell lines. *Hum Genet* 1986, **73**:320-6.
- Sivan G, Kedersha N, Eitoy-Stein O: Ribosomal slowdown mediates translational arrest during cellular division. *Mol Cell Biol* 2007, **27**:6639-46.
- Young P, Anderton E, Paschos K, White R, Allday MJ: Epstein-Barr virus nuclear antigen (EBNA) 3A induces the expression of and interacts with a subset of chaperones and co-chaperones. *J Gen Virol* 2008, **8**:866-77.
- Mosser DD, Caron AW, Bourget L, Meriin AB, Sherman MY, Morimoto RI, Massie B: The chaperone function of hsp70 is required for protection against stress-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 2000, **20**:7146-59.
- Balachandran S, Barber GN: Defective translational control facilitates vesicular stomatitis virus oncolysis. *Cancer Cell* 2004, **5**:51-65.
- Dietrich J, Lacagnina M, Gass D, Richfield E, Mayer-Pröschel M, Noble M, Torres C, Pröschel C: EIF2B5 mutations compromise GFAP+ astrocyte generation in vanishing white matter leukodystrophy. *Nat Med* 2005, **11**:277-83.

Pre-publication history

The pre-publication history for this paper can be accessed here:
<http://www.biomedcentral.com/1471-2377/10/94/prepub>

doi:10.1186/1471-2377-10-94

Cite this article as: Horzinski et al.: Evaluation of the endoplasmic reticulum-stress response in eIF2B-mutated lymphocytes and lymphoblasts from CACH/WWM patients. *BMC Neurology* 2010 **10**:94.

II. Etude transcriptomique différentielle des eIF2B-pathies

A. Contexte scientifique

Du fait de l'implication du facteur eIF2B dans l'initiation de la traduction et de ses régulations en cas de stress cellulaire, l'impact fonctionnel des mutations du facteur eIF2B s'est tout d'abord focalisé sur des études de mesure de son activité GEF et de la réponse aux stress cellulaires dans divers types de cellules (Fbs, llb, cellules oligodendrogiales) et dans des cerveaux de patients atteints d'eIF2B-pathie. Cependant, l'existence de formes congénitales et infantiles sévères touchant de nombreux organes (pancréas, foie, rein, œil) permet de suggérer qu'une anomalie plus générale du développement est impliquée dans les eIF2B-pathies ne pouvant être uniquement expliquée par un dysfonctionnement de la réponse aux stress. Une **anomalie de maturation des astrocytes** due à une mutation ou une sous-expression du gène *EIF2B5* a d'ailleurs été démontrée (Dietrich et al., 2005), confirmant ainsi l'hypothèse d'un **effet développemental**. Ensemble, ces résultats suggèrent que la perturbation de la différenciation des astrocytes aurait un effet délétère sur les OLS myélinisants contribuant ainsi à la perte de la SB chez les patients, perte qui serait accrue suite à un stress du fait de la sensibilité aux stress des cellules porteuses de mutations du facteur eIF2B. Mais les voies métaboliques conduisant à une telle anomalie développementale et expliquant la possible **susceptibilité au stress** des cellules porteuses de mutations eIF2B ne sont pas encore connues. Dans une deuxième approche d'étude fonctionnelle des mutations du facteur eIF2B, nous avons cherché à identifier les **voies métaboliques** en cause dans la physiopathologie des eIF2B-pathies par une **étude transcriptomique différentielle** dans les cellules de patients atteints.

B. Méthodologie

Pour des raisons évidentes, les cellules gliales cérébrales de patients ne sont pas disponibles pour une telle étude. Notre intérêt s'est donc directement porté sur les Fbs primaires de peau qui semblent être un bon modèle cellulaire en comparaison des llb (Kantor et al., 2005 ; publication 2) et représentent la diversité des mutations du facteur eIF2B. Nous avons donc utilisé ce type cellulaire pour analyser le transcriptome de 10 patients atteints de

formes sévères d'eIF2B-pathie (âge de début inférieur à 2 ans) en comparaison de 10 patients atteints d'autres types de LDs (AxD, MLC, maladie de Krabbe, syndrome de Sjögren-Larsson et PMD) et de sujets contrôles associés en sexe et en âge. Cette étude a été réalisée à l'état basal et suite à un stress du RE pharmacologiquement induit par la thapsigargine afin d'étudier l'impact du stress et les mécanismes physiopathologiques spécifiquement en cause dans les eIF2B-pathies.

C. Résultats et discussion

1. Effet du stress du RE

La comparaison par analyse de variance (ANOVA) du profil transcriptomique des Fbs des 10 patients atteints d'eIF2B-pathie avec celui des Fbs des patients atteints d'autres types de LDs nous a dans un premier temps permis d'observer que l'impact du stress du RE n'était pas significativement différent entre les eIF2B-pathies et les autres LDs. Ceci suggère ainsi que la **réponse au stress cellulaire n'est pas spécifique aux eIF2B-pathies** malgré l'implication du facteur eIF2B dans la régulation de l'initiation de la traduction en cas de stress cellulaire mais plus probablement une **réponse commune aux LDs**. Ce résultat semble au moins vrai pour les formes sévères débutant avant l'âge de 2 ans (seule forme représentée dans notre étude), bien que la réponse au stress dans des cellules telles que les Fbs ou les cellules cérébrales, principales atteintes dans cette pathologie, puisse être différente. Nous ne pouvons en revanche pas affirmer que ce résultat s'applique aux formes classiques et modérées puisque la physiopathologie de ces différentes formes cliniques apparaît de plus en plus variable.

Le stress cellulaire, facteur aggravant dans les eIF2B-pathies et la sclérose en plaques, a également été identifié comme précipitant les situations pathologiques dans d'autres LDs. Ainsi, dans la PMD, les mutations du gène *PLP1* affectant la conformation des protéines PLP et DM20 induisent un stress du RE et une activation de la voie UPR d'intensité semblant être corrélée avec la sévérité du phénotype (Southwood et al., 2002). Dans l'AxD, l'accumulation des protéines GFAP mutées associées à des HSP formant les FRs dans le cytoplasme des astrocytes des cerveaux de patients induit un stress oxydatif (Hagemann et al., 2006). De plus, l'accumulation d'acides gras à très longue chaîne dans l'ALD induirait également un stress oxydatif avec peroxydation des lipides dans les Fbs et plasma des patients (Vargas et al., 2004; Deon et al., 2007).

2. Identification de gènes et voies métaboliques en cause dans les eIF2B-pathies

Nous avons ensuite sélectionné les gènes qui étaient significativement différentiellement exprimés (FDR (False Discovery Rate) $\leq 0,12\%$) quelles que soient les conditions de stress testées entre les patients avec eIF2B-pathie et les patients sains d'une part ou ceux porteurs d'une autre LD d'autre part. Cette analyse nous a ainsi permis d'identifier **253 gènes** spécifiquement différentiellement exprimés dans les Fbs de patients atteints d'eIF2B-pathies. Parmi ces 253 gènes, **70 présentent un taux d'expression significatif** ($\leq 0,9$ ou $\geq 1,05$). De manière intéressante, 67 d'entre eux sont sous-exprimés et les 3 gènes sur-exprimés ne présentent qu'un taux faible de surexpression (1,06 et 1,07). Les gènes sous-exprimés sont impliqués dans la **transcription ou la stabilisation et l'épissage des ARNm** (25%), dans des **voies métaboliques diverses** (21%), dans le **métabolisme de la mitochondrie** (15%), dans le **développement** (12%), dans le **cycle cellulaire** (10%), dans la **compaction et la réparation de l'ADN** (8%), dans le **cytosquelette** (5%) et dans la **synthèse protéique** (4%).

La validation des résultats de notre analyse transcriptomique a été réalisée par une étude en QRT-PCR de l'expression de **10 gènes sélectionnés** selon leur rôle potentiel dans la physiopathologie des eIF2B-pathies : *HNRNPH1*, *HNRNPL*, *HNRNPF*, *HNRNPC*, *KIF5B* (Kinesin Family 5B), *HCCS* (Holocytochrome C Synthase), *DIAPH3* (Diaphanous Homolog 3), *VDAC3* (Voltage-Dependent Anion-selective Channel protein 3), *MRPS26* et *MRPL28* (Mitochondrial Ribosomal Protein S26 et L28). Une corrélation significative ($R^2 > 0.6$, p-value < 0.05) entre les résultats du transcriptome et de la QRT-PCR a été observée pour 6 des 10 gènes testés (*HNRNPH1*, *HNRNPL*, *HNRNPF*, *DIAPH3*, *VDAC3*, et *MRPL28*) en comparant les taux d'expression de ces gènes pour 8/10 couples patient atteint d'eIF2B-pathies/contrôle (annexe 2 : représentation des corrélations entre transcriptome et QRT-PCR pour les 10 gènes testés pour les 10 couples (A à J) et pour 8 couples (K à T)). Aucune corrélation entre les résultats du transcriptome et de la QRT-PCR n'a été observée en comparant les taux d'expression des 10 gènes testés entre les patients atteints d'autres LDs et les sujets sains. Ces résultats confirment bien la spécificité de l'expression différentielle de ces 6 gènes dans les Fbs de patients atteints d'eIF2B-pathie.

Nous avons, dans un second temps, mesuré le taux d'expression des 10 gènes sélectionnés ci-dessus et de trois gènes *HNRNP* additionnels (*HNRNPU*, *HNRNPD* et *HNRNPR*), présents dans la liste initiale de 70 gènes de FDR < 0.05 , du fait de leur présence

relativement importante parmi les gènes spécifiquement dérégulés dans les eIF2B-pathies. En effet, la famille des *HNRNP* représente à elle seule **8,6%** des 70 gènes différentiellement exprimés. L'analyse en QRT-PCR a été réalisée dans des échantillons de cerveaux de deux fœtus porteurs de mutations eIF2B (interruption à 14 et 16 semaines de gestation) en comparaison de six cerveaux de fœtus contrôles. Une surexpression significative a été observée pour 9 des 13 gènes. En parallèle, les expressions de ces 13 mêmes gènes ont été quantifiées dans les cerveaux de sept enfants (de 13 mois à 12 ans) et de deux adultes (24 et 39 ans) eIF2B-mutés en comparaison de cerveaux de trois sujets contrôles associés en âge. Une sous-expression significative a été observée pour 10 et 8 des 13 gènes respectivement.

Les gènes testés et spécifiquement sous-exprimés dans les Fbs mutés pour le facteur eIF2B sont donc également majoritairement **sous-exprimés dans les cerveaux d'enfants et adultes** mais **surexprimés dans les cerveaux de fœtus atteints**. Ces différences d'expression génique entre les cerveaux de fœtus et d'enfants suggèrent que les mutations eIF2B ont des effets différents sur l'expression de certains gènes selon l'étape du développement, probablement pour **compenser les défauts métaboliques rencontrés**. La surexpression importante de ces gènes dans les cerveaux de fœtus atteints semble donc en faveur d'un **effet précoce majeur** des mutations du facteur eIF2B interférant avec le développement et suggère que les mutations eIF2B ont un effet sans doute plus délétère durant la vie embryonnaire. La description des formes congénitales d'eIF2B-pathies va également dans le sens d'un rôle crucial du facteur eIF2B pendant le développement précoce.

Nous avons ainsi pu mettre en évidence une **dérégulation de la dynamique d'expression de ces gènes au cours du développement** probablement à l'origine des différents défauts métaboliques rencontrés dans les eIF2B-pathies.

3. Anomalie d'épissage de gènes développementaux en cause dans les eIF2B-pathies

Nous connaissons maintenant l'importance de l'**épissage alternatif** de certains transcrits de la myéline pour la formation et la maintenance de celle-ci. Il a d'ailleurs récemment été démontré le rôle de certaines protéines de la famille des hnRNP dans l'épissage et la stabilité de transcrit important pour les cellules gliales.

Les protéines **hnRNPH** et **hnRNPF** sont notamment impliquées dans la **régulation de l'épissage alternatif du transcrit *PLP/DM20* dans les OLs** permettant une production séquentielle de la protéine DM20 puis de PLP au cours du développement (DM20 étant

exprimée dans les OLs immatures et PLP dans les OLs matures et dans la myéline). La sous-expression de ces protéines dans une lignée oligodendrocytaire murine entraîne une augmentation du ratio *Plp/Dm20* (Wang et al., 2007). En effet, le niveau d'expression des protéines hnRNPF et hnRNPH plus faible dans les OLs que dans les OPC est associé à une augmentation du ratio *PLP/DM20*.

D'autre part, **hnRNPA2** est impliqué dans l'**export nucléaire de granules ARN contenant le transcrit MBP** pour permettre sa traduction localisée au niveau des prolongements oligodendrocytaires (White et al., 2008).

La surexpression d'**hnRNPC2** est également à l'origine d'une **augmentation du niveau d'expression du transcrit MBP** dans une lignée de neuroblastome humaine (Iwata et al., 2011).

Il a aussi récemment été établi un lien entre la sous-expression d'**hnRNPK** et l'**inhibition de la synthèse protéique de MBP** durant la myélinisation (Laursen et al., 2011).

Enfin, la sous-expression de **hnRNPA1** dans une lignée d'OPC de rat est à l'origine d'une **augmentation du ratio S-mag/L-Mag** (Zearfoss et al., 2011).

A la vue de ces récents résultats, nous avons donc voulu savoir si la dérégulation d'expression de gènes de la famille des hnRNP retrouvée dans les cerveaux de patients atteints d'eIF2B-pathies pouvait avoir une réalité fonctionnelle sur l'épissage de certains transcrits des cellules gliales. Pour cela, j'ai quantifié les différentes isoformes des transcrits *PLP* et *GFAP* dans les cerveaux de patients décrits précédemment.

Nous avons tout d'abord pu mettre en évidence un pic d'expression des transcrits *PLP* et *PLP+DM20* dans les cerveaux des enfants comparé aux fœtus et adultes avec un niveau d'expression plus faible chez les patients atteints mais non significatif étant donné la grande variabilité interindividuelle (annexe 3A). En revanche, nous observons une **augmentation significative du ratio *PLP+DM20/PLP* dans les cerveaux des fœtus atteints**, suggérant une **surexpression de l'isoforme *DM20*** dans les cerveaux eIF2B mutés à cette période précoce. Ceci, associé à la **surexpression des transcrits *HNRNPF* et *HNRNPH*** dans ces mêmes cerveaux, est en accord avec les travaux de Wang *et al.*

De la même manière, j'ai ensuite quantifié l'expression des isoformes du transcrit *GFAP* dans ces cerveaux. Le pic d'expression de ces transcrits se situe également chez les enfants mais sans différence entre les cerveaux contrôles et ceux de patients atteints pour *GFAP total (Pan-GFAP)* et *GFAP α* . En revanche, ***GFAP δ* est significativement sur-exprimé dans les cerveaux atteints à tous les stades de développement** (annexe 3B). Le

niveau d'expression de *Pan-GFAP / GFAP α* n'est pas significativement différent dans les cerveaux contrôles *versus* les cerveaux atteints, quel que soit l'âge. Par contre, les ratios *Pan-GFAP / GFAP δ* ou *GFAP α / GFAP δ* sont significativement plus faibles dans les cerveaux des enfants et adultes avec eIF2B-pathie (annexe 3C), démontrant une surexpression de l'isoforme *GFAP δ* dans ces cerveaux. Ceci est en accord avec les travaux de Bugianni *et al.* qui démontrent également une surexpression de la protéine *GFAP δ* dans des cerveaux de deux enfants et d'un adulte atteints (Bugiani *et al.*, 2011). Perng *et al.* ont démontré que la surexpression transitoire de *GFAP δ* dans une lignée humaine d'astrocytome déstabilisait le ratio *GFAP α / δ* , conduisant à la formation d'agrégats cytoplasmiques pouvant endommager le réseau de filaments intermédiaires (Perng *et al.*, 2008). Ceci pourrait contribuer à la morphologie aberrante des astrocytes retrouvée chez les patients avec eIF2B-pathies.

D. Conclusion

Nous avons ainsi réalisé la première analyse transcriptomique différentielle de cellules porteuses de mutations du facteur eIF2B. La spécificité de notre analyse a été de comparer les profils d'expression transcriptionnels de Fbs de 10 patients présentant des formes sévères d'eIF2B-pathie avec des Fbs de 10 patients atteints d'autres types de LDs et de sujets contrôles. Ceci nous a permis tout d'abord de démontrer que la réponse au stress n'était pas une caractéristique particulière des eIF2B-pathies, malgré l'implication du facteur eIF2B dans la régulation de l'initiation de la traduction en cas de stress cellulaire.

Deuxièmement, notre analyse a permis d'identifier 70 gènes spécifiquement dérégulés dans la physiopathologie des eIF2B-pathies et de manière intéressante, ces gènes sont majoritairement impliqués dans la régulation de la transcription et dans la stabilisation et l'épissage des ARNm. Une large proportion de ces gènes fait partie de la famille des *HNRNP*. Nos résultats permettent donc de suggérer que les mutations du facteur eIF2B induiraient une **perturbation majeure de l'épissage alternatif** d'un grand nombre d'ARNm pouvant potentiellement conduire à des **défauts de maturation et de différenciation des cellules du SNC**.

Le deuxième grand groupe de gènes spécifiquement sous-exprimés dans les eIF2B-pathies concerne le métabolisme et le transport des mitochondries. L'identification de cinq gènes *MRP* codant des protéines ribosomales mitochondriales suggère que la traduction mitochondriale est également affectée dans les cellules porteuses de mutations du facteur

eIF2B. De plus, la sous-expression des gènes *SDHD*, impliqué dans la chaîne respiratoire mitochondriale, *HCCS*, impliqué dans le transport des électrons, ou encore *KIF5B*, permettant le transport des mitochondries suggère que le **métabolisme global de la mitochondrie est affecté** dans les *eIF2B*-pathies. L'implication de défauts mitochondriaux dans diverses maladies neurodégénératives plus ou moins sévères (*pour revue*, DiMauro et Schon, 2008) démontre que la mitochondrie est un élément essentiel pour la formation et le maintien de l'intégrité des cellules du SNC. L'implication de désordres mitochondriaux dans les *eIF2B*-pathies pourrait donc être également à l'origine d'anomalies développementales des cellules du SNC et du défaut de maintien de la myéline au cours du temps.

Enfin, nous identifions ici pour la première fois une **dérégulation d'épissage** de certains transcrits importants pour les cellules gliales, notamment ***PLP* et *GFAP***, associée à une expression anormale de gènes appartenant à la famille des *HNRNP*. Le défaut d'épissage de *PLP* observé à l'état fœtal et la dérégulation de celui de *GFAP* qui s'ensuit au niveau post-natal pourrait être à l'origine des problèmes de formation et de maintenance de la myéline ainsi que de l'anomalie de maturation des astrocytes observés chez les patients atteints.

PUBLICATION N°3

Huyghe A.*, Horzinski L.* , Henaut A., Gaillard M., Bertini E., Schiffmann R., Rodriguez D., Dantal Y., Boespflug-Tanguy O., Fogli A. Developmental splicing deregulation in leukodystrophies related to eIF2B-mutations. Human Molecular Genetics. Soumis en Novembre 2011.

*: premiers co-auteurs

Developmental splicing deregulation in leukodystrophies related to eIF2B-mutations

Aurélia HUYGHE^{1,2*}, Laetitia HORZINSKI^{1,2*}, Alain HENAUT³, Marina GAILLARD^{1,2}, Enrico BERTINI⁴, Raphael SCHIFFMANN⁵, Diana RODRIGUEZ^{6,7,8}, Yann DANTAL⁹, Odile BOESPFLUG-TANGUY^{1,7,10,11}, Anne FOGLI^{1,2,12}.

¹INSERM U931-CNRS 6247-Génétique, Reproduction et Développement (GReD)-Faculté de Médecine, 28 place Henri Dunant, F-63003 Clermont-Ferrand, France.

²Université de Clermont, UFR Médecine, 28 place Henri Dunant, F-63003 Clermont-Ferrand, France.

³UMR 7138 Systématique, Adaptation, Evolution, CNRS - Université Pierre et Marie Curie, case 5, 7 quai Saint Bernard 75252 Paris cedex 05, France.

⁴Division of Neuromuscular and Neurodegenerative Disorders and Laboratory of Molecular Medicine, Department of Neuroscience, Bambino Gesù Hospital IRCCS, I-00165 Rome, Italy.

⁵Institute of Metabolic Disease, Baylor Research Institute, Dallas, Texas, United States.

⁶Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Armand Trousseau, Service de Neuropédiatrie, 26 avenue du Dr Arnold Netter, F-75012 Paris, France.

⁷INSERM U676, Hopital Robert Debré, 48 Boulevard Serurier, F-75019 Paris, France.

⁸Université Pierre et Marie Curie-Paris 6, F-75000 Paris, France.

⁹Soluscience, CBRV, 28 place Henri Dunant, F-63000 Clermont-Ferrand, France.

¹⁰Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Robert Debré, Service de Neuropédiatrie et Maladies Métaboliques 48 Boulevard Serurier, F-75019 Paris, France.

¹¹ Université Paris Diderot, Sorbonne Cité, UMR U676, F-75019 Paris, France.

¹²CHU de Clermont-Ferrand, Service de Biochimie Médicale et Biologie Moléculaire, F-63058 Clermont-Ferrand, France.

* These authors contributed equally to this work.

Corresponding author:

Anne Fogli, PhD

Laboratoire GReD UMR INSERM U931/CNRS 6247

Faculté de Médecine

28 place Henri Dunant

63000 Clermont-Ferrand

France

Phone : 33 4 73 17 81 78

Fax : 33 4 73 27 61 32

Email : anne.fogli@u-clermont1.fr

ABSTRACT

Leukodystrophies are rare inherited genetic disorders that primarily affect the white matter of the central nervous system. A large heterogeneity exists in this group of pathologies, causing hypomyelination or demyelination. Among the demyelinating leukodystrophies, eIF2B-related disorders represent a clinical heterogeneous group caused by mutations in the ubiquitous eukaryotic initiation factor 2B (eIF2B), involved in translation initiation regulation particularly under cellular stresses. Little is known about how eIF2B mutations can have a major effect on the central nervous system white matter.

Here we employed microarray analysis to study the transcriptional events occurring in eIF2B-mutated fibroblasts. Transcriptomic analyses of fibroblasts from eIF2B-mutated patients with a severe phenotype allowed us to identify 70 genes specifically differentially expressed in these fibroblasts and showing a reduction of expression for a large majority of them. Most of the under-expressed genes were involved in mRNA regulation and mitochondrial metabolism which are biological functions particularly important for the central nervous system development. Moreover, we demonstrated that 13 selected genes, including genes belonging to the hnRNP family, described as regulator of splicing event and stability of mRNA, are also under-expressed in children and adult eIF2B-mutated brains but over-expressed in eIF2B-mutated foetal brains, suggesting major disturbances due to eIF2B mutations during the development. Finally, we found an abnormal splicing regulation of *PLP* and *GFAP* mRNA, implicated respectively in the oligodendrocytes myelination and in astrocytes intermediate filament network.

These results showed a developmental dynamic deregulation of splicing events in glial cells, probably linked to alteration of glial maturation in eIF2B-mutated brains.

INTRODUCTION

Leukodystrophies (LD) represent a heterogeneous group of rare genetic disorders that primarily affect the white matter (WM) of the central nervous system (CNS). The WM is a complex structure composed of a vast number of nerve fibers (axons) sheathed with a compact and lipid-rich membrane, the myelin. Beside myelinated axons, WM contains a variety of cells known as glial cells (astrocytes, oligodendrocytes and microglial cells) that play structural, metabolic and trophic roles for myelin and axons (1). The large heterogeneity of LD results from the diversity of the genetically determined defects that interfere with glial cells functions. A common point in the LD physiopathology is the confluent destruction (demyelination) or development failure (hypomyelination) of CNS myelin from various origins (2). The hypomyelinating group of LD includes diseases due to defects in myelin production or quality. The main involved gene controls the production by oligodendrocytes of the major brain myelin proteins, the proteolipid proteins (PLP). The demyelinating group of LD includes mainly defects in i) peroxisomal or lysosomal enzymatic activities important for myelin biogenesis and maintenance, or ii) astrocytes functions responsible for progressive cystic myelin breakdown. This last group of vacuolating LD involves mainly genes expressed in astrocytes such as *GFAP* (*Glial Fibrillary Acidic Protein*) and *MLC1* (*Megalencephalic Leukoencephalopathy with subcortical Cysts 1*) or genes ubiquitously expressed as the five *EIF2B1-5* genes encoding the general translation eukaryotic initiation factor 2B (eIF2B). eIF2B mutations have been initially described in childhood ataxia with central hypomyelination (CACH) / Vanishing white matter (VWM) syndrome characterised in infants by a progressive neurological deterioration exacerbated by episodes of febrile infections or head trauma and a cerebrospinal fluid-like signal intensity of the WM on brain magnetic resonance imaging (3, 4). eIF2B mutations have been subsequently observed in a wide clinical spectrum from congenital rapidly lethal forms to slowly progressive adult forms associated in some cases with ovarian failure (5–9). A correlation between age at disease onset and disease severity has been established: disease onset <2, from 2 to 5 or > 5 years associated respectively to severe, classical or mild phenotypes (10).

The eIF2B factor is involved in the translation initiation regulation particularly under cellular stress by activating the eIF2 complex thanks to its nucleotide guanine exchange factor (GEF) activity. A correlation between the eIF2B GEF activity and the disease severity has been established particularly in the most severe infantile group of disease onset (11, 12). The WM susceptibility to eIF2B mutations is considered to result both from abnormal glial cells maturation and sensitivity of glial cells to eIF2B dysfunction during life. The neuropathological features show an increased

oligodendrocytic density (13, 14) and a reduced number of dystrophic astrocytes due to their abnormal maturation in cultured cells derived from eIF2B-mutated brain (15). In addition, a recent study on brain sections from 8 eIF2B-mutated patients showed an astrocytic immaturity with a significant proportion of proliferating astrocytes associated with an up-regulation of the GFAP delta isoform (GFAP δ) (16). Moreover, mild transitory abnormal myelination has been reported in mice homozygous for a mutant *Eif2b5* allele (*Eif2b5*^{R132H/R132H} mice) with an early defect of glial cells proliferation and maturation (17), suggesting that eIF2B mutations lead to defects in genes involved in the WM development.

A hyper-activation of the endoplasmic reticulum (ER)-stress response mediated by the activating transcription factor 4 (ATF4) has been observed in rat oligodendroglial-derived cells expressing mutated human *EIF2B5* gene (18) as well as in primary fibroblasts (19) and cerebral WM from eIF2B-mutated patients (20, 21). Nevertheless, we had not demonstrated any hyper-induction of the ER-stress response in eIF2B-mutated lymphocytes and lymphoblasts from eIF2B-mutated patients (22) suggesting cell-specific response to this genetic defect.

In order to identify genes and metabolic pathways specifically involved in eIF2B-related disorders, we performed a differential transcriptomic analysis using fibroblasts from eIF2B-mutated patients with a severe, early infantile form, compared to controls as well as patients with other types of LD (OL-patients). Among the 70 genes differentially expressed in eIF2B-mutated fibroblasts, we found a high proportion of genes relative to mRNA regulation and splicing such as HNRNP (Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein) genes. We found that these genes are abnormally expressed in patients' brains during the cerebral development, in parallel to an abnormal mRNA alternative splicing of *PLP1* (*Proteolipid Protein 1*) and *GFAP*, major oligodendrocytes and astrocytes genes respectively. We described here for the first time genes involved in the mRNA splicing machinery as potential actors in the abnormal maturation of glial cells observed in the eIF2B-mutated patient brains.

RESULTS

70 genes specifically and differentially expressed in eIF2B-mutated fibroblasts

In order to identify genes specifically involved in eIF2B-related disorders, we performed a transcriptomic analysis using fibroblasts of 10 eIF2B-mutated patients in comparison to fibroblasts of 10 OL-patients. ANOVA was used to identify genes that were statistically significantly differentially expressed between eIF2B-mutated and OL cells at basal state and after ER-stress by thapsigargin treatment. The pattern of differentially expressed genes between basal state and thapsigargin treatment in eIF2B-mutated and OL cells did not differ significantly. These results suggest that ER-stress does not enhance the effect of eIF2B mutations and is probably not directly involved in the specific expression profile of eIF2B-related disorders in cultured skin fibroblasts.

Among the genes differentially expressed between the eIF2B-mutated fibroblasts and controls or OL fibroblasts, and whatever the stress conditions tested, comparative statistical analysis allowed us to identify 253 genes ($FDR \leq 0.12\%$) specifically differentially expressed in eIF2B-mutated fibroblasts. Among these 253 differentially expressed genes, 70 genes have a significant expression rate, considered as significant mean ratios eIF2B-mutated / mean control values ≤ 0.9 or ≥ 1.05 (Table S1). Sixty seven of the 70 genes (96%) were under-expressed whereas only three genes were weakly over-expressed (range over-expression rate 1.06 to 1.07).

These 70 genes specifically differentially expressed in eIF2B-mutated patient's fibroblasts were involved in (a) transcription or mRNA stabilization and splicing (25%), (b) mitochondria metabolism (15%), (c) development (12%), (d) cell cycle (10%), (e) DNA compaction or repair (8%), (f) cytoskeleton (5%), (g) protein synthesis (4%), and (h) other metabolic pathways (21%) (Table S1).

RNA processing deregulation in eIF2B-mutated fibroblasts

The 70 genes were analysed using the BBSPE function of the Genomatix software, in order to select biological processes mostly and specifically involved in eIF2B-related disorders. We found that the highest number of genes were all linked to RNA process: mRNA metabolic process (z-score: 10.08), mRNA processing (z-scores: 9.74 and 8.91) and mRNA splicing (z-scores: 9.54 to 8.03). This group statistically diverges from the other biological processes with a z-score difference of 1. As an example, 8.6% from these 70 deregulated genes are HNRNP genes.

Expression deregulation of several genes in eIF2B-mutated fibroblasts according to microarray data and confirmed by mRNA quantification

We selected 10 under-expressed genes for microarray data validation according to their putative link with the physiopathology of eIF2B-related disorders (Table 3). We first chose four genes involved in transcription or mRNA stabilization and splicing, *HNRNPH1*, *HNRNPF*, *HNRNPL* and *HNRNPC* due to (i) the tight regulation of the alternative splicing of the major myelin protein mRNA during myelin formation and maintenance (23–26) and (ii) the particular role of hnRNPH1 and hnRNPF controlling the *PLP1/DM20* mRNA alternative splicing in oligodendrocytes (27). We also selected five genes related to mitochondria structure and metabolism, *MRPS26* (*Mitochondrial Ribosomal Protein S26*), *MRPL28* (*Mitochondrial Ribosomal Protein L28*), *HCCS* (*Holocytochrome c Synthase*), *VDAC3* (*Voltage-Dependent Anion-selective Channel protein 3*) and *KIF5B* (*Kinesin Family member 5B*) due to the potential key role of mitochondria in WM homeostasis as suggested by the involvement of mitochondrial defects in various neurodegenerative disorders (28) including *KIF5A* in one inherited progressive primary motor axonopathy (SPG10) (29). One gene related to follicle development and spermatogenesis, *DIAPH3* (*Diaphanous Homolog 3*), the human homolog of the drosophila *Diaphanous* gene (30), was also selected due to the frequent ovarian dysfunction observed in eIF2B-related disorders.

We quantified the mRNA level of the 10 selected genes by QRT-PCR on the same RNA samples used for M1 and M2 experiments (10 eIF2B-mutated patient/control fibroblasts couples and 10 OL-patient/control fibroblasts couples in stressed and non stressed conditions). For each gene, the determination correlation coefficient (R²) between microarray normalized log ratios patient/control and QRT-PCR Δ Ct patient-control have been calculated (Table 4). Among the ten eIF2B-mutated patient/control couples, lack of correlation between QRT-PCR and microarray data for 8 of the selected genes (except *HNRNPH1* and *MRPS26* genes) was found for two couples (393-2/1541-1 and 431-1/1178-1, data not shown); therefore these couples were subsequently excluded for the global correlation analysis. For six genes, the coefficients were significantly higher (range of p-value 0 to 0.030) in the 8/10 eIF2B-mutated patient/control fibroblasts couples than in the 10 OL-patient/control fibroblasts couples (Table 4). The difference between eIF2B-mutated/control and OL-patient/control couples was high but not significant for the *HCCS* and *HNRNPC* genes (respective p-value = 0.152 and 0.144). No significant differences was observed for the *KIF5B* and *MRPS26* genes (respective p-value = 0.876 and 0.736).

These results confirm the specificity of the quantitative differential expression of 6/10 selected genes in the eIF2B-mutated patient's fibroblasts.

Expression of several genes is deregulated in eIF2B-mutated brains in relationship with the microarray results in fibroblasts

We assayed the mRNA level of the 10 selected genes by QRT-PCR in the brain autopsy samples of two eIF2B-mutated foetuses, 7 children and two adults age matched with controls (Table 2). We also included in this study three additional HNRNP genes (*HNRNPU*, *HNRNPD* and *HNRNPR*), that were present in the 70 initial genes, due to the high representation of the HNRNP genes (8.6%) among the deregulated genes. An over-expression was globally observed in eIF2B-mutated foetal brains compared to controls except for *HCCS* and *VDAC3* whose mRNA expression did not vary (Figure 1A). Nevertheless, a lower mRNA expression was globally observed in the eIF2B-mutated children and adult brain samples compared to the age-matched control brains, excluding *DIAPH3* that was under-expressed in the eIF2B-mutated children brains but over-expressed in the adult brains (Figure 1A).

These results demonstrated that genes specifically under-expressed in eIF2B-mutated fibroblasts, in comparison to controls and to OL-patients, are also globally differentially under-expressed in eIF2B-mutated children brains. However, these genes are over-expressed in eIF2B-mutated foetal brains.

We then focused our analysis on the protein levels of hnRNP, and particularly on hnRNPL and U. As shown in Figure 1B, the relative amounts of these proteins seem to increase in the nuclear fraction of eIF2B-mutated foetal brains, consistently with the previous results on transcripts. Moreover, we can observe an over-expression of hnRNPL in the nuclear fraction of eIF2B-mutated foetus brains compared to cytoplasmic fraction, which is totally inverted in the control brains. Nevertheless, the variability found in these proteins expressions in brains did not allowed us to conclude on a specific proteic deregulation at this stage of life (data not shown).

Therefore, these results demonstrated a deregulation of expression of these genes during the early stage of life.

Abnormal splice regulation of *PLP/DM20* and *GFAP* in brains from eIF2B-mutated patients

Due to the particular role of hnRNPH1 and hnRNPF in the *Plp1/Dm20* mRNA alternative splicing in oligodendrocytes (27), we next wanted to know if the deregulation we found for expression of genes implicated in the general mRNA splicing network (e.g. *HNRNP*) would have a functional consequence on the splice of *PLP/DM20* and other important genes of glial cells.

Reduction in hnRNPH1 and F expression in differentiated mouse oligodendrocytes correlates temporally with increased *Plp/Dm20* ratio (27). To gain insight into the splice *PLP/DM20* in the eIF2B-mutated patients' brains, we quantified by QRT-PCR the isoform *PLP* alone and *PLP+DM20* in the same brain autopsy samples used in the previous study (Table 2). As expected, *PLP* and *PLP+DM20* transcripts are almost undetectable in the foetal brains and their expression increased in the children/adult brains consecutively to the myelination step (data not shown). These transcripts are under-expressed in the eIF2B-mutated patients compared to controls, due to the hypomyelination related to the pathology. However, the ratio *PLP+DM20 / PLP* showed an early foetal deregulation of the splice *PLP/DM20* with a significant upregulation of this splice in the eIF2B-mutated foetal brains, demonstrating an over-expression of the isoform *DM20* in the brains of affected fetuses (Figure 2A).

Due to the small amount of available nuclear material, we performed protein analysis only on brains cytoplasmic fractions. The protein levels of PLP and DM20 and the quantification of the ratio *PLP+DM20/PLP* showed no differences between the control and patient brains at the children/adult stage, correlating with the QRT-PCR results (Figure 2B). PLP protein is undetectable in the foetal brains.

These results showed a defect in the regulation of the *PLP/DM20* mRNA splice at a early stage during the development.

Similarly, we quantified the astrocytic differentially expressed isoforms of *GFAP*, *GFAP α* and *GFAP δ* in the same brain autopsy samples (Table 2). *Pan-GFAP* mRNA and the two isoforms *GFAP α* and *GFAP δ* were amplified by QRT-PCR. The expression of the *GFAP* mRNA and its isoform α and δ is low at the foetal stage, reaches a peak during the childhood and decreases by the adult age (data not shown). *Pan-GFAP* and *GFAP α* mRNA are not differentially expressed between the control and eIF2B-mutated samples at the 3 stages of development. As a consequence, we observed an equivalent ratio *pan-GFAP / GFAP α* RNA in the control and eIF2B-mutated patient brains (data not shown). However, *GFAP δ* RNA was significantly over-expressed in the eIF2B-mutated patient brains at every stages of development (Figure 2C). The ratio *pan-GFAP/GFAP δ* increased in the eIF2B-mutated children/adult brains compared to controls but not in the eIF2B-mutated foetus brains (Figure 2E), demonstrating an upregulation of the isoform *GFAP δ* in the eIF2B-mutated patients brains. These *GFAP δ* transcripts were, on average, 4.5 and 7 times higher respectively in eIF2B-mutated children and adult brains respectively without significant difference between patients and controls with respect to the message levels of *pan-GFAP* and the predominant isoform *GFAP α* .

Western blotting analysis confirmed that GFAP δ was clearly detectable in the eIF2B-mutated patient brains but not in the controls (Figure 2D, antibody GFAP α not available). Obviously, similarly to PLP, GFAP proteins were undetectable in the foetal brains. These results demonstrate an abnormal splicing regulation of *GFAP* in the eIF2B-mutated patients brains which is more pronounced at the post-natal stage than in foetal stage.

DISCUSSION

Differential transcriptomic analysis in rare neurological disorders needs comparison by variance analysis of related groups of disease

In rare inherited neurological disorders, DNA microarray experiments aim at detecting differential gene expression in order to identify genes or metabolic pathways important for diagnostic, prognostic or therapeutic approaches. The novelty of our study has been to compare transcriptomic profiles of fibroblasts from eIF2B-mutated patients with fibroblasts of OL-patients in addition to fibroblasts from control subjects. Moreover, we consider that comparing the fold change results is a reduction and a misleading information offered by microarray experiments (31, 32). We used analysis of variance with the GeneANOVA software (33) to compare the data taking into account different factors such as disease status, couple number and ER-stress treatment between the different groups of fibroblasts: eIF2B-mutated, OL and controls. This type of statistical analysis allowed us to maximize the use of available data (relative transcription level of the corresponding gene and systematic bias due to the protocol such as labelling efficacy).

ER-stress activation is not specific to eIF2B-related disorders

ER-stress induced by thapsigargin did not help to differentiate gene expression profile of eIF2B-mutated fibroblasts from leukodystrophic fibroblasts of other causes. This suggests that activation of ER-stress is probably not directly involved in the specific eIF2B-pathway expression, despite the role of the eIF2B complex in translation regulation after stresses. A hyper-activation of ER-stress response has been observed by Western Blotting in fibroblasts from eIF2B-mutated patients (19), or rat oligodendroglial-derived cells expressing mutated human *EIF2B5* gene (18). Several differences could explain this discrepancy: our 10 eIF2B-mutated patients expressed a homogenous severe phenotype and are compared for the first time to a group of infantile severe forms of leukodystrophic patients from various other causes. An UPR (unfolded protein response) hyper-activation has been also described in brains from eIF2B-mutated patients compared to control individuals (20) and to a single PMD case (21). Our transcriptomic analysis suggests that the ER-stress response observed in eIF2B-mutated cells has no specificity. Stress is classically reported as an onset trigger or aggravating factor in eIF2B-related disorders (9, 34). However, stress worsened symptoms are observed in other groups of WM disorders and with the same 20-40 % frequency in the other forms of vacuolating LD. The functions of the ER in proper folding of proteins, lipids biosynthesis and storage of calcium could explain the susceptibility of the WM to ER stress. ER

dysfunctions has even more serious consequences during the myelination process due to the large amount of proteins and lipids produced in the WM in a short time (35).

Specific genes involved in eIF2B-related disorder

The comparison of eIF2B-mutated fibroblasts and OL- fibroblasts transcriptomic pattern allowed us to identify 70 genes specifically differentially expressed in the eIF2B-related disorders. They are essentially under-expressed. Three main classes of biological processes have been identified.

The first group gathers genes involved in transcription or mRNA stabilization and splicing, as 25% of the selected under-expressed genes were involved in these pathways with a high z-score for the associated biological processes, suggesting a major disturbance of mRNA regulation. We identified six genes belonging to the *HNRNP* family (*HNRNPH1/C/D/L/U/F* and *R*) and two *MBNL* genes (*MBNL1* and *MBNL2*: Muscblind like 1 and 2) which were involved in mRNA splicing or mRNA stability and transport suggesting that splicing and stabilization of a large panel of mRNA can be affected in the eIF2B-related disorders.

Alternative splicing is widely used to generate protein diversity and to control gene expression in many biological processes, including cell fate determination and maturation or apoptosis. In the brain, it is highly abundant relative to other tissues (36, 37) and it may generate cell-specific combination of protein isoforms that define the functional properties of the cells and underline complex processes such as synaptic adhesion and CNS plasticity (38). Moreover, alternative splicing is an important feature for myelin formation and maintenance. Most of the myelin proteins such as PLP/DM20 (25, 26), MAG (Myelin-Associated Protein) (23), MBP (Myelin Basic Protein) (39), MOBP (Myelin-associated Oligodendrocytic Basic Protein) and CNPase (2'3' Cyclic Nucleotide 3' Phosphodiesterase) (40, 41) are submitted to alternative splicing and the production of the different isoforms during myelination have to be tightly regulated.

The identification of an increase of such a number of *HNRNP* genes in foetal brains together with the decrease in children and adult brains allows us to hypothesize that eIF2B mutations may have a major effect on myelination timing and myelin maintenance. Moreover, the expression rates of the 13 selected genes are significantly different between the eIF2B-mutated foetal and patients brains demonstrating a dynamic of expression from these genes during the development to probably compensate the metabolic defects occurring at very early stage in the affected brains. This is emphasized by the presence of an increased level in foetal brains and a decreased level in children and adult brains of the *HNRNPH1*, *F* and *C* mRNA in our study. It has been demonstrated that the hnRNPH1 and F proteins control the alternative splicing of the *Plp/Dm20* mRNA in a mouse

oligodendroglial cell line (27). Authors demonstrated that the knock-down of these proteins by siRNA modified the *Plp/Dm20* mRNA ratio by increasing the production of the *Plp* mRNA isoform. Moreover, a recent study demonstrated that over-expression of *HNRNPC2* in a human neuroblastoma cell line up-regulated the message level of *MBP* (42). Then we can hypothesize that the increase of the *HNRNPH1*, *F* and *C* mRNA in foetal brain and its decrease in children and adult brains is a way to compensate the hypomyelination in foetus and demyelination in children by respectively increasing the production of DM20 in immature oligodendrocytes in foetus and favouring the production of PLP in mature oligodendrocyte and myelin in children. Here we identified the first link between eIF2B mutations and a potential myelin defect due to *HNRNPH1* mRNA, a key regulator of the major myelin protein PLP/DM20 splicing and the dynamic of the myelin production during the development. It would also be interesting to examine the expression profile of other members of the *HNRNP* family like *HNRNPA* and *K*, as it was reported a role for the protein hnRNPA on the nuclear export of *MBP* in the oligodendrocytes (43) and on the alteration of the ratio *S-Mag/L-Mag* isoform in a rat oligodendroglial cell line (44) and a link between the down-regulation of hnRNPK and the inhibition of the MBP protein synthesis during myelination (45). It has also been demonstrated that several hnRNP shuttle between the nucleus and the cytoplasm and several functions have already been assigned to shuttling hnRNP like transporting mature mRNA for translation or regulating mRNA stability (46). So, the differential localization of hnRNPL and U in the foetal brains between controls and eIF2B-mutated patients yield to the hypothesis of a functional consequence on target genes and processes of these hnRNP.

The second group of selected genes is related to mitochondria metabolism and transport. Interestingly, five genes encoding mitochondrial ribosomal subunits (*MRPS26*, *MRPL28*, *MRPL38*, *MRPL16* and *MRPS9*) were under-expressed. This suggests that protein synthesis in mitochondria is probably also affected by eIF2B mutations. The identification of some genes involved in the electron transport pathway (*HCCS*) or component of the mitochondrial membrane like *VDAC3*, mitochondrial respiratory chain (*Succinate Dehydrogenase complex D: SDHD*) and in mitochondrial transport (*KIF5B*), suggests that the global metabolism of mitochondria is affected in eIF2B-related disorders. Mitochondria are central for various cellular processes that include ATP production, intracellular Ca^{2+} signalling, generation of reactive oxygen species and apoptotic cell death. In CNS, they are notably important for Ca^{2+} signalling in oligodendrocyte precursor cells which seems to be critical during their migration, proliferation and differentiation (47). Mitochondria are also essential for neuronal activity (48) and defects in their functions have been involved in various neurodegenerative disorders (28). For example, SPG10 is due to mutations in

the neuron-specific *KIF5A* gene which affects the anterograde axonal transport of cargo containing notably mitochondria leading to neuronal degeneration. Moreover, a study showed that *Kif1b* is required for the localization of *mbp* mRNA to processes of myelinating oligodendrocytes in zebrafish (49).

Another interesting gene differentially expressed in eIF2B-mutated patient fibroblasts and brains is the *DIAPH3* gene, the human homolog of the *Drosophila Diaphanous* gene, involved in cytokinesis (30). Disruption of the *Diaphanous* gene in *Drosophila* is responsible for spermatids degeneration and abnormal follicle cells development leading to male and female infertility. Moreover, another human gene belonging to the *Diaphanous* family named *DIA* is disrupted in a patient with premature ovarian failure (50). *DIAPH3* has been recently involved in cell migration, axon guidance and neuritogenesis (51). We can therefore hypothesize that it may be also involved in folliculogenesis, and would explain the ovarian failure sometimes observed in mild cases of eIF2B-related disorders (ovarioleukodystrophies) (7).

Despite the lack of statistical correlation between arrays and QRT-PCR for 4/10 selected genes in fibroblasts, 7/10 and 6/10 genes initially selected through our transcriptomic approach were under-expressed in brain samples from eIF2B-mutated children and adults, respectively, and 6/10 were over-expressed in foetal eIF2B-mutated brains. This confirms that the statistical FDR calculation is a powerful tool to detect differential gene expression.

The differences found in genes expression between foetal and children/adult eIF2B-mutated brains suggest that eIF2B mutations have different effects depending on the developmental stage. Nine of the 13 genes tested are significantly over-expressed in foetal brains but 10 and 8 are under-expressed in children and adult brains respectively (Figure 1), suggesting that eIF2B mutations have specific deleterious effects during embryonic life.

The various congenital abnormalities observed in the “congenital” forms of eIF2B-pathies (glaucoma, cataract, dysmorphic features, limb deformities) as well as our transcriptomic results using fibroblasts of severely affected children suggested a larger effect on the programmed cell differentiation. The genes involved in proliferation and apoptosis have to be particularly tightly regulated during the CNS development explaining the predominant CNS expression of eIF2B-related disorders.

Abnormal splice regulation of genes important for glial cells

In order to further analyse the consequences of the dysregulation of genes involved in mRNA stabilization and splicing during the CNS development, we studied two genes with splice isoforms differently expressed during glial maturation, respectively the *PLP1* in oligodendrocytes and the *GFAP* in astrocytes.

We show an up-regulation of the ratio *PLP+DM20/PLP* (no primers available for the isoform *DM20* alone as it results from an alternative splicing of the *PLP1* gene resulting in exclusion of the exon 3) demonstrating an increased expression of the *DM20* isoform specifically in the mutated brains at the foetal age (Figure 2). This up-regulation of *DM20* in the eIF2B-mutated foetal brains is concomitantly associated with an increased expression of *HNRNPH1* and *F*.

Regulation of *PLP* alternative splicing and maintenance of the *PLP/DM20* ratio are critical for oligodendrocytes differentiation and myelin maintenance. In mature oligodendrocytes and in myelin, the PLP 5' splice site is preferentially used, while in oligodendrocytes progenitor cells and in other cell types, DM20 is the preferred site (24). In differentiated oligodendrocytes and in the post-natal brain, the ratio of PLP to DM20 transcripts is 3:1 and accounts for the preponderance of the PLP protein isoform. Mutations that impair the PLP/DM20 ratio cause a spectrum of dysmyelinating disorders in humans (52, 53). Therefore, alteration of PLP/DM20 mRNA splicing related to *HNRNPH* dysregulation could account for the myelin paucity with substantial increase in the number of non myelinating oligodendrocytes observed in eIF2B-related disorders (13, 54).

We found that mutated brains over-express *GFAP δ* at all the developmental stage but not *pan-GFAP* and *GFAP α* . As a consequence, the ratio *pan-GFAP/GFAP δ* is down-regulated in the children/adult mutated brains, whereas it is not affected in the foetal brains (Figure 2). *GFAP δ* results from an alternative splicing of *GFAP* gene, which replaces the two final exons of the predominant isoform *GFAP α* with an alternative terminal exon (55). In normal adult grey and WM parenchyma, *GFAP δ* represents only a small fraction of total *GFAP* (56). However, *GFAP α* and *δ* transcripts are both up-regulated in Alzheimer's disease (57). Moreover, Perng and colleagues demonstrated that the transient over-expression of *GFAP δ* in a human astrocytoma cell line, destabilizing the ratio *GFAP α / δ* , resulted in the formation of cytoplasmic aggregates that often collapsed the endogenous GFAP networks (56). This also increased the levels of α B-crystallin, a protein chaperone associated with the GFAP filaments. Here we showed a decreased ratio *pan-GFAP/GFAP δ* in the children and adult mutated brains, corresponding to an up-regulation of expression of *GFAP δ* , whereas the levels of *pan-GFAP* and *GFAP α* are not increased (Figure 2). This is consistent with the results of a recent study in which authors described an over-expression of

the mRNA and protein isoform GFAP δ in the brain WM of an eIF2B-mutated child (4.5 months) and two adult (12 and 29 years) patients, compared to the major GFAP α isoform but no differences in the ratio GFAP α / pan-GFAP between the two groups of patients as well as an increased level of α B-crystallin in eIF2B-mutated astrocytes (16). The abnormal morphology of eIF2B-related disorders-affected astrocytes has been invoked to explain the extensive WM cavitation and limited gliosis of affected tissues (15). In the affected WM, astrocytes have coarse blunt processes instead of the fine arborisations observed in controls. In Alexander disease related to GFAP mutations, the inability to form proper astrocytic GFAP networks coexists with incomplete maturation of astrocytes and insufficient myelin formation (58). Our findings suggest that assembly-compromised GFAP δ could function to alter protein–protein interactions of GFAP filaments, thereby contributing to the aberrant morphology of affected astrocytes. This could contribute to the clinical similarity found between eIF2B and GFAP-related disorders, both being cavitating demyelinating LD with stress-induced acute phases (2).

We described here for the first time genes involved in the mRNA splicing machinery as potential actors in the abnormal maturation of glial cells observed in the eIF2B-mutated patient brains. However, if the link between the hnRNP proteins and the abnormal splice of *PLP/DM20* mRNA is clear, the relation between hnRNP and *GFAP* mRNA splicing remain to be elucidated.

CONCLUSION

In conclusion, we reported in the present study an equivalent transcriptomic stress profile between eIF2B-mutated and non mutated fibroblasts, suggesting that eIF2B-mutated cells have no specific ER-stress response. The 70 genes specifically differentially expressed in eIF2B-mutated fibroblasts were mainly under-expressed. Gene quantification confirmed involvement of genes important for mRNA regulation (HNRNP), for mitochondrial metabolism / transport and for gonadogenesis. The highest differences were observed in foetal brain suggesting major disturbances of eIF2B mutations during the early development. The abnormal regulation of HNRNP was concomitant with the splice dysregulation of the main genes involved in glial maturation. This suggested that the defective alternative splicing involved a more general deregulation of expression of proteins implicated in the splicing machinery like the hnRNP which play a major role in neurodegenerative disorders.

MATERIALS AND METHODS

Samples from fibroblasts leukodystrophic patients

Studies have been performed with the ethical agreement of the “Centre de protection des personnes Sud-Est VI”, France and a signed informed consent of the parents. All patients or their legal guardians gave their written informed consents.

For the differential transcriptomic study, we analysed the leukodystrophic fibroblasts from ten eIF2B-mutated patients and from ten patients affected by OL coupled with 20 sex and age-matched control subjects without neurological signs (Table 1).

In the eIF2B-mutated group, all patients have a severe phenotype characterised by (i) an early infantile age of onset (mean 1.2 ± 0.7 years, range: 5 months to 2.7 years), and (ii) a rapid progression leading to death or absence of motor and cognitive capacities in a mean of 1.7 ± 1.4 years (range: 10 days to 3.5 years) (Table 1). We selected patients with a severe, early infantile form, because the impacts of the eIF2B mutations on the phenotype seem greater than in milder forms in which other environmental factors are also involved (34).

The 10 patients with OL have also an infantile age of onset (mean 0.9 ± 1.3 years, from birth to 3.5 years). They included (i) five patients with other types of vacuolating LD (three patients with Alexander disease relative to *GFAP* mutation and two patients with megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts related to *MLC1* mutations), (ii) two patients with a severe congenital form of hypomyelinating LD caused by *PLP1* mutations PMD form 0 without motor acquisition), (iii) three patients with a demyelinating LD related to lipid metabolism enzymatic defect with a rapid progression in one case of Krabbe disease and a slower disease evolution in two cases of SLS (Table 1).

Samples from patients' brains

Affected brain tissues used for quantitative real-time PCR gene analysis (Table 2), provided from the brains samples of two eIF2B-mutated foetuses (393 and 1767), were obtained after the therapeutic abortions performed at respectively 14 and 16 weeks of gestation due to the affected status of the foetuses found by DNA'CVS analysis and immediately frozen in liquid nitrogen. In addition, brain samples of affected patients were identically frozen immediately after the brain autopsy performed between 13 months and 39 years. Control brain samples (foetus and children / adults) were provided by the Brain and Tissue Bank for Developmental Disorders at the University of Maryland, Baltimore, Maryland (USA) and the fetopathologic unit of the Clermont-Ferrand University Hospital, (Dr AM Beaufrère), Clermont-Ferrand (France).

Cell culture, thapsigargin treatment and RNA isolation

Primary fibroblasts were obtained from skin biopsy. They were grown on RPMI 1640 L-Glutamine medium (Gibco) supplemented with 1% Penicillin 1000UI/ml, Streptomycin 10mg/ml, 0,001% Amphotericin B 2,5mg/ml and 10% FBS (Foetal Bovine Serum) at 37°C and 5% CO₂. Twenty-four hours after treatment, fibroblasts at nearly confluence were trypsinized with 0.1% trypsin-EDTA and cells were equally divided.

One half of the cells were treated with 1µM thapsigargin and the other half with 0.05% ethanol during 4H at 37°C and were harvested with two PBS washes just after thapsigargin treatment.

Finally, fibroblasts from 6 control subjects used as reference were grown, harvested, lysed and RNA extracted identically to the others.

Total RNA from fibroblasts and from all brain samples were extracted using the RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen), according to the manufacturer's instructions and stored at -80°C.

RNA preparation for microarray experiments

For each sample, RNA quality and concentration were assessed using a Bioanalyseur 2100 (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany), according to the manufacturer's instructions. For microarray hybridizations, 500 ng of total RNA were directly labelled by reverse transcription using the Low RNA input linear amplification (Agilent Technologies) and were purified using the RNeasy mini kit (Qiagen) according to the manufacturer's recommendations. This reaction has been performed for RNA of each fibroblast of eIF2B-mutated patients, OL-patients and age- and sex-matched control subjects with Cy3 (green) incorporation. The reference sample (pool of 6 control subject's fibroblasts) was labelled with Cy5 (red) incorporation. All the dye incorporation rates were checked by ND-1000 spectrophotometer (Nanodrop Technologies). Fragmentation of cDNA was performed by denaturing the samples at 60°C during 30 min in order to obtain cDNA fragments of 50 to 200 nucleotides.

cDNA microarray hybridizations and scanning

Two microarray experiments have been performed with and without ER-stress conditions: i) M1: cDNA samples of 10 eIF2B-mutated fibroblasts *versus* matched coupled controls fibroblasts; ii) M2: cDNA samples of 10 OL fibroblasts *versus* matched coupled controls fibroblasts.

750 ng cDNA (M1) or 825 ng cDNA (M2) of mutated and controls cells, treated with thapsigargin or ethanol and labelled respectively with Cy3 and Cy5, were mixed into a single pool with the hybridization buffer. They were cohybridized on the same microarray slide (Human pangenomic 44K from Agilent Technologies) in an Agilent hybridization platform (Imaxio, Diagenode

division, Saint-Beauzire, France) at 65°C during 17h. Microarray slides were then scanned with the following parameters: i) M1 experiment: Cy3 Photo Multiplier Tube (PMT): 100, and Cy5 PMT: 100 with a 10µM resolution; ii) M2 experiment: parameters for Cy3 and Cy5: Xdr High 100% - Xdr Low 10% with a 5µM resolution, the Xdr corresponding to two scans (one at PMT 100 and one at PMT 10). These processes were repeated for each of the 40 hybridized slides. The images were analyzed with the Feature Extraction 9.1 software (Agilent Technologies) using the GE2-v4_91 (M1) or GE2-v5_95 (M2) protocols according to the manufacturer's instructions.

cDNA microarray Data analysis

The statistical analysis was performed for characterized genes. EST and chromosomal location (LOC) have been excluded.

Correction and normalization. Transformation and normalization of hybridization data were performed to minimize variations arising from technical differences in RNA quality, probe labelling, and hybridization conditions between experiments. The repartition of the gene expression rates is asymmetric with a small number of high values leading us to perform a logarithmic transformation for each signal intensity (giving the “log values”). Considering that expression of the majority of the spotted genes does not change in function of the experimental condition, the sum of “log values” and the variance of “log values” should be the same across the different samples. For that reason, the “log values” have been standardised. Correction was next performed for differences in the variability across the range of gene expression levels using the formula : (corrected G log value)_i = (G log value)_i – (R log value)_i + (mean R log value)_i ; where “G log value” represents sample signal intensity, “R log value” represents the reference signal intensity, and “mean R log value” represents the mean of all R values obtained for the gene “i” in reference across the different conditions.

Identification of differentially expressed genes between controls and leukodystrophic patients.

Genes differentially expressed (i) between the eIF2B-mutated patients and the control subjects for the M1 and (ii) between the OLS-patients and the control subjects for the M2 were determined statistically by variance analysis using the GeneANOVA software (33). For M1 and M2 analysis, we constructed a statistical model including 3 factors: disease status (patients or control subjects), couple number (couple 1 to 10) and treatment (thapsigargin or ethanol).

Identification of genes specific of eIF2B-related disorder (M1 and M2 comparison). Genes differentially expressed between the eIF2B-mutated patients and the OLS-patients were determined statistically by variance analysis using the GeneANOVA software (33). We constructed a statistical

model including 2 factors: disease status (patients or control subjects) and treatment (thapsigargin or ethanol). The variance across each group of patients was included in residual.

***In silico* analyses of the biological processes involved in eIF2B-related disorders**

Biological processes were analysed using the Genomatix software, available at <http://www.genomatix.de>. Using the BBSPE (Bibliosphere) function, we analysed and selected biological processes involving a maximum of the 70 selected genes. For each biological process, a z-score (or z-value) is calculated: it expresses the divergence of the experimental result from the most probable result as a number of standard deviations. The larger the value of z, the less probable the experimental result is due to chance. When z-score is over 3, one can consider that the result is significantly not due to chance.

Gene expression analysis of selected genes by quantitative real-time PCR (QRT-PCR)

Total RNA extracted from fibroblasts and from the brain samples were used for gene expression analyses by QRT-PCR of 13 selected genes, as well as *PLP/DM20* and *GFAP* isoforms (Table 3). RT for each sample has been performed with 1µg of total RNA using the High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions. Two independent RT were performed for each sample and quantitative PCR was performed on Taqman 7300 using the Taqman Probe technology (Applied Biosystems) with specific probes and primers (Taqman Gene Expression Assay) for each 13 selected genes and *PLP/DM20* isoforms, pre-designed to overlap exon-exon boundaries and then prevent genomic DNA amplification. Quantitation was carried-out regarding the housekeeping *β2-microglobulin (B2M)* mRNA. For each selected gene, 4 µl of 1/10 cDNA dilution were amplified with 1X Taqman Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems) and 1X of Taqman Gene Expression Assay (Table 3) in a final volume of 20µl. The program included an initial step of UDG incubation at 50°C for 2 min, a step of enzyme activation at 95°C for 10 min followed by 40 cycles of 95°C for 15 seconds, 60°C for 1 min. The QRT-PCR were carried out in duplicates for each RT sample and each selected gene. The cycle of threshold value (Ct) was used to calculate the relative expression of the gene of interest and normalized to the transcript for the housekeeping gene *B2M*. Expression rate of QRT-PCR were calculated using the formula $Mean(2^{-(\Delta patient - \Delta control)})$ where $\Delta patient$ correspond to $(Ct \text{ gene } x - Ct \text{ } B2M)$ for one patient and $\Delta control$ $(Ct \text{ gene } x - Ct \text{ } B2M)$ for the corresponding control.

For the *GFAP* isoforms quantifications, transcript-specific primers were designed to overlap exon-exon boundaries to prevent genomic DNA amplification (16) (Table 3). The PCR was carried out using a sample volume of 20µl containing Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied

Biosystems), 10 μ M primers and 4 μ l of 1/10 cDNA dilution. The relative abundance of transcript expression was calculated using the cycle of threshold value and normalized to the endogenous controls *GAPDH* (*Glyceraldehyde Phosphate Deshydrogenase*) and *HPRT* (*Hypoxanthine-guanine Phosphoribosyl Transferase*).

The results were expressed as mean \pm S.E.M. and compared using the Mann-Whitney test.

Protein extraction and western blot analysis

To assess the expression of hnRNP proteins in the brain autopsy samples, we performed a nuclear and cytoplasmic differential extraction, due to the major nuclear localisation of these proteins, using the NE-PER nuclear and cytoplasmic extraction reagents (Thermo Scientific) according to the manufacturer's instructions. The cytoplasmic fractions were also used for PLP and GFAP detection. Protein concentration was then assessed by the Bradford method. 10 μ g of protein lysates were separated on 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to polyvinylidene difluoride membranes (Millipore). Unspecific binding were blocked with 5% bovine serum albumine (BSA) in Tris-buffered saline (TBS) containing 0.1% Tween 20 overnight at 4°C. Incubations with primary antibodies were carried out at room temperature using mouse anti-GAPDH (1:5000, Abcam, ab8245), mouse anti-hnRNPL (1:8000, Sigma Aldrich, R4903), mouse anti-hnRNPU (1:8000 for cytoplasmic fraction and 1:12000 for nuclear fraction, Sigma Aldrich, R6278), rabbit anti-GFAP (1:1500, Chemicon, ab5804), rabbit anti-GFAP delta (1:500, Abcam, ab28926) and rat anti-PLP (1:200, gift from W Macklin). After washing, membranes were incubated with an accordingly HRP-conjugated secondary antibody: anti-mouse (1:5000, Amersham), anti-rabbit (1:5000, GE Healthcare) or anti-rat (1:5000, Rockland) at room temperature. Protein expression was detected by ECL reagent (GE Healthcare).

Bands on the films were quantified with ImageQuant TL software and compared using the Mann-Whitney test.

FUNDING

This work was supported by grant of the European Leukodystrophy Association (ELA) research foundation of the Health European Framework Program 7 (Leukotreat), [grant number 241622].

ACKNOWLEDGMENTS

We gratefully acknowledge the participation of the patients and their family. We thanks Marie-Therese Zabet (Cell and tissue bank of the Hospices Civils de Lyon, France) for giving us some age matched control primary fibroblasts used in this study and Patricia Combes and Celine Gonthier (Inserm UMR 931, GReD, Clermont-Ferrand, France) for help establishing the primary fibroblasts culture. We acknowledge Pr Déchelotte, CHU of Clermont-Ferrand, to provide us a control brain sample. We acknowledge the Brain and Tissue Bank for Developmental Disorders at the University of Maryland, Baltimore, Maryland to provide us adult human brain tissues.

REFERENCES

1. Tritsch,D., Chesnoy-Marchais,D. and Feltz,A. (1999) *Physiologie du neurone*. Editions Doin.
2. Boespflug-Tanguy,O., Labauge,P., Fogli,A. and Vours-Barriere,C. (2008) Genes involved in leukodystrophies: a glance at glial functions. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 8, 217-229.
3. Schiffmann,R., Moller,J.R., Trapp,B.D., Shih,H.H., Farrer,R.G., Katz,D.A., Alger,J.R., Parker,C.C., Hauer,P.E. and Kaneski,C.R. (1994) Childhood ataxia with diffuse central nervous system hypomyelination. *Ann. Neurol*, 35, 331-340.
4. van der Knaap,M.S., Barth,P.G., Gabreëls,F.J., Franzoni,E., Begeer,J.H., Stroink,H., Rotteveel,J.J. and Valk,J. (1997) A new leukoencephalopathy with vanishing white matter. *Neurology*, 48, 845-855.
5. Fogli,A., Dionisi-Vici,C., Deodato,F., Bartuli,A., Boespflug-Tanguy,O. and Bertini,E. (2002) A severe variant of childhood ataxia with central hypomyelination/vanishing white matter leukoencephalopathy related to EIF21B5 mutation. *Neurology*, 59, 1966-1968.
6. Fogli,A., Wong,K., Eymard-Pierre,E., Wenger,J., Bouffard,J.-P., Goldin,E., Black,D.N., Boespflug-Tanguy,O. and Schiffmann,R. (2002) Cree leukoencephalopathy and CACH/VWM disease are allelic at the EIF2B5 locus. *Ann. Neurol*, 52, 506-510.
7. Fogli,A., Rodriguez,D., Eymard-Pierre,E., Bouhour,F., Labauge,P., Meaney,B.F., Zeesman,S., Kaneski,C.R., Schiffmann,R. and Boespflug-Tanguy,O. (2003) Ovarian failure related to eukaryotic initiation factor 2B mutations. *Am. J. Hum. Genet*, 72, 1544-1550.
8. van der Knaap,M.S., van Berkel,C.G.M., Herms,J., van Coster,R., Baethmann,M., Naidu,S., Boltshauser,E., Willemsen,M.A.A.P., Plecko,B., Hoffmann,G.F., et al. (2003) eIF2B-related disorders: antenatal onset and involvement of multiple organs. *Am. J. Hum. Genet*, 73, 1199-1207.
9. Labauge,P., Horzinski,L., Aygnac,X., Blanc,P., Vukusic,S., Rodriguez,D., Mauguier,F., Peter,L., Goizet,C., Bouhour,F., et al. (2009) Natural history of adult-onset eIF2B-related disorders: a multi-centric survey of 16 cases. *Brain*, 132, 2161-2169.

10. Fogli,A., Schiffmann,R., Bertini,E., Ughetto,S., Combes,P., Eymard-Pierre,E., Kaneski,C.R., Pineda,M., Troncoso,M., Uziel,G., et al. (2004) The effect of genotype on the natural history of eIF2B-related leukodystrophies. *Neurology*, 62, 1509-1517.
11. Fogli,A., Schiffmann,R., Hugendubler,L., Combes,P., Bertini,E., Rodriguez,D., Kimball,S.R. and Boespflug-Tanguy,O. (2004) Decreased guanine nucleotide exchange factor activity in eIF2B-mutated patients. *Eur. J. Hum. Genet*, 12, 561-566.
12. Horzinski,L., Huyghe,A., Cardoso,M.-C., Gonthier,C., Ouchchane,L., Schiffmann,R., Blanc,P., Boespflug-Tanguy,O. and Fogli,A. (2009) Eukaryotic initiation factor 2B (eIF2B) GEF activity as a diagnostic tool for EIF2B-related disorders. *PLoS ONE*, 4, e8318.
13. Rodriguez,D., Gelot,A., della Gaspera,B., Robain,O., Ponsot,G., Sarliève,L.L., Ghandour,S., Pompidou,A., Dautigny,A., Aubourg,P., et al. (1999) Increased density of oligodendrocytes in childhood ataxia with diffuse central hypomyelination (CACH) syndrome: neuropathological and biochemical study of two cases. *Acta Neuropathol*, 97, 469-480.
14. Wong,K., Armstrong,R.C., Gyure,K.A., Morrison,A.L., Rodriguez,D., Matalon,R., Johnson,A.B., Wollmann,R., Gilbert,E., Le,T.Q., et al. (2000) Foamy cells with oligodendroglial phenotype in childhood ataxia with diffuse central nervous system hypomyelination syndrome. *Acta Neuropathol*, 100, 635-646.
15. Dietrich,J., Lacagnina,M., Gass,D., Richfield,E., Mayer-Pröschel,M., Noble,M., Torres,C. and Pröschel,C. (2005) EIF2B5 mutations compromise GFAP+ astrocyte generation in vanishing white matter leukodystrophy. *Nat. Med*, 11, 277-283.
16. Bugiani,M., Boor,I., van Kollenburg,B., Postma,N., Polder,E., van Berkel,C., van Kesteren,R.E., Windrem,M.S., Hol,E.M., Scheper,G.C., et al. (2011) Defective glial maturation in vanishing white matter disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol*, 70, 69-82.
17. Geva,M., Cabilly,Y., Assaf,Y., Mindroul,N., Marom,L., Raini,G., Pinchasi,D. and Elroy-Stein,O. (2010) A mouse model for eukaryotic translation initiation factor 2B-leucodystrophy reveals abnormal development of brain white matter. *Brain*, 133, 2448-2461.

18. Kantor,L., Pinchasi,D., Mintz,M., Hathout,Y., Vanderver,A. and Elroy-Stein,O. (2008) A point mutation in translation initiation factor 2B leads to a continuous hyper stress state in oligodendroglial-derived cells. *PLoS ONE*, 3, e3783.
19. Kantor,L., Harding,H.P., Ron,D., Schiffmann,R., Kaneski,C.R., Kimball,S.R. and Elroy-Stein,O. (2005) Heightened stress response in primary fibroblasts expressing mutant eIF2B genes from CACH/VWM leukodystrophy patients. *Hum. Genet*, 118, 99-106.
20. van der Voorn,J.P., van Kollenburg,B., Bertrand,G., Van Haren,K., Scheper,G.C., Powers,J.M. and van der Knaap,M.S. (2005) The unfolded protein response in vanishing white matter disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol*, 64, 770-775.
21. van Kollenburg,B., van Dijk,J., Garbern,J., Thomas,A.A.M., Scheper,G.C., Powers,J.M. and van der Knaap,M.S. (2006) Glia-specific activation of all pathways of the unfolded protein response in vanishing white matter disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol*, 65, 707-715.
22. Horzinski,L., Kantor,L., Huyghe,A., Schiffmann,R., Elroy-Stein,O., Boespflug-Tanguy,O. and Fogli,A. (2010) Evaluation of the endoplasmic reticulum-stress response in eIF2B-mutated lymphocytes and lymphoblasts from CACH/VWM patients. *BMC Neurol*, 10, 94.
23. Arquint,M., Roder,J., Chia,L.S., Down,J., Wilkinson,D., Bayley,H., Braun,P. and Dunn,R. (1987) Molecular cloning and primary structure of myelin-associated glycoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 84, 600-604.
24. Campagnoni,A.T. (1988) Molecular biology of myelin proteins from the central nervous system. *J. Neurochem*, 51, 1-14.
25. LeVine,S.M., Wong,D. and Macklin,W.B. (1990) Developmental expression of proteolipid protein and DM20 mRNAs and proteins in the rat brain. *Dev. Neurosci*, 12, 235-250.
26. Spörkel,O., Uschkureit,T., Büssow,H. and Stoffel,W. (2002) Oligodendrocytes expressing exclusively the DM20 isoform of the proteolipid protein gene: myelination and development. *Glia*, 37, 19-30.
27. Wang,E., Dimova,N. and Cambi,F. (2007) PLP/DM20 ratio is regulated by hnRNPH and F and a novel G-rich enhancer in oligodendrocytes. *Nucleic Acids Res*, 35, 4164-4178.

28. DiMauro,S. and Schon,E.A. (2008) Mitochondrial disorders in the nervous system. *Annu. Rev. Neurosci*, 31, 91-123.
29. Fichera,M., Lo Giudice,M., Falco,M., Sturnio,M., Amata,S., Calabrese,O., Bigoni,S., Calzolari,E. and Neri,M. (2004) Evidence of kinesin heavy chain (KIF5A) involvement in pure hereditary spastic paraplegia. *Neurology*, 63, 1108-1110.
30. Castrillon,D.H. and Wasserman,S.A. (1994) Diaphanous is required for cytokinesis in *Drosophila* and shares domains of similarity with the products of the limb deformity gene. *Development*, 120, 3367-3377.
31. Kerr,M.K. and Churchill,G.A. (2001) Statistical design and the analysis of gene expression microarray data. *Genet. Res*, 77, 123-128.
32. Riva,A., Carpentier,A.-S., Torr sani,B. and H naut,A. (2005) Comments on selected fundamental aspects of microarray analysis. *Comput Biol Chem*, 29, 319-336.
33. Didier,G., Br zellec,P., Remy,E. and H naut,A. (2002) GeneANOVA--gene expression analysis of variance. *Bioinformatics*, 18, 490-491.
34. Fogli,A. and Boespflug-Tanguy,O. (2006) The large spectrum of eIF2B-related diseases. *Biochem. Soc. Trans*, 34, 22-29.
35. Lin,W. and Popko,B. (2009) Endoplasmic reticulum stress in disorders of myelinating cells. *Nat. Neurosci*, 12, 379-385.
36. Yeo,G., Holste,D., Kreiman,G. and Burge,C.B. (2004) Variation in alternative splicing across human tissues. *Genome Biol*, 5, R74.
37. Blencowe,B.J. (2006) Alternative splicing: new insights from global analyses. *Cell*, 126, 37-47.
38. Ule,J. and Darnell,R.B. (2006) RNA binding proteins and the regulation of neuronal synaptic plasticity. *Curr. Opin. Neurobiol*, 16, 102-110.
39. Capello,E., Voskuhl,R.R., McFarland,H.F. and Raine,C.S. (1997) Multiple sclerosis: re-expression of a developmental gene in chronic lesions correlates with remyelination. *Ann. Neurol*, 41, 797-805.

40. Scherer,S.S., Braun,P.E., Grinspan,J., Collarini,E., Wang,D.Y. and Kamholz,J. (1994) Differential regulation of the 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase gene during oligodendrocyte development. *Neuron*, 12, 1363-1375.
41. Yu,W.P., Collarini,E.J., Pringle,N.P. and Richardson,W.D. (1994) Embryonic expression of myelin genes: evidence for a focal source of oligodendrocyte precursors in the ventricular zone of the neural tube. *Neuron*, 12, 1353-1362.
42. Iwata,K., Matsuzaki,H., Manabe,T. and Mori,N. (2011) Altering the expression balance of hnRNP C1 and C2 changes the expression of myelination-related genes. *Psychiatry Res.* Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21684615>.
43. White,R., Gonsior,C., Krämer-Albers,E.-M., Stöhr,N., Hüttelmaier,S. and Trotter,J. (2008) Activation of oligodendroglial Fyn kinase enhances translation of mRNAs transported in hnRNP A2-dependent RNA granules. *J. Cell Biol*, 181, 579-586.
44. Zearfoss,N.R., Clingman,C.C., Farley,B.M., McCoig,L.M. and Ryder,S.P. (2011) Quaking regulates Hnrnpal expression through its 3' UTR in oligodendrocyte precursor cells. *PLoS Genet*, 7, e1001269.
45. Laursen,L.S., Chan,C.W. and Ffrench-Constant,C. (2011) Translation of myelin basic protein mRNA in oligodendrocytes is regulated by integrin activation and hnRNP-K. *J. Cell Biol*, 192, 797-811.
46. Liu,X. and Mertz,J.E. (1995) HnRNP L binds a cis-acting RNA sequence element that enables intron-dependent gene expression. *Genes Dev*, 9, 1766-1780.
47. Haak,L.L., Grimaldi,M. and Russell,J.T. (2000) Mitochondria in myelinating cells: calcium signaling in oligodendrocyte precursor cells. *Cell Calcium*, 28, 297-306.
48. Kann,O. and Kovács,R. (2007) Mitochondria and neuronal activity. *Am. J. Physiol., Cell Physiol*, 292, C641-657.
49. Lyons,D.A., Naylor,S.G., Scholze,A. and Talbot,W.S. (2009) Kif1b is essential for mRNA localization in oligodendrocytes and development of myelinated axons. *Nat. Genet*, 41, 854-858.

50. Bione,S., Sala,C., Manzini,C., Arrigo,G., Zuffardi,O., Banfi,S., Borsani,G., Jonveaux,P., Philippe,C., Zuccotti,M., et al. (1998) A human homologue of the *Drosophila melanogaster* diaphanous gene is disrupted in a patient with premature ovarian failure: evidence for conserved function in oogenesis and implications for human sterility. *Am. J. Hum. Genet*, 62, 533-541.
51. Vorstman,J.A.S., van Daalen,E., Jalali,G.R., Schmidt,E.R.E., Pasterkamp,R.J., de Jonge,M., Hennekam,E.A.M., Janson,E., Staal,W.G., van der Zwaag,B., et al. (2011) A double hit implicates DIAPH3 as an autism risk gene. *Mol. Psychiatry*, 16, 442-451.
52. Hobson,G.M., Huang,Z., Sperle,K., Stabley,D.L., Marks,H.G. and Cambi,F. (2002) A PLP splicing abnormality is associated with an unusual presentation of PMD. *Ann. Neurol*, 52, 477-488.
53. Wang,E., Huang,Z., Hobson,G.M., Dimova,N., Sperle,K., McCullough,A. and Cambi,F. (2006) PLP1 alternative splicing in differentiating oligodendrocytes: characterization of an exonic splicing enhancer. *J. Cell. Biochem*, 97, 999-1016.
54. Van Haren,K., van der Voorn,J.P., Peterson,D.R., van der Knaap,M.S. and Powers,J.M. (2004) The life and death of oligodendrocytes in vanishing white matter disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol*, 63, 618-630.
55. Eng,L.F., Ghirnikar,R.S. and Lee,Y.L. (2000) Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem. Res*, 25, 1439-1451.
56. Perng,M.-D., Wen,S.-F., Gibbon,T., Middeldorp,J., Sluijs,J., Hol,E.M. and Quinlan,R.A. (2008) Glial fibrillary acidic protein filaments can tolerate the incorporation of assembly-compromised GFAP-delta, but with consequences for filament organization and alphaB-crystallin association. *Mol. Biol. Cell*, 19, 4521-4533.
57. Middeldorp,J. and Hol,E.M. (2011) GFAP in health and disease. *Prog. Neurobiol*, 93, 421-443.
58. Mignot,C., Boespflug-Tanguy,O., Gelot,A., Dautigny,A., Pham-Dinh,D. and Rodriguez,D. (2004) Alexander disease: putative mechanisms of an astrocytic encephalopathy. *Cell. Mol. Life Sci*, 61, 369-385.

Affected patients description									Control subjects description			
Patient number	Type of LD	Age at disease onset	Disease duration *	Mutated gene	Molecular or biochemical defect	Gender	Age skin biopsy	Fb passages	Patient number	Gender	Age at skin biopsy	Fb passages
291-1	ERD	2.3 y	2.7 y	<i>EIF2B5</i>	c.338G>A/c.1160A>G	F	9 y	5	1530-1	F	9 y	7
375-1	ERD	2.6 y	3 y	<i>EIF2B5</i>	c.338G>A /c.1948G>A	F	2,7 y	4	1545-1	F	16 m	5
393-1	ERD	0.9 y	0.7 y	<i>EIF2B5</i>	c.925G>C/ c.925G>C	F	13 m	3	1540-1	F	15 m	8
393-2	ERD	0.8 y	0.8 y	<i>EIF2B5</i>	c.925G>C/ c.925G>C	F	11 m	4	1541-1	F	9 m	6
431-1	ERD	1,5 y	3.5 y	<i>EIF2B5</i>	c.338G>A /c.1884G>A	F	3,6 y	4	1178-1	F	5 y	10
432-2	ERD	1.5 y	2.5 y	<i>EIF2B5</i>	c.271A>G/ c.1015C>T	M	3,5 y	7	1596-1	M	3 y	8
590-2	ERD	1 y	3.5 y	<i>EIF2B5</i>	c.1028A>G/c.1153A>G	F	3 y	3	1178-2	F	3 y	8
894-1	ERD	0.6 y	10 d	<i>EIF2B5</i>	c.584G>A/ c.584G>A	M	7 m	3	1539-1	M	8 m	8
894-2	ERD	0.4 y	10 d	<i>EIF2B5</i>	c.584G>A/ c.584G>A	F	5 m	3	1538-1	F	6 m	11
1036-1	ERD	0.8 y	6 m	<i>EIF2B5</i>	c.967C>T/c.1280C>T	M	12 m	3	1537-1	M	10 m	9
351-1	AD	1 y	NA	<i>GFAP</i>	c.729C>T	F	7 y	4	1178-3	F	8 y	10
672-1	AD	6 m	NA	<i>GFAP</i>	c.243A>T	F	6,6 y	5	1594-1	F	7 y	6
1303-1	AD	NA	NA	<i>GFAP</i>	c.249C>T	F	3,5 y	4	1178-2	F	3 y	8
256-1	MLC	3 y	NA	<i>MLC1</i>	c.249G>T/c.IVS5+6T>G	M	15 y	5	1178-4	M	17 y	10
773-1	MLC	3,5 y	NA	<i>MLC1</i>	c.135insC/c.135insC	F	4,7 y	3	1178-1	F	5 y	10
1143-1	SLS	2 m	NA	<i>ALDH3A2</i>	decreased FALDH activity	F	4 y	6	1600-1	F	4 y	6
1179-1	SLS	At birth	NA	<i>ALDH3A2</i>	decreased FALDH activity	M	3 y	9	1596-1	M	3 y	10
771-1	KB	3.5 m	NA	<i>GALC</i>	decreased b-gal activity	F	8 m	3	1539-1	F	8 m	9
167-1	PMD	1 m	NA	<i>PLP1</i>	<i>PLP1</i> duplication	M	4 y	7	1178-5	M	5 y	7
767-1	PMD	At birth	NA	<i>PLP1</i>	c.454-1G>A/c.454-1G>A	M	2 y	4	1598-1	M	2 y	5

Table 1. Characteristics of subjects and fibroblasts used in our differential transcriptomic analysis.

LD: leukodystrophy, ERD: eIF2B-related disorder, AD: Alexander disease, MLC: Cystic Megalencephalopathy, SLS: Sjögren-Larsson syndrome, KB: Krabbe disease, PMD: Pelizaeus-Merzbacher disease, y: year, m: months, d: day, b-gal: beta-galactosidase, F: female, M: male, Fb: fibroblasts, NA: not available. * disease duration in year, corresponding to the time between age at disease onset and death or confinement to bed with loss of neurodevelopment abilities and need of constant assistance.

Patient number	Age at autopsy	Gender	Mutated gene	cDNA mutation	Usage
1327	Fœtus 15w	F	WT	WT	qPCR, WB
1437	Fœtus 15w	M	WT	WT	qPCR, WB
412	Fœtus 19w	M	WT	WT	qPCR, WB
46	Fœtus 19w	F	WT	WT	qPCR, WB
917	Fœtus 19w	M	WT	WT	qPCR
311	Fœtus 24w	F	WT	WT	qPCR, WB
393	Fœtus 14w	M	<i>EIF2B5</i>	p.Val309Leu/p.Val309Leu	qPCR
1767	Fœtus 16w	F	<i>EIF2B5</i>	p.Ala239Pro/ p.Ala239Pro	qPCR, WB
814	Child 16m	M	WT	WT	qPCR, WB
1500	Child 7y	M	WT	WT	qPCR, WB
1024	Child 14y	M	WT	WT	qPCR, WB
393-2	Child 13m	F	<i>EIF2B5</i>	p.Val309Leu/p.Val309Leu	qPCR, WB
5103	Child 16m	M	<i>EIF2B</i>	NA	qPCR, WB
357-1	Child 4y	M	<i>EIF2B5</i>	p.Arg136Cys/p.Arg339Trp	WB
359-1	Child 10y	M	<i>EIF2B4</i>	p.Pro243Leu/p.Pro243Leu	qPCR, WB
NA	Child	NA	<i>EIF2B</i>	NA	qPCR
1203	Child 7y	M		p.Gly386Val/p.Arg113His	qPCR, WB
4993	Child 12y	M	<i>EIF2B</i>	NA	qPCR, WB
1465	Adult 17y	M	WT	WT	qPCR, WB
M3702M	Adult 19y	M	WT	WT	qPCR, WB
2804	Adult 26y	M	WT	WT	qPCR, WB
5017	Adult 24y	M	<i>EIF2B</i>	NA	qPCR, WB
5106	Adult 39y	F	<i>EIF2B5</i>	p.Pro454Ser/p.Arg113His	qPCR, WB

Table 2. Characteristics of brain samples used for microarray data validation on QRT-PCR (qPCR) and/or western blot (WB) analysis. y: years, m: months, w: weeks, NA: not available, M: male, F: female, WT: wild type.

A

Gene name	(1.a) Description	Taqman Gene Expression Assay reference
<i>HNRNPF</i>	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F	Hs01014497_ml
<i>DIAPH3</i>	Diaphanous homolog 3	Hs01107326_ml
<i>VDAC3</i>	Voltage-dependent anion-selective channel protein 3	Hs01091534_ml
<i>HNRPL</i>	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	Hs00704850_gl
<i>MRPL28</i>	Mitochondrial ribosomal protein 28L	Hs00371771_ml
<i>HNRPH1</i>	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	Hs01033845_gl
<i>HCCS</i>	Holocytochrome C synthase	Hs00403938_ml
<i>HNRPC</i>	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C	Hs01028912_ml
<i>MRPS26</i>	Mitochondrial ribosomal protein 26S	Hs00258287_ml
<i>KIF5B</i>	Kinesin family member 5B	Hs00189659_ml
<i>HNRNPU</i>	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	Hs00244919_ml
<i>HNRNPD</i>	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D	Hs00606052_ml
<i>HNRNPR</i>	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R	Hs00195167_ml
<i>PLP</i>	Proteolipid protein 1	Mm00456892_ml
<i>PLP/DM20</i>	Proteolipid protein 1	Mm00456894_ml

B

qPCR Primers	Sequence (5'-3')
Total <i>GFAP</i> , forward	AGAAGCTCCAGGATGAAACC
Total <i>GFAP</i> , reverse	TTCATCTGCTTCCTGTCTATAGG
<i>GFAP</i> α , forward	AGAGGTCATTAAGGAGTCCA
<i>GFAP</i> α , reverse	CAACTATCCTGCTTCTGCTC
<i>GFAP</i> δ , forward	CCTACAGGAAGCTGCTAGAG
<i>GFAP</i> δ , reverse	GCGTTCCATTTACAATCTGGT
<i>GAPDH</i> , forward	CTCTCTGCTCCTCCTGTTCGAC
<i>GAPDH</i> , reverse	TGAGCGATGTGGCTCGGCT
<i>HPRT</i> , forward	ATGGGAGGCCATCACATTGT
<i>HPRT</i> , reverse	ATGTAATCCAGCAGGTCAGCAA

Table 3. List of the genes selected for QRT-PCR analysis. A. Gene names, descriptions and Taqman Gene Expression Assay reference used for QRT-PCR quantitation are mentioned. **B.** Transcript-specific primers and their sequences for SYBR Green quantitation.

Gene name	FDR (%)		Microarray expression rate		QRT-PCR expression rate		R ²		p-value
	eIF2B-pathy	OL	eIF2B-pathy	OL	eIF2B-pathy	OL	eIF2B-pathy	OL	
<i>HNRNPF</i>	1.1	6.93	0.88 ± 0.15	1.16 ± 0.42	0.76 ± 0.15	1.23 ± 0.49	0.888	0.05	0.000
<i>DIAPH3</i>	0.12	77.39	0.84 ± 0.24	0.97 ± 0.28	0.60 ± 0.13	1.01 ± 0.36	0.711	0.203	0.009
<i>VDAC3</i>	0.05	93.98	0.82 ± 0.19	1.02 ± 0.43	0.77 ± 0.17	1.14 ± 0.30	0.594	0.07	0.008
<i>HNRPL</i>	0	82.58	0.77 ± 0.22	1.00 ± 0.21	0.80 ± 0.18	1.06 ± 0.26	0.555	0.033	0.000
<i>MRPL28</i>	0.07	61.09	0.86 ± 0.14	1.01 ± 0.23	0.76 ± 0.11	1.13 ± 0.19	0.497	0.004	0.004
<i>HNRPH1</i>	0	5.02	0.66 ± 0.15	1.01 ± 0.38	0.75 ± 0.13	1.09 ± 0.23	0.479	0.051	0.030
<i>HCCS</i>	0.01	12.91	0.84 ± 0.12	0.93 ± 0.41	1.01 ± 0.17	1.03 ± 0.28	0.337	0.062	0.152
<i>HNRPC</i>	0.04	48.18	0.78 ± 0.23	1.01 ± 0.24	0.83 ± 0.20	1.11 ± 0.27	0.117	0.004	0.144
<i>MRPS26</i>	0.07	15.24	0.86 ± 0.13	1.09 ± 0.32	0.94 ± 0.21	1.22 ± 0.54	0.016	0.001	0.736
<i>KIF5B</i>	0.01	40.18	0.86 ± 0.11	0.94 ± 0.43	0.81 ± 0.16	0.96 ± 0.25	0.01	0.003	0.876

Table 4. Recapitulative data of microarray and QRT-PCR experiments, obtained in eIF2B-mutated and OL fibroblasts for the 10 selected genes and correlation analysis between microarray and QRT-PCR data. Expression rate of microarray were calculated using the formula $\text{Mean}((\text{Corrected G log value})_i / (\text{Corrected G log value})_j)$ were $(\text{Corrected G log value})$ were calculated as explained in material and methods. i correspond to a patient's fibroblasts and j to a control's fibroblasts. The $(\text{Corrected G log value})$ between the ethanol and thapsigargin conditions were not different for the 10 selected genes which allowed us to mean them. Expression rate of QRT-PCR were calculated using the formula $\text{Mean}(2^{(\Delta\text{patient} - \Delta\text{control})})$ were $\Delta\text{patient}$ correspond to $(\text{Ct gene } x - \text{Ct B2M})$ for one patient and $\Delta\text{control}$ $(\text{Ct gene } x - \text{Ct B2M})$ for one control. The $2^{(\Delta\text{patient} - \Delta\text{control})}$ between the ethanol and thapsigargin conditions were not different for the 10 selected genes which allowed us to mean them. The two correlation coefficients are transformed with the Fisher Z-transform $Z_f = 1/2 * \ln((1+R)/(1-R))$ and the difference $z = (Z_{f1} - Z_{f2}) / \text{SQRT}(1/(N1-3) + 1/(N2-3))$ is approximately Standard Normal distributed. Then the p-value of the difference has been calculated. For six genes, the determination coefficient (R^2) is significantly higher in 8/10 eIF2B-mutated patient/control fibroblasts couples than in the 10 OL patient/control fibroblasts couples. The difference between eIF2B-mutated/control and OL patient/control couples is high but not significant for the *HCCS* and *HNRNPC* genes and no significant differences is observed for the *KIF5B* and *MRPS26* genes. FDR: False Discovery Rate value.

Figure 1

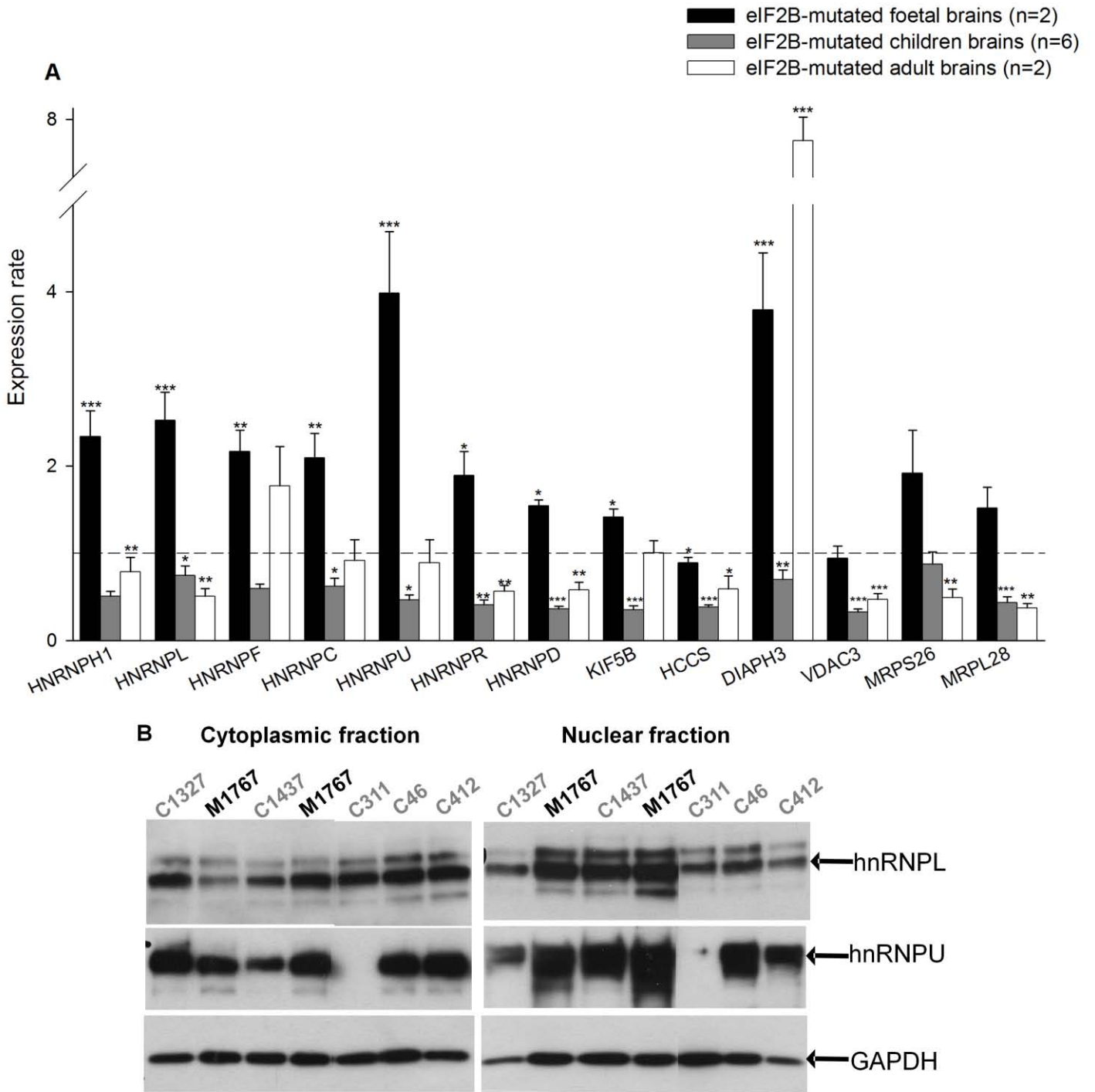
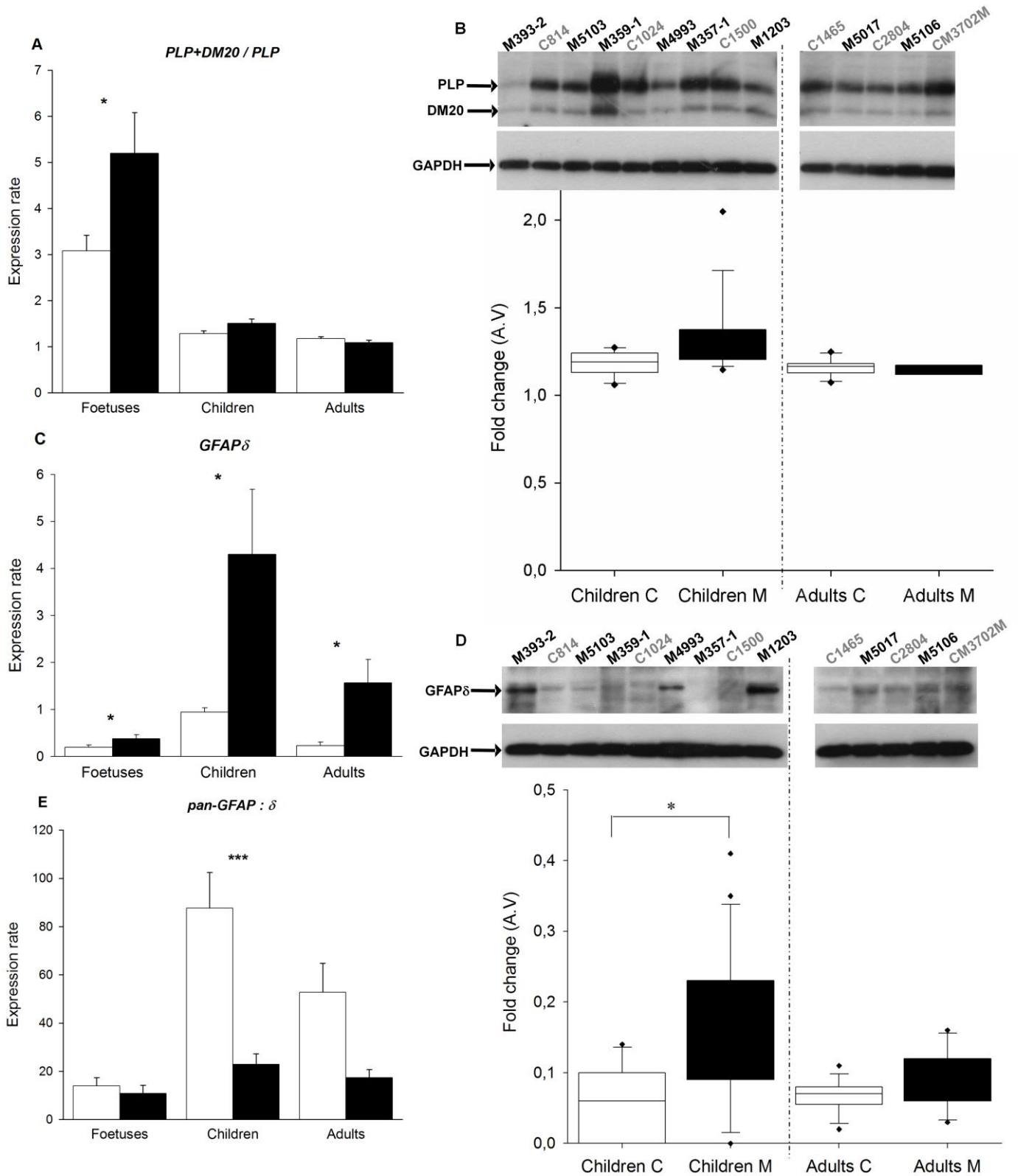


Figure 2



LEGENDS TO FIGURES

Figure 1. Expression rates of the 13 selected mRNA and two hnRNP proteins in eIF2B-mutated foetal and patients brains. **A.** RNA was isolated from brains and analyzed by quantitative RT-PCR for expression of the 13 selected genes. Expression rates were calculated using the formula $\text{Mean}(2^{-(\Delta\text{patient}-\Delta\text{control})})$ where $\Delta\text{patient}$ correspond to $(\text{Ct gene } x - \text{Ct } B2M)$ for one patient and $\Delta\text{control}$ $(\text{Ct gene } x - \text{Ct } B2M)$ for the corresponding control. Errors bars represent standard error (s.e.m.) (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$). **B.** To assess the expression of hnRNPL and hnRNPU proteins in the brain autopsy samples, a nuclear and cytoplasmic differential extraction were performed followed by western blot analysis using antibodies specific for hnRNPL and U. GAPDH served as loading control. Are represented here only the foetuses samples. C: control, M: eIF2B-mutated.

Figure 2. Study of the splice *PLP/DM20* and *GFAP* in eIF2B-mutated patients brains. **A, C, E.** RNA was isolated from control brains (white bars) vs eIF2B-mutated patient brains (black bars) and analyzed by quantitative RT-PCR for expression of *PLP*, *PLP+DM20*, *pan-GFAP* and *GFAP δ* . Expression rates were calculated using the formula $\text{Mean}(2^{-(\text{Ct gene } x - \text{Ct } B2M)})$ and ratio was performed between the different *PLP* and *GFAP* isoforms. Errors bars represent standard error (s.e.m.) (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$). **B, D.** Proteins were extracted from controls and eIF2B-mutated patient brains and western blot analysis was performed on the cytoplasmic fractions using antibodies specific for PLP, DM20, pan-GFAP and GFAP δ . GAPDH served as loading control. C: control, M: eIF2B-mutated. The images were quantified using ImageQuant TL software and the box plots below show the relative expression of PLP+DM20/PLP (B) and GFAP δ (D) (corrected for GAPDH levels) in control and patients brains. A.V.: arbitrary value.

TABLE S1

List of the 70 genes specifically dysregulated in eIF2B-mutated Fb obtained by microarray analysis.

Refseq mRNA	Gene Name	Description	FDR (%)	Ratio CACH/VWM / Healthy
NM_005520	<i>HNRPH1</i>	Heterogenous nuclear ribonucleoprotein H1	0	0,65
NM_001533	<i>HNRPL</i>	Heterogenous nuclear ribonucleoprotein L	0	0,71
XR_017206	<i>LOC643744</i>	Similar to D-PCa-2 protein isoform c	0	0,73
NM_005517	<i>HMGN2</i>	High-mobility group nucleosome-binding domain 2	0	0,67
NM_002710	<i>PPP1CC</i>	Protein phosphatase 1C catalytic subunit	0	0,72
NM_031844	<i>HNRPU</i>	Heterogenous nuclear ribonucleoprotein U	0	0,75
NM_004965	<i>HMGN1</i>	High-mobility group nucleosome binding domain 1	0	0,79
NM_006265	<i>RAD21</i>	Protein involved in DNA double-strand break repair	0	0,64
NM_182800	<i>ARS2</i>	Arsenite resistance protein 2	0	0,78
NM_007375	<i>TARDBP</i>	TAR DNA binding protein	0,01	0,80
NM_004521	<i>KIF5B</i>	Kinesin family member 5B	0,01	0,87
NM_020810	<i>TRMT5</i>	tRNA methyltransferase 5 homolog (S. cerevisiae)	0,01	0,73
NM_017824	<i>MARCH5</i>	Membrane associated ring finger (C3HC4) 5	0,01	0,86
AY374131	<i>MTHFD1L</i>	Methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+ dependent) 1-like	0,01	0,80
NM_005333	<i>HCCS</i>	Holocytochrome c synthase	0,01	0,82
NM_022051.1	<i>EGLN1</i>	egl nine homolog 1 (C.elegans)	0,01	0,84
NM_014623	<i>MEA1</i>	Male-enhanced antigen 1	0,01	0,80
NM_025165	<i>ELL3</i>	Elongation factor RNA polymerase II-like 3	0,01	1,07
NM_006072	<i>CCL26</i>	Chemokine (C-C motif) ligand 26	0,01	1,06
NM_022913	<i>GPBP1</i>	GC-rich promoter binding protein 1	0,02	0,84
NM_003677	<i>DENR</i>	Density-regulated protein	0,02	0,80

NM_006559	<i>KHDRBS1</i>	KH domain containing, RNA binding, signal transduction associated 1	0,02	0,70
NM_005826	<i>HNRPR</i>	Heterogenous nuclear ribonucleoprotein R	0,02	0,77
NM_002539	<i>ODC1</i>	Ornithine decarboxylase 1	0,02	0,68
NM_000709	<i>BCKDHA</i>	Branched chain keto acid dehydrogenase E1, alpha polypeptide	0,02	0,85
NM_005614	<i>RHEB</i>	Ras homolog enriched in brain	0,02	0,86
NM_021038	<i>MBNL1</i>	Muscleblind-like 1 (Drosophila)	0,02	0,74
NM_022662	<i>ANAPC1</i>	Anaphase promoting complex subunit 1	0,03	0,77
AK023110	<i>SSU72</i>	SSU72 RNA polymerase II CTD phosphatase homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	0,04	0,83
NM_014426	<i>SNX5</i>	Sorting nexin 5	0,04	0,75
NM_003200	<i>TCF3</i>	Transcription factor 3 (E2A immunoglobulin enhancer binding factors E12/E47)	0,04	0,79
NM_031314	<i>HNRPC</i>	Heterogenous nuclear ribonucleoprotein C	0,04	0,69
NM_001007553	<i>CSDE1</i>	Cold shock domain containing E1, RNA-binding	0,04	0,87
NM_003348	<i>UBE2N</i>	Ubiquitin-conjugated enzyme 2N	0,04	0,83
NM_014984	<i>AZII</i>	5-azacytidine induced 1	0,04	0,77
NM_031370	<i>HNRPD</i>	Heterogenous nuclear ribonucleoprotein D	0,04	0,75
NM_006601	<i>PTGES3</i>	Prostaglandin E synthase 3 (cytosolic)	0,04	0,85
NM_032478	<i>MRPL38</i>	Mitochondrial ribosomal protein L38	0,05	0,82
NM_025128	<i>MUS81</i>	MUS81 endonuclease homolog (<i>S.cerevisiae</i>)	0,05	0,83
NM_012325	<i>MAPRE1</i>	Microtubule-associated protein, RP/EB family, member 1	0,05	0,85
NM_014184	<i>CNIH4</i>	Cornichon homolog 4 (Drosophila)	0,05	0,87
NM_005662	<i>VDAC3</i>	Voltage-dependent anion channel 3	0,05	0,77
NM_001681	<i>ATP2A2</i>	ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, cardiac muscle, slow twitch 2	0,05	0,83
NM_003146	<i>SSRP1</i>	Structure specific recognition protein 1	0,05	0,81
NM_139313	<i>YME1L1</i>	YME1L-like 1 (<i>S.cerevisiae</i>)	0,05	0,84
AK125922	<i>CSNK2A2</i>	Casein kinase 2, alpha prime polypeptide	0,06	0,86
NM_003002	<i>SDHD</i>	Succinate dehydrogenase complex, subunit D, integral to membrane protein	0,06	0,85
NM_014670	<i>BZWI</i>	Basic leucine zipper and W2 domains 1	0,06	0,73

NM_144778	<i>MBNL2</i>	Muscleblind-like 2 (Drosophila)	0,06	0,67
NM_030811	<i>MRPS26</i>	Mitochondrial ribosomal protein S26	0,07	0,84
NM_006428	<i>MRPL28</i>	Mitochondrial ribosomal protein L28	0,07	0,82
NM_003798	<i>CTNNAL1</i>	Catenin (cadherin-associated protein), alpha-like 1	0,07	0,61
NM_004279	<i>PMPCB</i>	Peptidase (mitochondrial processing) beta	0,07	0,83
NM_013438	<i>UBQLN1</i>	Ubiquilin 1	0,07	0,89
NM_006331	<i>EMG1</i>	EMG1 nucleolar protein homolog (S.cerevisiae)	0,07	0,79
NM_017840	<i>MRPL16</i>	Mitochondrial ribosomal protein L16	0,08	0,85
NM_017755	<i>NSUN2</i>	NOL1/NOP2/sun domain family, member 2	0,08	0,83
NM_004523	<i>KIF11</i>	Kinesin family member 11	0,08	0,77
NM_182640	<i>MRPS9</i>	Mitochondrial ribosomal protein S9	0,08	0,83
NM_001031740	<i>MANEAL</i>	Mannosidase, endo-alpha-like	0,09	1,07
NM_001008735	<i>HMGIL1</i>	High-mobility group (nonhistone chromosomal) protein 1-like 1	0,09	0,71
NM_018225	<i>SMUI</i>	Smu-1 suppressor of mec-8 and unc-52 homolog (C.elegans)	0,09	0,84
NM_003286	<i>TOPI</i>	Topoisomerase (DNA) 1	0,09	0,76
NM_001419	<i>ELAVL1</i>	ELAV (embryonic lethal, abnormal vision, Drosophila)-like 1 (Hu antigen R)	0,1	0,86
NM_000175	<i>GPI</i>	Glucose phosphate isomerase	0,1	0,75
NM_198329	<i>UBE1DC1</i>	Ubiquitin-activating enzyme E1-domain containing 1	0,1	0,79
NM_002823	<i>PTMA</i>	Prothymosin, alpha	0,1	0,70
NM_005782	<i>THOC4</i>	THO complex 4	0,1	0,80
NM_001790	<i>CDC25C</i>	Cell division cycle 25 homolog (S.pombe)	0,11	0,87
NM_030932	<i>DIAPH3</i>	Diaphanous homolog 3 (Drosophila)	0,12	0,77

FDR : False Discovery Rate

Expression rate was calculated using the formula $\text{Mean}((\text{Corrected G log value})_i / (\text{Corrected G log value})_j)$ were $(\text{Corrected G log value})$ are calculated as described in Material and Methods. i correspond to one patient's Fb sample and j to one control's Fb sample.

III. Impact des anomalies géniques du facteur eIF2B sur la maturation gliale

A. Contexte scientifique

Une des problématiques actuelle associée aux eIF2B-pathies est de comprendre l'atteinte principalement cérébrale de ces LDs, pourtant dues à des mutations d'un facteur ubiquitaire. La susceptibilité accrue de la SB aux mutations du facteur eIF2B et aux stress semble relever d'un défaut de maturation des cellules gliales. En effet, plusieurs arguments suggèrent que cette sensibilité de la SB aux mutations eIF2B pourrait être liée à un **trouble primitif de l'ontogénèse des cellules gliales au cours du développement** :

- des études anatomopathologiques de cerveaux de patients atteints d'eIF2B-pathie montrent une **augmentation du nombre d'OLs** dans les aires cérébrales affectées (Rodriguez et al., 1999; Wong et al., 2000) qui prennent parfois un aspect spumeux avec un cytoplasme abondant et un matériel riche en glycoprotéines (Wong et al., 2000).
- une étude a également mis en évidence un **défaut de maturation des astrocytes** avec peu de prolongements anormalement longs (Dietrich et al., 2005). Plus récemment, il a été montré une **immaturité astrocytaire** avec une forte proportion d'astrocytes en prolifération associée à une surexpression d'une protéine astrocytaire GFAP δ (Bugiani et al., 2011).

L'ensemble de ces travaux nous a permis de faire l'hypothèse d'un **trouble de développement des cellules gliales** et particulièrement des astrocytes, qui seraient les principales cibles de la pathologie, conduisant à la susceptibilité accrue du cerveau aux mutations eIF2B.

B. Méthodologie

Le modèle des mESC a été utilisé pour étudier l'impact des défauts du facteur eIF2B par une double approche complémentaire de surexpression du gène *EIF2B5* humain muté et sauvage et de sous-expression de la sous-unité eIF2B ϵ endogène au cours de la différenciation et de la maturation *in vitro* des cellules gliales.

La surexpression du gène *EIF2B5* a été induite par transfection du vecteur d'expression pCAG-IRES-Puromycine (pCAG-IP) contenant l'ADNc humain *EIF2B5* normal ou muté au niveau de l'exon 4 en sens ou en anti-sens. La mutation sélectionnée est

c.584G>A : p.Arg195His, qui a été rapportée à l'état homozygote associée aux formes infantiles précoces décrites les plus sévères, retrouvées au sein d'une population d'indiens Cree du Manitoba (mutation « CREE »).

La sous-expression du gène *Eif2b5* endogène a été réalisée à l'aide de différents shARN (« short hairpin ARN ») insérés dans un vecteur d'expression conditionnel (FlΔNeo) et ciblant des séquences différentes sur l'ADNc murin *Eif2b5*. Après sélection des cellules au G418 (néomycine), celles-ci ont été à nouveau transfectées avec un vecteur d'expression (pCRE-ER^{T2}-hygromycine) contenant la recombinaise CRE inducible au 4-hydroxy-tamoxifène (4OHT). La séquence du shARN étant placée sous le contrôle du promoteur U6 dans lequel est insérée la cassette de résistance à la néomycine flanquée par 2 sites loxP, la transcription du shARN n'est alors possible qu'après induction au 4OHT et donc excision de la cassette néomycine par la recombinaise. Les clones cellulaires doubles résistants G418-hygromycine sont analysés individuellement.

Cette CRE recombinaise est fusionnée au LBD (Ligand-Binding Domain) du récepteur aux œstrogènes humain et est activée par le 4OHT mais pas par les œstrogènes endogènes grâce à une mutation ponctuelle introduite dans ce LBD (Feil et al., 1997; Indra et al., 1999). Ce système a été largement utilisé pour induire l'expression 4OHT-dépendante de nombreux gènes dans des souris transgéniques modèles (Brocard et al., 1997; Schwenk et al., 1998). Cette CRE-ER^{T2} est environ 10 fois plus sensible à l'induction par le 4OHT que la CRE-ERT initiale (Feil et al., 1997; Indra et al., 1999).

Etant donné que les shARN ciblant un même gène peuvent donner des résultats très différents, nous avons choisi de tester sept constructions ciblant différentes régions du transcrit *Eif2b5* : 2 miARN (microARN) et 5 siARN (« small interfering ARN »). Les miARN sont des ARN non codants de 21 à 25 nucléotides qui dérivent de précurseurs plus grands qui forment des structures en boucles imparfaites. L'interférence ARN est un mécanisme induit par de longs ARN double brin (environ 500 paires de bases) qui sont pris en charge par la machinerie cellulaire pour former des petits ARN double brin de 21 à 25 paires de bases, appelés siARN. Un seul des deux brins de ces structures shARN sera incorporé au complexe RISC (RNA-Induced Silencing Complex) qui ira ensuite cliver l'ARNm cible complémentaire et/ou réprimer sa traduction (Figure 41).

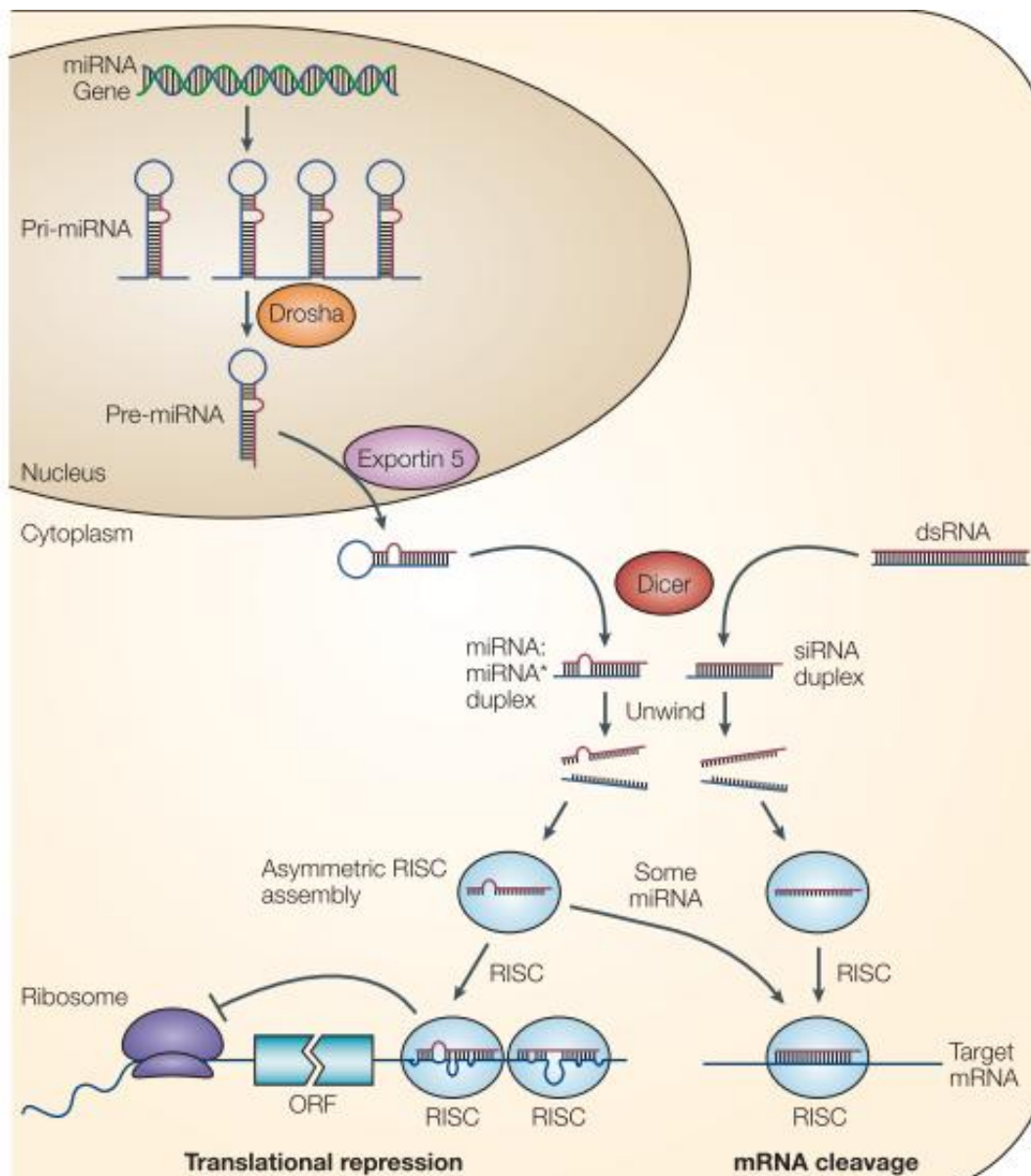


Figure 41 : Formation et mécanisme d'action des miARN et siARN (He et Hannon, 2004).

C. Résultats et discussion

1. Mise au point des paramètres de différenciation

La première étape de ce projet a été d'optimiser les paramètres de différenciation des mESC principalement en astrocytes et OLs. Différentes conditions de culture ont été testées au cours de la formation d'EBs avec différents traitements comme l'addition d'hormone thyroïdienne **L-T₃** (L-triiodothyronine), d'**acide rétinoïque** (RA) ou encore d'**acide valproïque** (VA). Les cellules obtenues ont été analysées par QRT-PCR pour suivre l'expression de gènes spécifiques de chaque lignage cellulaire : marqueurs de pluripotence, du neurectoderme, des neurones, des astrocytes et des OLs. Le protocole retenu combine deux approches : la formation d'EBs pendant 3 jours, puis leur adhésion et leur **différenciation en dérivés neurectodermiques**. L'ensemble du processus dure 17 jours.

Ces expériences permettent d'observer une nette **augmentation de l'expression des marqueurs astrocytaires et oligodendrocytaires** parallèle à une **diminution de l'expression des gènes de pluripotence** après 11 jours de culture des mESC en présence de L-T₃ combinée soit à RA soit à VA. De plus, **la présence de RA semble favoriser une différenciation plus astrocytaire** (forte induction du marqueur *Gfap*, composant, avec la vimentine, les filaments intermédiaires des cellules astrocytaires, (Chiu et al., 1981)) alors que **VA induit préférentiellement une différenciation oligodendrocytaire** (forte induction du marqueur *Olig2*, facteur de transcription exprimé dans les OPC, (Zhou et al., 2000)). Par ailleurs, nous avons mis en évidence une **expression du gène *Eif2b5* stable au cours de la différenciation des mESC**. Nous avons également pu mettre au point et valider dans ces cellules la mesure de l'activité intrinsèque du facteur eIF2B (activité GEF), jusqu'alors mesurée uniquement dans les IIb de patients.

2. Effet de la sous-expression d'*Eif2b5* sur la différenciation gliale

Après cette étape de mise au point, j'ai étudié l'effet de la sous-expression du gène *Eif2b5* endogène (ce gène codant la sous-unité epsilon du facteur eIF2B étant retrouvé le plus fréquemment muté dans la pathologie) sur la différenciation et la maturation des mESC en cellules gliales.

Sept shARN différents ont été testés et 48h de traitement au 4OHT à une dose de 1 μ M sont nécessaires pour obtenir un effet maximal de la recombinaison (Coumoul et al., 2004). Après transfection puis extraction des ARN totaux du pool de cellules transfectées, les transcrits *Eif2b5* ont été quantifiés par QRT-PCR. Seule une très légère diminution d'expression d'*Eif2b5* (environ 20%) a pu être mise en évidence avec le sh5 (annexe 4). Cependant, il semble y avoir une « fuite » du système puisque cette baisse d'expression a été retrouvée non seulement dans les cellules traitées au 4OHT mais également dans les cellules non traitées. Afin d'identifier si cette « fuite » est globale et si cette diminution d'expression d'*Eif2b5* reflète un état de sous-expression homogène dans toutes les cellules ou si elle représente une moyenne entre des cellules qui inhiberaient fortement l'expression d'*Eif2b5* et d'autres qui à l'inverse auraient une expression normale, nous avons repiqué des clones après transfection et avant traitement au 4OHT.

Parmi ces clones, quatre ont été sélectionnés (sh5-2, 11, 12 et 18) en raison d'un **taux d'expression résiduel d'*Eif2b5* allant de 40 à 74%** après traitement au 4OHT. De plus, le clone sh5-2 présente une **activité GEF abaissée à 57,9%**, proche des valeurs retrouvées dans les IIb de patients avec une *eIF2B*-pathie classique. Nous avons donc ensuite voulu différencier les cellules issues de ce clone à l'aide du protocole défini précédemment et traitement au 4OHT 1 μ M à partir de J0. De manière surprenante, toutes les cellules traitées meurent après seulement 3 jours de différenciation alors que les non traitées survivent très bien, et ce, que les cellules aient été transfectées avec le sh5 ou avec le vecteur vide F1 Δ Neo. Le 4OHT à une dose de 1 μ M, dose classiquement utilisée dans la littérature (Coumoul et al., 2004), semble donc fortement toxique pour les cellules engagées en différenciation alors que nous n'avons observé aucun effet sur les cellules en prolifération. Dans notre système cellulaire, il est donc nécessaire d'utiliser une dose de 4OHT capable d'induire une sous-expression suffisante d'*Eif2b5* sans être toxique pour les cellules en différenciation. Une étude ayant testé des doses croissantes de 4OHT et des temps d'induction variables montre une induction de la recombinaison suffisante dès 48h de traitement et des résultats comparables à 100nM et 1000nM (Vallier et al., 2001). Nous avons donc traité les cellules à l'état de pluripotente 48h à 1 μ M puis au cours de la formation des EBs et tout au long de la différenciation à 100nM. Malgré l'absence de toxicité du 4OHT, le **nombre de cellules diminue très rapidement** et celles-ci peinent à émerger des EBs et à se différencier. Parallèlement, nous observons une **perte de la sous-expression d'*Eif2b5*** dans ces cellules, très probablement due à une contre sélection.

Etant donné le caractère essentiellement cérébrale et gliale de la pathologie, malgré le fait que le gène en cause soit ubiquitaire, nous avons voulu déterminer si cette perte de sous-expression *Eif2b5* et cette létalité était spécifique ou non du lignage neurectodermique. Afin de tester cette hypothèse, nous avons cette fois induit la différenciation des mESC après formation des EBs à l'aide de DMSO (Dyméthyl-Sulfoxyde), bien connu pour induire une différenciation mésodermique (Rudnicki et al., 1989). Cependant, là encore, les cellules traitées meurent rapidement et les quelques cellules survivantes perdent la sous-expression, suggérant qu'il ne s'agit donc **pas d'un effet spécifique du lignage neurectodermique**.

Une sous-expression aussi importante de la sous-unité eIF2B ϵ à des stades aussi précoces de la différenciation gliale semble donc létale pour les cellules.

3. Effet de la surexpression d'*Eif2b5* muté sur la différenciation gliale

Etant donné que certaines mutations eIF2B ont pas ou peu d'effet sur l'activité GEF ou la formation du complexe, surtout dans certaines formes classiques juvéniles ou adultes modérées (Horzinski et al., 2009; Liu et al., 2011), il apparaît de plus en plus clairement que la pathologie pourrait être liée dans certains cas à la présence de la sous-unité mutée dans la cellule plutôt qu'à un défaut biochimique. C'est pourquoi nous avons choisi de tester ensuite l'effet de la surexpression du gène *EIF2B5* humain muté et sauvage sur la différenciation gliale.

De manière intéressante, les constructions *EIF2B5* anti-sens sauvage et mutée, qui devaient nous servir de témoin dans l'expérience de surexpression, ont présenté une toxicité apparente. Aucun clone n'ayant pu être obtenu, nous pensons que cet ADNc anti-sens est probablement capable de former des siARN qui peuvent cibler et dégrader ainsi l'ARN endogène.

Avec les constructions sens, une **surexpression stable** de 8 à 10 fois du gène *EIF2B5* a pu être mise en évidence au niveau transcrit et protéique au cours de la différenciation, ainsi qu'une nette **diminution d'expression du marqueur de pluripotence *Nanog*** dès la fin de la formation des EBs à J-1. NANOG est une homéoprotéine qui peut maintenir l'auto-renouvellement des ESC et la délétion du gène correspondant entraîne une perte de pluripotence (Mitsui et al., 2003).

J'ai ensuite étudié l'expression en QRT-PCR des marqueurs du neurectoderme précoces *Pax6* et *Msi1* (*Musashi homolog 1*). L'expression de *Pax6* est détectable chez la

souris à E8,5, dès la fermeture du tube neural. Il est largement exprimé dans le SNC mais également dans les cellules du pancréas, le système olfactif ainsi que l'œil en développement (*pour revue*, Georgala et al., 2011). Pax6 est nécessaire aux progéniteurs corticaux pour contrôler la durée du cycle cellulaire, la progression des divisions, ainsi que l'expression de marqueurs spécifiques de la lignée neurale (Estivill-Torrus et al., 2002). Msi1, quant à lui, est détecté au niveau le plus fort à E12 dans le cerveau murin, quand la neurogenèse débute, puis son expression diminue ensuite au cours du développement (Sakakibara et al., 1996). Nous démontrons ici une **surexpression des marqueurs Pax6 et Msi1** dans les cellules sur-exprimant *EIF2B5*, qu'il soit sauvage ou muté, suggérant une **dérégulation précoce de la prolifération et de la différenciation des précurseurs neuraux**.

Les marqueurs neuronaux *Ngn2* (*Neurogenin 2*), *Mash1* et *Map2* (*Microtubule-associated protein 2*) présentent également une expression altérée dans les cellules surexprimant *EIF2B5* en QRT-PCR. Il a été démontré que NGN2 était nécessaire durant la période embryonnaire à la génération des neurones dopaminergiques (Kele et al., 2006). MASH1 fonctionnerait comme un déterminant génique dans le cerveau où son expression est nécessaire pour la spécification des précurseurs neuronaux dans le télencéphale ventral (Casarosa et al., 1999). MAP2 est exprimé principalement dans les neurones et son expression dans les précurseurs neuronaux augmente fortement un jour après l'expression de TUJ1 (isoforme β III-tubuline spécifique des neurones) (*pour revue*, Dehmelt et Halpain, 2005). L'expression de MAP2 et TUJ1 au niveau protéique est d'ailleurs nettement anormale dans les cellules sur-exprimant *EIF2B5* avec une diminution de leur expression, suggérant une **différenciation neuronale perturbée** de ces cellules, qu'elles surexpriment la forme sauvage ou la forme mutée.

Enfin, j'ai étudié la différenciation gliale dans ces cellules. Il semblerait que **la présence de la mutation CREE empêche l'orientation importante des cellules vers la lignée oligodendrocytaire** (diminution d'expression d'OLIG2 au niveau transcrit et protéique), contrairement à la présence du gène sauvage en excès. Ceci pourrait être de fait **compensé par une différenciation astrocytaire** puisque l'on observe dans ces cellules une surexpression du marqueur GFAP au niveau transcrit et protéique.

D. Conclusion

Les expériences de **sous-expression d'*Eif2b5*** ont permis de mettre en évidence l'importance du facteur eIF2B au cours du développement. En effet, cette sous-expression

semble néfaste pour la différenciation des cellules puisque l'on observe une **léthalité précoce** et une **contre sélection** en faveur des cellules qui ne présentent pas de sous-expression. De manière intéressante, cet effet n'est pas lié à la différenciation neur ectodermique car le lignage mésodermique est également touché.

Les expériences de surexpression ont permis de montrer que **la mutation CREE orienterait les cellules vers une différenciation astrocytaire plutôt qu'oligodendrocytaire**. Ces résultats sont à mettre en parallèle avec des études récentes publiées par les groupes d'Orna Elroy-Stein sur modèle *in vivo* murin et de Marjo van der Knaap mettant en évidence respectivement :

- Une quantité anormale d'OLs immatures (NG2-positifs) et d'astrocytes dans les cerveaux de souris de trois semaines portant la mutation homozygote p.Arg132His dans la sous unité eIF2B ϵ en comparaison de souris sauvages (Geva et al., 2010);
- Une prolifération anormale et un défaut de maturation des astrocytes dans la SB des cerveaux de patients avec eIF2B-pathies en comparaison de contrôles (Bugiani et al., 2011).

Dans notre modèle de surexpression de la mutation CREE, nous démontrons une surexpression de GFAP et à l'inverse une sous-expression d'OLIG2.

La surexpression de GFAP a été décrite comme un marqueur d'activation astrocytaire (pour revue, Pekny et Pekna, 2004). De plus, l'isoforme GFAP δ a été montrée surexprimée dans des coupes de cerveaux de patients eIF2B-mutés (Bugiani et al., 2011), suggérant la possibilité qu'une **déficience astrocytaire pourrait contribuer à la perte de SB observée dans les eIF2B-pathies**. Cependant, cette étude rapportait également une augmentation de la densité des progéniteurs oligodendrocytaires, ce qui est contradictoire avec nos résultats qui montrent une sous-expression d'OLIG2. Ceci peut provenir simplement du moment de la différenciation auquel nous observons ces anomalies gliales. En effet, il semblerait qu'à des stades précoces d'apparition de la pathologie une perte des OLs prédomine avec une augmentation d'expression de marqueurs apoptotiques, alors qu'à des stades plus tardifs, une prolifération des OLs est observée, probablement pour compenser les défauts métaboliques (Van Haren et al., 2004).

La présence de la sous-unité eIF2B ϵ en excès pourrait probablement interférer avec la fonction du complexe en favorisant peut être la **formation de sous-complexes**, réduisant ainsi le niveau de complexe actif. Une telle fonction a été rapportée dans une souche de levure dans laquelle l'introduction de la sous-unité eIF2B ϵ en excès était suffisante pour altérer l'expression de *GCN4*, un gène activé en réponse au stress chez la levure (équivalent d'*ATF4*

chez l'homme) (Richardson et al., 2004). Une seconde étude a également démontré que la surexpression de la sous-unité eIF2B ϵ était suffisante pour augmenter l'activité GEF ainsi que la synthèse protéique dans le muscle squelettique (Tuckow et al., 2010).

La présence de la sous-unité eIF2B ϵ en excès pourrait également agir en « **séquestrant** » **des protéines interagissant avec le complexe**, interférant ainsi avec l'activité de l'hétéropentamère endogène. Il est donc important de noter, dans ce contexte, qu'il y a probablement d'autres mécanismes, encore inconnus, régulant l'activité du facteur eIF2B. Il a d'ailleurs récemment été identifié une nouvelle protéine inhibitrice de l'activité d'eIF2B et de la synthèse protéique, RGS2 (Regulator of G protein Signalling 2), *via* une interaction directe avec eIF2B ϵ (Nguyen et al., 2009).

Ce modèle de cellules souches embryonnaires murines sur-exprimant une mutation du facteur eIF2B pourra donc être utile pour **étudier les mécanismes physiopathologiques** à l'origine de la pathologie, mais également pour éventuellement **tester des molécules thérapeutiques** potentiellement restauratrices de la différenciation gliale.

PUBLICATION N°4

Huyghe A., Gonthier C., Aube C., Combes C., Fogli A., Boespflug-Tanguy O., Pain B. *In vitro* modelling of the altered glial cells differentiation due to the pathophysiological eIF2B mutations. Human Molecular Genetics. A soumettre.

**IN VITRO MODELLING OF THE ALTERED GLIAL CELLS DIFFERENTIATION DUE
TO THE PATHOPHYSIOLOGICAL EIF2B MUTATIONS**

**Aurélia HUYGHE^{1,2}, Céline GONTHIER^{1,2}, Cécile AUBE^{1,2}, Patricia COMBES^{1,2}, Anne
FOGLI^{1,2,3}, Odile BOESPFLUG-TANGUY^{1,4,5,6}, Bertrand PAIN^{1,2,*}**

¹ *INSERM U931-CNRS 6247-Génétique, Reproduction et Développement (GReD)-Faculté de Médecine, 28 place Henri Dunant, F-63003 Clermont-Ferrand, France.*

² *Université de Clermont, UFR Médecine, 28 place Henri Dunant, F-63003 Clermont-Ferrand, France.*

³ *CHU de Clermont-Ferrand, Service de Biochimie Médicale et Biologie Moléculaire, F-63058 Clermont-Ferrand, France.*

⁴ *INSERM U676, Hopital Robert Debré, 48 Boulevard Serurier, F-75019 Paris, France.*

⁵ *Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Robert Debré, Service de Neuropédiatrie et Maladies Métaboliques, centre de référence « leucodystrophies », 48 Boulevard Serurier, F-75019 Paris, France.*

⁶ *Université Paris Diderot, Sorbonne Cité, UMR U676, F-75019 Paris, France.*

** present adress : INSERM U846 – SBRI (Stem cell and Brain Research Institute), Université de Lyon, Lyon 1, UMR-S 846, 18 Avenue Doyen Lépine, F-69500 Bron, France.*

Corresponding author:

Bertrand Pain, PhD

INSERM U846 – SBRI (Stem cell and Brain Research Institute), Université de Lyon, Lyon 1, UMR-S 846, 18 Avenue Doyen Lépine, F-69500 Bron, France

Tel: +33 (0)4 72 91 34 75

Fax: +33 (0)4 72 91 34 61

Email : bertrand.pain@inserm.fr

ABSTRACT

The leukodystrophies include a heterogeneous group of rare inherited disorders, affecting the brain myelin. They are frequently characterized by a severe, progressive handicap without curative therapy. Since now, the identified causes were of metabolic origin or implied myelinating cells, the oligodendrocytes. Recently, astrocytes, non-myelinating glial cells, have been identified as the primary target of vacuolating leukodystrophies including those related to mutations in the ubiquitous translation initiation factor eIF2B. eIF2B is involved in the global protein synthesis and its regulation under normal and stress conditions. Recent studies suggested a primitive abnormal maturation of glial cells during development in eIF2B-pathies, leading to the alteration of the white matter structure and to associated neurological dysfunctions. This specific white matter susceptibility could result from unique regulation of eIF2B and/or increased stress vulnerability of specific brain cell types.

To test the impact of eIF2B defect on glial cells maturation and differentiation, we have used mouse embryonic stem cells. Two approaches were combined: a conditional expressing shRNA strategy to challenge the expression of the endogenous *Eif2b5* gene compared to cells overexpressing wild-type or mutated *EIF2B5* gene. We demonstrated an incapacity of the underexpressing cells to differentiate into neurectoderm derivatives and an early abnormal glial cells maturation and differentiation in *EIF2B5*-mutated overexpressing cells leading to a down-regulation of the oligodendrocytes markers and on the contrary to a compensatory up-regulation of the astrocytes markers. Thus, this model brings a unique resource to identify the molecular and physiological consequences of the eIF2B defects during differentiation of the neural cells.

INTRODUCTION

eIF2B-related disorders were initially described as childhood onset ataxia with CNS hypomyelination (CACH) (1) or vanishing white matter disease (VWM) (2) based on clinical and magnetic resonance imaging (MRI) criteria. This syndrome is an autosomal recessive leukoencephalopathy with a wide clinical spectrum ranging from very severe congenital forms with rapid death to milder or even asymptomatic phenotypes (3). The most severe group with a disease onset before 2-years-old includes the so-called « CREE leukoencephalopathy », described in a consanguineous population of CREE and Chipewayan Indians with an age of onset at approximately 3 months of age and a rapid decline leading to death sometimes in few hours (4, 5). The diagnosis is based on (i) neurologic deterioration characterized by cerebellar ataxia, mild spasticity and relatively mild mental decline and stress as onset trigger or aggravating factor; (ii) MRI pattern recognition with symmetric and diffuse involvement of the cerebral white matter (WM) with typical cerebrospinal fluid (CSF)-like intensity signal. This diagnosis is confirmed by mutation analysis of the five *EIF2B1-5* genes encoding the five subunits ($\alpha, \beta, \gamma, \delta$ and ϵ) of the ubiquitously expressed eukaryotic initiation factor 2B (eIF2B) (6, 7).

eIF2B is an evolutionary-conserved housekeeping complex that governs the rate of global protein synthesis under normal and stress conditions. It is involved in the translation initiation process by converting the eIF2 factor from an inactive GDP-bound to an active GTP-bound form through its nucleotide guanine exchange activity (GEF activity). The active eIF2-GTP can be integrated to the pre-initiation 43S complex which is a key regulator of protein synthesis particularly under cellular stress such as endoplasmic reticulum (ER) stress or viral infection. Upon these conditions, eIF2 is phosphorylated by one of the four kinases (HRI, PKR, GCN2 or PERK), generating a phosphorylated eIF2 form that functions as a competitive inhibitor of eIF2B leading to the inhibition of the global protein synthesis (8). The subunit eIF2B ϵ is catalytic, whereas subunits α, β, γ et δ are regulatory (9). We previously reported a specific decrease of eIF2B GEF activity in Epstein-Barr virus (EBV)-immortalised lymphocytes from patients with eIF2B-related disorder correlated to disease severity particularly in the most severe infantile group of disease onset (10, 11).

Moreover, an hyper-activation of the ER-stress response mediated by the activating transcription factor 4 (ATF4) has been observed in rat oligodendroglial-derived cells overexpressing mutated human *EIF2B5* gene (12) as well as in primary fibroblasts and cerebral WM from eIF2B-mutated patients (13–15). Interestingly, recent findings also demonstrated that several eIF2B mutations have little or no effect either on the complex formation or on the GEF activity (11, 16), although some of

them cause severe disease. This suggests that the presence itself of the mutated subunit rather than its biochemical defect could be also responsible for the pathology. Regarding its crucial role in protein synthesis under normal and stress conditions, it is surprising that mutations in each of the eIF2B subunits, rather than being lethal, specifically lead to a neurodegenerative disease in humans. Indeed, WM susceptibility to eIF2B mutations and to stresses seems to involve a defect in glial cell maturation. The neuropathological features show an increased oligodendrocytic density (17, 18) and a reduced number of dystrophic astrocytes due to their abnormal maturation in cultured cells derived from CACH brain (19). In addition, a recent study on brain sections from eIF2B-mutated patients showed an astrocytic immaturity with a significant proportion of proliferating astrocytes associated with an up-regulation of the glial fibrillary acidic protein (GFAP) isoform GFAP δ (20). Moreover, a slight abnormal myelination with an early defect of glial cells proliferation and maturation has been reported in mice homozygous for a mutant *Eif2b5* allele (*Eif2b5*^{R132H/R132H} mice) (21).

eIF2B-related disorders seem to be due to a primitive abnormal maturation of glial cells during development leading to the alteration of the WM structure observed in all affected patients. Later on, a subsequent axonal degeneration would lead to the exacerbation of the symptoms in response to environmental stresses.

This specific WM susceptibility could result from the unique regulation of eIF2B and/or an increased stress vulnerability of specific brain cell types. To test the hypothesis that certain subsets of brain cells demonstrate differences in eIF2B function, we used *in vitro* neural cells to study the impact of eIF2B mutations on glial cells maturation and differentiation. We developed mouse embryonic stem (mES) cells modified by overexpressing or conditional shRNA expressing vectors as a model of cell proliferation and differentiation that mimics eIF2B mutations. The mES cells are the archetype of the ES cells and can contribute to all embryonic lineages both *in vitro* and *in vivo* by generating ectoderm, mesoderm and endoderm derivatives including the neurectodermal ones such as neurons, oligodendrocytes and astrocytes. Therefore, this ES model provides a unique tool to study neural differentiation through a sequence of differentiation steps that appear to closely recapitulate neural development *in vivo*. We used this mES model to evaluate first the effect of the down-expression of the endogenous *Eif2b5* gene during the differentiation and maturation of these mES cells into glial cells in order to mimic the decreased of GEF activity observed in patient's cells and secondly the impact of the wild-type or mutated *EIF2B5* gene because this gene is the most frequently mutated in the pathology. We demonstrated an impairment of the underexpressing cells to differentiate and an altered neural cell differentiation from *EIF2B5*-mutated overexpressing cells.

RESULTS

***Eif2b5* underexpressing mESC failed to differentiate into neural lineage cells**

It has been shown that neural differentiation of ES cells can be promoted by both all trans retinoic acid (RA) and valproic acid (VA) in a time and concentration-dependent manner (22–24). L-Triiodo-thyronine (L-T₃) has been also described as an activator of oligodendrocytes differentiation (25). These signalling molecules are not required for the survival, proliferation or differentiation of neural and glial lineage cells. Instead, they induce precursor cells to stop dividing, and, as a consequence, to differentiate (25, 22, 24, 26). We differentiated ES cells by inducing the formation of embryoid bodies (EBs) in the absence of leukemia inhibitory factor (LIF) and in differentiating medium instead of the proliferative one. Three days later, the EBs were plated and cultured for 13 additional days in N2/B27 based medium containing either the RA + L-T₃ or VA + L-T₃ inducers (Fig. 1A). Figure 1B showed that RA+L-T₃ treatment seems to increase rosettes formation, even if also observed in control and VA+L-T₃ treatment. As well, neural-progenitor-like cells are more present with RA+L-T₃ treatment, while cells seem to be more individualized and emitting lengthening with VA+L-T₃ treatment. Differentiating mES cells were then analyzed by quantitative RT-PCR for markers of different lineages (Supplemental data 1). We first assayed the expression of *Gfap* which is a component, with vimentin, of the intermediate filaments of astroglial cells (27). *Gfap* was more strongly induced in EBs treated with RA+L-T₃ (Fig. 1C) as previously described (28). We then assayed the mRNA level of *Olig2*, which is a basic-helix-loop-helix (bHLH) transcription factor expressed in early oligodendrocytes. Expression of *Olig* genes persists in migratory oligodendrocyte precursors and in mature oligodendrocytes (29). In our model, *Olig2* reach a peak of expression at day 9 of differentiation more importantly in EBs treated with VA+L-T₃ than with RA+L-T₃ (Fig. 1D). These results indicate and confirm in our assay that RA facilitates mES differentiation into astrocytes, in contrast to VA, which preferentially induces oligodendrocytes differentiation.

As the differentiating model was established, we decided to inactivate the endogenous eIF2B5 subunit. The system that we used is based on the Cre recombinase fused to the ligand-binding domain (LBD) of the human estrogenic receptor (called Cre-ER^{T2}). The recombinase activity is controlled by the addition of the 4-hydroxy-tamoxifen (4OHT) but not by the endogenous estrogens due to specific point mutations in the LBD (30, 31). In our case, a neomycin cassette flanked by loxP sites is inserted inside the U6 promoter as described (32, 33) leading to a conditional shRNA expressing vector. By using this strategy, a double-step engineering procedure was implemented.

The mES cells were first transfected with the derivative plasmids carrying an individual shRNA targeting murine *Eif2b5*. The resistant cells were then transfected again with the pCRE-ER^{T2}-Hygro vector. Double drug-resistant colonies were selected and screened individually after 4OHT treatment.

As shRNA designed against the same gene display very different results, we chose to test different *Eif2b5*-targeting constructs in the two main conformations of shRNA and shRNAmir (Supplemental data 2). QRT-PCR analysis showed that shRNA-5 was the most effective sequence for down-regulation of *Eif2b5* gene expression. We then screened 60 individual clones presenting a robust underexpression of *Eif2b5* and a strong 4OHT-dependent expression. Four clones (sh5-2, 11, 12 and 18) were selected through this screening (Fig. 2A). They display a decreased *Eif2b5* expression by a factor of 26-60% after 4OHT treatment. The altered *Eif2b5* gene expression had no effect on the morphology of the cells (data not shown). The two clones sh5-2 and sh5-12, that display the strongest underexpression of *Eif2b5* with a 55% and 60% decrease respectively, were selected for further studies. The eIF2B GEF activity was measured in triplicate in sh5-2 clone cells treated or not with 4OHT compared to non treated mock cells (Fig. 2B). This clone exhibits a high reduction in GEF activity when treated with 4OHT with only 60% of residual activity. This result is highly consistent with the value observed in lymphoblasts from eIF2B-mutated patients (11). We have then tested the effect of such *Eif2b5* silencing during the mES cells differentiation.

For that purpose, the sh5-12 clone cells were induced to differentiate by RA+L-T₃ treatment as described (Fig. 1A). A toxicity was initially observed when the 4OHT treatment was applied all along the kinetic of differentiation at 1 μ M as also previously described for committed ES cells (34). We therefore changed the 4OHT concentration to 100 nM once the EBs were formed and plated for differentiation. As a result of this procedure, the EBs formation from sh5-12 clone cells was not compromised and those EBs were not morphologically different from those obtained with the control empty clone (data not shown). However, after EB plating, the number of sh5-12 clone derived cells decreased rapidly when treated with 4OHT. At 3 days of culture, only 10% of the cells were still alive as estimated by the Hoechst nuclei staining in the 4OHT treated cultured when compared with the non treated ones (data not shown). QRT-PCR also indicated that *Eif2b5* underexpression in the sh5-12 clone treated cells was also affected in the same range after 3 days of differentiation (Fig. 3E). In order to know whether this lost of *Eif2b5* underexpression was specific to the ectodermic neural lineage, we compared the results obtained in the presence of 1% dymethyl sulfoxide (DMSO), a well known inducer of mesodermal differentiation (35). After 6 days of differentiation, the cells resembled epithelial cells in the presence of DMSO whereas those cultured with RA+L-T₃ formed long processes suggesting neurectoderm derivatives (Fig. 3A, B). However,

in both conditions, the treatment by 4OHT induced a strong decrease in the number of emerging cells as if they fail to differentiate (Fig. 3C, D). *Paired box gene 6 (Pax6)*, taken as a neurectodermal marker presents by QRT-PCR analysis a strong expression by day 3 and 7 in RA+L-T₃ treated cells, in contrast to a weak expression in the DMSO treated cells (Fig. 3F). Reciprocally, *Brachyury (T)*, taken as a early mesoderm marker (36, 37) exhibits a high expression at day 3 of differentiation only in the DMSO treated cells (Fig. 3G). Moreover, as previously observed, the *Eif2b5* expression is also lost by day 3 of differentiation for the DMSO treated cells (Fig. 3E), suggesting this loss is independent of the cell fate lineage choice and cannot be seen as neurectodermal specific. Interestingly, the dramatic decrease of the number of treated cells could probably be linked to a negative selection of the underexpressing cells which failed to differentiate in the absence of a sufficient level of *Eif2b5* in both the neurectodermal and the mesodermal lineage.

***Eif2b5* overexpressing mESC present an altered neuronal differentiation profile**

For overexpressing strategy, we generated mouse ES cells with constitutive overexpression either of the human wild-type (WT) or the mutated *EIF2B5* subunit (CREE) or the empty cells (Empty) transfected only with the empty vector. The CREE mutation (p.Arg195His, Supplemental data 3) was chosen as initially described in an indian CREE population and leading to the most severe phenotype in human as previously mentioned (4, 5).

These overexpressing cell lines grew normally and their morphology was similar to that of empty cells. By QRT-PCR analysis, the *EIF2B5* expression level was 8 to 10 fold higher in the transfected cells compared to the endogenous level of *Eif2b5* in the empty cells (Fig. 4A). At the protein level, the presence of the flag-tagged EIF2B5 protein was detected in WT and CREE cells as well as the endogenous subunit in empty cells (Fig. 4B).

Once obtained, the overexpressing cells were induced to differentiate as described (Fig. 1A). The formation of the EBs was not morphologically different between the cells. The *EIF2B5* overexpression was maintained all along the kinetic of differentiation in both WT and CREE cells (Fig. 4A) as well as the proteins, both the flag-tagged EIF2B5 and the endogenous one (Fig. 4B).

We first investigated the decrease of the pluripotent marker expression and the emergence of neurectoderm markers by QRT-PCR in the different cell types.

The results are presented only for the RA+L-T₃ treatment as they were identical for the VA+L-T₃ condition. The expression of *Nanog*, the homeoprotein known to be essential for self-renewal of the ES cells, is strongly down regulated during the first steps of the kinetic as expected. Its level remains low afterward and no specific differences between the cell types was detected (Fig. 5A).

We hypothesised that a similar pluripotent state and the same ability to differentiate are kept between the mock-transfected cells, the WT and the CREE *EIF2B5* overexpressing cells.

Second, the expression of the early neurectoderm markers *Pax6* and *Musashi homolog 1 (Msi1)* present an interesting pattern. The expression of *Pax6* picked at day 3 in the three cell types but more importantly in the *EIF2B5*-overexpressing cells than in the mock-transfected cells (Fig. 5B). Only a slight difference between WT and CREE cells can be detected. In contrast, the *Msi1* expression which is strongly up-regulated between day 3 and 7 of the kinetic in the three conditions is significantly overexpressed in the CREE cells compared to the empty cells, without differences between WT and CREE cells (Fig. 5C). These results suggest an early proliferation and differentiation deregulation of the neurectodermal precursor cells from the *EIF2B5*-overexpressing ES cells.

Then, the levels of expression of *Neurogenin 2 (Ngn2)*, *Mash1* and *Microtubule-associated protein 2 (Map2)* were quantified. The expression of *Ngn2* is significantly decreased in CREE cells compared to empty control cells when expression picked between 4 to 8 days of differentiation (Fig. 5D). As for *Mash1*, the expression profile is inverted with a significant increase in CREE cells compared to the empty control cells (Fig. 5E). The neuronal marker *Map2* is highly expressed later than the two previous ones during the differentiation, at day 7 in WT and CREE cells and at day 9 in empty control cells (Fig. 5F). Interestingly, *Map2* expression is about 2 fold higher in *EIF2B5*-overexpressing cells than in the empty control cells at day 7 suggesting an abnormal neuronal differentiation in *EIF2B5*-overexpressing cells, accordingly to the deregulation of expression of the neuronal markers *Ngn2*, *Mash1* and *Map2*, compared to the empty control cells. Similar key observations were done at the protein level by direct immunofluorescence. At day 10, in the empty control cells, the MAP2 and TUJ1 (β III-tubulin) proteins were present in a large number of neurons (Fig. 6A, D), whereas in the WT and CREE cells this staining is more restricted (Fig. 6B-C, E-F). Therefore, the neuronal differentiation seems to be affected by an excess of eIF2B5 subunit, with a more subtle effect between WT and CREE cells, as it seems to delay and/or inhibit the neuronal differentiation.

***Eif2b5* overexpressing mESC present an altered glial differentiation**

For characterizing the potential of the overexpressing cells to differentiate into glial cells, we first looked for the expression of the astrocyte marker *Gfap* following the ES cell differentiation protocol with the RA+L-T₃ treatment and the expression profile of the oligodendrocytes markers *Olig2* and *Myelin basic protein (Mbp)* in response to the VA+L-T₃ treatment. The expression of *Gfap*, one of the earliest astrocyte marker, appears at day 9 of the differentiation in the three cell types but its

level of expression is delayed in the WT cells compared to the empty control and the CREE cells with an increase of about 90% in those cells compared to the 50% observed in the WT cells (Fig. 5G). At the protein level, GFAP is also strongly overexpressed in the CREE cells compared to the WT cells at day 15 of the differentiation (Fig. 6G-I). In contrast, oligodendrocyte differentiation seems to be more altered in CREE cells as the expression of the *Olig2* and *Mbp* markers increases more slightly in these cells. *Olig2*, which is one of the earliest oligodendrocyte markers, is highly expressed at day 7 of differentiation, particularly in the WT cells, whereas it remained low in the CREE cells (Fig. 5H). In the same extent, the protein level of OLIG2 is broadly induced in the WT cells compared to the empty control cells and the CREE cells (Fig. 6J-L). *Mbp* is a later marker and its expression starts to increase only at day 13 of differentiation in empty control and WT cells whereas it is still weakly expressed in CREE cells at this same time of differentiation (Fig. 5I). These results emphasize the preferential commitment of the CREE cells in the astroglial lineage to the detriment of the oligodendrocyte network, whereas the WT cells fail to differentiate into astroglial lineage thanks to the oligodendroglial one.

DISCUSSION

It is assumed that the glial cell maturation abnormalities, recently described in eIF2B-related disorders, could be responsible for the acute susceptibility of the brain to eIF2B-mutations.

The current study aimed to mimic such abnormalities *in vitro* in order to determine the molecular and biochemical effects of the alteration of eIF2B expression during glial cell maturation. This goal was achieved by establishing an *in vitro* model using ES cells that were genetically modified to either down or over-express the human eIF2B5 subunit in its wild type or mutated form. The CREE mutation, known to be one of the most severe one in the human genetic background was therefore chosen. In this first study, the mouse ES cells were chosen to demonstrate the rightness and feasibility of the *in vitro* modelling of the physiopathological process as observed in the patients. The mES cell differentiation and maturation into the neuronal and glial lineages was investigated in these conditions leading to a clear alteration of the glial differentiation process in the cells harbouring the mutated *EIF2B5* form.

We first engineered the mES cells to down-regulate the endogenous *Eif2b5* gene using an inducible shRNA expressing system. Two clones (sh5-2 and sh5-12) presented a strongly inducible down-regulation of the *Eif2b5* expression strongly correlated with a decreased GEF activity suggesting an effect on the protein complex that was affected by this event (Fig.2). The level of expression and GEF activity obtained in these targeted cells appears to be similar to the level of the down regulation observed in the patients' cells. However, during the induced differentiation, these *Eif2b5* underexpressing cells failed to differentiate into neuroectodermal as well as mesodermal lineage. The number of the differentiated cells radically and rapidly decreases soon after the beginning of the differentiation (Fig. 3A-E). This result would suggest that the underexpressing cells are negatively selected during the cell differentiation and reinforce the crucial and unique role of eIF2B5 for protein and cell metabolism during differentiation. Interestingly, this effect is not correlated with the neuroectodermal lineage as the mesodermal lineage is also affected.

Recent findings showed that several eIF2B mutations have a low effect on the complex formation or on the GEF activity (11, 16), although some of them even cause severe disease. This would also suggest that the disease might be mostly due to the presence of the mutated subunit in the cells rather than to the biochemical defect by itself. We therefore tested the effect of an overexpression of a mutated human form of *EIF2B5* – the CREE mutation - on glial cell differentiation. The CREE leukoencephalopathy has been described among the native CREE and Chippewayan indigenous

population in Northern Quebec and Manitoba. The onset of this disease is observed between 3 and 9 months of age with all infants dead by 21 months of age (4). Neuropathological examination of CREE-mutated patients revealed important loss of myelin in the WM of cerebellum and brainstem with rare macrophages containing sudanophilic material within the poorly myelinated regions, as well as a severe astrogliosis (38, 4). Interestingly, in our *in vitro* approach, an overexpression of the astrocyte marker GFAP is observed in the mutated *EIF2B5* overexpressing stem cells during their neural differentiation when compared to their WT counterpart (Fig. 5G; 6G-I). This up-regulation appears to be a hallmark of a reactive astrogliosis observed in the disease and reproduced experimentally (39). An overexpression of the GFAP isoform δ in brains' slices from eIF2B-mutated patients was recently reported (20), suggesting that an astrocyte function deficiency may contribute to the loss of WM in eIF2B-related disorders. In parallel, an increased density of oligodendrocyte progenitor cells was observed (20). The situation appears to be more complex as in the early onset of the encephalopathy, devastating loss of oligodendrocytes dominates with enhanced staining for apoptotic markers, whereas in older patients with long-standing disease, a proliferation of oligodendrocytes prevails with a striking increase in their numbers (40). *Olig2* in glial cells inhibits the astrocyte differentiation, thereby allowing the cells to remain undifferentiated or to develop into myelinating oligodendrocytes (41). Moreover, the loss of *Olig2* in rodent glial precursor cells is typically a necessary step preceding astrocytic differentiation (42). In our study, we observed a down-regulation of the oligodendrocytes markers *Olig2* and *Mbp* in the CREE cells (Fig. 5H, I; 6J-L) and this intensive decrease of *Olig2* expression in CREE cells at day 7 could be the cause of the further high expression of *Gfap* at day 13 in these same cells.

In parallel, an up-regulation of the neurectoderm markers, *Pax6* and *Msi1* is detected in the *EIF2B5* overexpressing cells (Fig. 5B, C). *Pax6*, whose expression is first seen at day 8.5 (E8.5) in the mouse development, as the neural tube is closing, is required in neurogenesis (43) and is involved in the developing cortical progenitors to control the cell-cycle duration, the rate of progression from symmetrical to asymmetrical division and the onset of expression of neural-specific markers (44). The *Pax6* overexpression induces a premature neurogenesis in subsets of early cortical progenitors (45) and favored their differentiation into radial glial cells and subsequently into neurons (46). On the other hand, the *Msi1* mRNA level is the highest at E12 in the mouse embryonic brain, when neurogenesis is actively occurring for decreasing rapidly after that peak. Indeed, *Msi1* is expressed in the proliferating neuronal precursors and is lost once their differentiation occurs (47). Therefore, in our study, the overexpressing *EIF2B5* cells - whatever the WT or mutated CREE form - seem to favor the production of neurectodermal precursor cells during the early phases of the differentiation.

The neuronal marker *Map2* is also overexpressed in *EIF2B5* overexpressing cells by day 7 to 9 of the differentiation (Fig. 5F) whereas its protein level, as the immunostaining of TUJ1, is dramatically reduced in these cells (Fig. 6A-F). MAP2 expression is very weak in neuronal precursors and then becomes strong about 1 day after the expression of neuron-specific tubulin isoform β III (48). This contradictory expression between transcript and protein might be mostly due to post-transcriptional regulation. We can hypothesize that the modified cells, unable to produce the MAP2 protein, are trying to overcome this loss by increasing the gene transcription. *Ngn2* and *Mash1* seem to have complementary expressions profiles with a down-expression of *Ngn2* and an up-expression of *Mash1* in the CREE cells (Fig. 5D, E). During forebrain development, an antagonism is observed between *Ngn2* and *Mash1*. *Ngn2* is expressed dorsally and elicits the generation of dopaminergic (49) and glutamatergic cortical neurons (50) whereas *Mash1* is restricted to the ventral regions from which originate gamma-aminobutyric acid (GABA)ergic neuronal differentiation (51, 52). GABAergic differentiation induced by *Mash1* is compromised by the bHLH proteins NGN2, NeuroD1, and NeuroD2 (53). This antagonism is deregulated in the CREE cells demonstrating an altered neuronal network differentiation. Moreover, a total failure of oligodendrocyte formation is observed in the *Olig1*^{-/-} *Olig2*^{-/-} double mutant mice and the progenitors are respecified into astrocytes (41). A similar effect is obtained in the CREE cell with an increased astrocyte differentiation probably due to the down-regulation of *Ngn2* followed by that of *Olig2* and a subsequent overexpression of *Mash1*. These different gene expression profiles lead to an increase in the number of astrocytes at the expense of neurons and oligodendrocytes.

In conclusion, we demonstrated that the *in vitro* mES cell model can be useful to recapitulate the kinetic of events leading to an altered neural differentiation following the *EIF2B5*-overexpression. Most importantly, the presence of the CREE mutation mimics the physiopathology observed in the brain of the eIF2B-mutated patients with an abnormal neuronal and oligodendroglial expression profile correlated with an increase of astrocytes. This mES cell model will help first to decipher the mechanisms of how a mutation in a ubiquitous key metabolism factor leads to a neurological disease and second to look for therapeutical agents that can help to treat eIF2B-related disorders by focusing on the downstream effectors of eIF2B involved in the glial cell differentiation. Finally, the success of this first assay using the mES cell model paves the way for the development of similar approaches on human stem cells and in particular with human induced pluripotent stem (hiPS) cells that will be obtained by reprogramming patient fibroblasts. If the *EIF2B5* mutation does not impair the efficiency of the process, the mutated iPS could help to a better understanding and long term treatment of the pathology.

MATERIALS AND METHODS

Expressing vectors constructions

The human wild-type (WT) *EIF2B5* cDNA was amplified by PCR from the pNflag-huZB5 vector (kindly provided by Pr. O. Elroy-Stein) with GATATCGAGAGAAGAAGATGGCGGCCCTGTAGTGGC as a forward primer and GCGGCCGCTCACTTGTCGTCATCGTCTTTGTAGTCTGCTGCTCCGTCATCTTCAGATGAC TCCT as reverse one, cloned into pGemT-easy (Promega) and sequenced to ensure the integrity of the sequence. The 9 supplementary nucleotides (underscored) were added between the end of the cDNA and the flag to avoid any steric bulk. A site directed mutagenesis by inverse PCR was performed on the WT *EIF2B5*-pGemT-easy clone to generate the CREE mutated version of the plasmid CREE *EIF2B5*-pGemTeasy (Supplemental data 3). Both the WT *EIF2B5* and the CREE *EIF2B5* cDNAs were then inserted in EcoRI site of the pCAG-IRES-puromycin vector (pCAG-IP, kindly provided by Dr. H. Niwa).

For the cloning of the shRNA *Eif2b5*, 2 shRNAmir of 63 nucleotides (nt) and 5 shRNA of 78 nt (Supplemental data 2, 3) were inserted in the pFLΔneo vector digested by XhoI and HindIII as previously described (33).

Cells

Mouse CGR8 ES cells (kindly provided by A. Smith's laboratory, Edinburgh) were maintained as previously described (54) in the absence of feeder cells on 0,1% gelatin-coated tissue culture dishes in proliferative medium (PM) composed of DMEM/F12 medium (Invitrogen) supplemented with 1mM sodium pyruvate (Invitrogen), 100μM non essential amino acids (Invitrogen), 2mM L-glutamine (Invitrogen), 0.5mM β-mercaptoethanol (Sigma Aldrich), 10% Fœtal Bovine Serum (FBS, PAA, A15-101, batch A10106-1406) and 500U/mL Leukemia Inhibitory Factor (LIF, PAA) in a humidified 5% CO₂ atmosphere at 37°C. The ES cells were induced to differentiate through embryoid bodies (EB) formation. Briefly, the EBs were formed for 3 days by aggregating in hanging drop 1000 cells in 30μL of differentiating medium (DM) similar to the PM medium but containing only 5% FBS and lacking LIF. After 3 days, the EBs were collected and plated to poly-D-lysine-coated 6-well plates with approximately 50EB/well. The next day, considered as d0, the DM medium was changed to N2/B27 based medium for neural differentiation composed of DM medium supplemented with 1% N2 and 2% B27 supplement (both from Invitrogen). The inducers were added daily to day 3 and every two days from day 5 respectively at concentration of 10⁻⁷M for

L-TriIodoThyronine (Sigma), 3.10^{-4} M for Valproic Acid (Sigma), 5.10^{-7} M for All Trans Retinoic Acid (Sigma) and 1% for Dymethyl sulfoxide (DMSO) when used for mesodermal differentiation. The modified overexpressing cells were obtained by transfecting 2.5×10^5 cells / well in 6-well gelatin-coated plates with linearized pCAG-WT-*EIF2B5*-IP, pCAG-CREE-*EIF2B5*-IP or the pCAG-IP mock empty plasmids using FuGene HD (Roche) liposome according to the manufacturer instructions. Cells were then selected 24 h later in the presence of puromycin (1 μ g/ml, Invivogen) for 7 days and subsequently amplified and maintained in complete medium with 0.5 μ g/mL puromycin.

For stable shRNA silencing, the CGR8 ES cells were transfected with the individual shRNA vectors (Supplemental data 2) using the pFL Δ Neo empty vector as a control. The transfected cells were selected in the presence of 250 μ g/mL G418 (Invivogen) for 9 days, amplified and maintained in complete medium with 100 μ g/mL G418. For analysis, the shRNA transfected cells were transfected again with the pCRE-ER^{T2}-Hygromycin vector, selected for 6 days in the presence of 75 μ g/mL hygromycin (Invivogen) and 100 μ g/mL G418. The double drug-resistant clones were picked and transferred into 96-well plates and expanded in complete medium with 50 μ g/mL hygromycin and 100 μ g/mL G418. Those cells were then treated with 1 μ M 4-hydroxy-tamoxifen (4OHT, Sigma) for 72 h and analyzed.

RNA extraction and reverse transcription - quantitative PCR

The total mRNAs were isolated using the Rneasy mini kit (Qiagen) and the residual genomic DNA contamination eliminated with Dnase I (Invitrogen) according to the manufacturer instructions. RT-PCR was conducted on 500ng RNA using the High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems) under the following conditions: 25°C for 10 mins, 37°C for 120 mins and 85°C for 5 mins.

Quantitative real-time PCR was performed with the 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems) using Taqman® Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems) in order to quantify the expression of the different markers (Supplemental data 1). Samples were run in triplicate and gene expression levels were calculated using the $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ method (<http://www.gene-quantification.info>) with the mouse ribosomal gene *Rs17* as reference. The number of independent experiments is indicated in the legend of each figure and data are presented as means \pm S.E.M. Statistical analyses were performed using the Mann-Whitney test or the Kruskal-Wallis test followed by a post hoc paired comparison.

Western blotting

For protein detection, cells were rinsed in phosphate-buffered saline (PBS) and lysed on ice in RIPA buffer composed of 1% Triton X-100, 150mM NaCl, 0.1% SDS, 50mM NaF, 2mM Na₃VO₄, 25mM β-glycérophosphate and 50mM Tris-HCl, pH 7.4, containing 1mM PMSF, 0.1μM okadaic acid (Sigma) and protease inhibitor mixture (Sigma). Protein concentration was assessed by the Bradford method. 30μg of protein lysates were separated on 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to polyvinylidene difluoride membranes (Millipore). Unspecific binding were blocked with 5% dried fat-free milk in Tris-buffered saline (TBS) containing 0.1% Tween 20 overnight at 4°C. Incubations with primary antibodies were carried out 2 h at room temperature using mouse anti-α-tubulin (1:2000, Sigma-Aldrich), rabbit anti-eIF2Bε (1:200, Cell Signalling Technology) and mouse anti-flag (1:5000, Sigma-Aldrich). After washing, membranes were incubated with an accordingly HRP-conjugated secondary antibody (anti-mouse 1:2000, anti-rabbit 1:1500, GE Healthcare) for 2 h at room temperature. Protein expression was detected by ECL reagent (GE Healthcare).

Immunofluorescence

Cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 20 mins at 4°C, washed with PBS, then permeabilized with a 0.1% Triton and blocked for 30 mins with 10% FBS in PBS at room temperature. Cells were then exposed to primary antibodies overnight at 4°C. The dilutions for the primary antibodies in blocking buffer (PBS +5% FBS) were as follows: rabbit anti-GFAP (glial fibrillary acidic protein) (1:1000, Chemicon AB5804), mouse anti-MAP2 (microtubule associated protein 2) (1:200, Chemicon MAB3418), mouse anti-TUJ1 (1:500, Chemicon MAB1637), rabbit anti-OLIG2 (1:500, Chemicon AB9610). After 3 washes in PBS, cells were stained with secondary antibodies (Alexa Fluor 488 donkey anti-rabbit IgG (1/2000, Molecular probes A21206), Alexa Fluor 488 donkey anti-mouse IgG (1/2000, Molecular probes A21202) or Cy3 donkey anti-mouse IgG (1/2000, Jackson ImmunoResearch 175-165-150)) at room temperature for 2 h. Cell nuclei were stained with Hoechst 33342 (Sigma) for 15 mins at room temperature. Cells were then washed 3 times with PBS and kept in PBS for visualization analysis on a macro confocal fluorescence microscope (Leica TCS LSI).

eIF2B GEF activity

The GEF activity of eIF2B was measured in triplicate as previously described (10).

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants and fellowships from Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), from Agence Nationale de la Recherche ANR (ANR-07-MRAR-007) to B. Pain and A. Fogli, A. Huyghe was supported by a PhD fellowship of the French Research Ministry. We thank Christian Jean for technical assistance.

REFERENCES

1. Schiffmann,R., Moller,J.R., Trapp,B.D., Shih,H.H., Farrer,R.G., Katz,D.A., Alger,J.R., Parker,C.C., Hauer,P.E. and Kaneski,C.R. (1994) Childhood ataxia with diffuse central nervous system hypomyelination. *Ann. Neurol*, 35, 331-340.
2. van der Knaap,M.S., Barth,P.G., Gabreëls,F.J., Franzoni,E., Begeer,J.H., Stroink,H., Rotteveel,J.J. and Valk,J. (1997) A new leukoencephalopathy with vanishing white matter. *Neurology*, 48, 845-855.
3. Fogli,A., Schiffmann,R., Bertini,E., Ughetto,S., Combes,P., Eymard-Pierre,E., Kaneski,C.R., Pineda,M., Troncoso,M., Uziel,G., et al. (2004) The effect of genotype on the natural history of eIF2B-related leukodystrophies. *Neurology*, 62, 1509-1517.
4. Fogli,A., Wong,K., Eymard-Pierre,E., Wenger,J., Bouffard,J.-P., Goldin,E., Black,D.N., Boespflug-Tanguy,O. and Schiffmann,R. (2002) Cree leukoencephalopathy and CACH/VWM disease are allelic at the EIF2B5 locus. *Ann. Neurol*, 52, 506-510.
5. Fogli,A., Dionisi-Vici,C., Deodato,F., Bartuli,A., Boespflug-Tanguy,O. and Bertini,E. (2002) A severe variant of childhood ataxia with central hypomyelination/vanishing white matter leukoencephalopathy related to EIF2B5 mutation. *Neurology*, 59, 1966-1968.
6. Leegwater,P.A., Könst,A.A., Kuyt,B., Sandkuijl,L.A., Naidu,S., Oudejans,C.B., Schutgens,R.B., Pronk,J.C. and van der Knaap,M.S. (1999) The gene for leukoencephalopathy with vanishing white matter is located on chromosome 3q27. *Am. J. Hum. Genet*, 65, 728-734.
7. van der Knaap,M.S., Leegwater,P.A.J., Könst,A.A.M., Visser,A., Naidu,S., Oudejans,C.B.M., Schutgens,R.B.H. and Pronk,J.C. (2002) Mutations in each of the five subunits of translation initiation factor eIF2B can cause leukoencephalopathy with vanishing white matter. *Ann. Neurol*, 51, 264-270.
8. Forman,M.S., Lee,V.M.-Y. and Trojanowski,J.Q. (2003) « Unfolding » pathways in neurodegenerative disease. *Trends Neurosci*, 26, 407-410.
9. Kleijn,M., Scheper,G.C., Voorma,H.O. and Thomas,A.A. (1998) Regulation of translation initiation factors by signal transduction. *Eur. J. Biochem*, 253, 531-544.

10. Fogli,A., Schiffmann,R., Hugendubler,L., Combes,P., Bertini,E., Rodriguez,D., Kimball,S.R. and Boespflug-Tanguy,O. (2004) Decreased guanine nucleotide exchange factor activity in eIF2B-mutated patients. *Eur. J. Hum. Genet*, 12, 561-566.
11. Horzinski,L., Huyghe,A., Cardoso,M.-C., Gonthier,C., Ouchchane,L., Schiffmann,R., Blanc,P., Boespflug-Tanguy,O. and Fogli,A. (2009) Eukaryotic initiation factor 2B (eIF2B) GEF activity as a diagnostic tool for EIF2B-related disorders. *PLoS ONE*, 4, e8318.
12. Kantor,L., Pinchasi,D., Mintz,M., Hathout,Y., Vanderver,A. and Elroy-Stein,O. (2008) A point mutation in translation initiation factor 2B leads to a continuous hyper stress state in oligodendroglial-derived cells. *PLoS ONE*, 3, e3783.
13. Kantor,L., Harding,H.P., Ron,D., Schiffmann,R., Kaneski,C.R., Kimball,S.R. and Elroy-Stein,O. (2005) Heightened stress response in primary fibroblasts expressing mutant eIF2B genes from CACH/VWM leukodystrophy patients. *Hum. Genet*, 118, 99-106.
14. van der Voorn,J.P., van Kollenburg,B., Bertrand,G., Van Haren,K., Scheper,G.C., Powers,J.M. and van der Knaap,M.S. (2005) The unfolded protein response in vanishing white matter disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol*, 64, 770-775.
15. van Kollenburg,B., van Dijk,J., Garbern,J., Thomas,A.A.M., Scheper,G.C., Powers,J.M. and van der Knaap,M.S. (2006) Glia-specific activation of all pathways of the unfolded protein response in vanishing white matter disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol*, 65, 707-715.
16. Liu,A.R., van der Lei,H.D.W., Wang,X., Wortham,N.C., Tang,H., van Berkel,C.G.M., Mufunde,T.A., Huang,W., van der Knaap,M.S., Scheper,G.C., et al. (2011) Severity of Vanishing White Matter disease does not correlate with deficits in eIF2B activity or the integrity of eIF2B complexes. *Hum Mutat*, 10.1002/humu.21535. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21560189>.
17. Rodriguez,D., Gelot,A., della Gaspera,B., Robain,O., Ponsot,G., Sarliève,L.L., Ghandour,S., Pompidou,A., Dautigny,A., Aubourg,P., et al. (1999) Increased density of oligodendrocytes in childhood ataxia with diffuse central hypomyelination (CACH) syndrome: neuropathological and biochemical study of two cases. *Acta Neuropathol*, 97, 469-480.
18. Wong,K., Armstrong,R.C., Gyure,K.A., Morrison,A.L., Rodriguez,D., Matalon,R., Johnson,A.B., Wollmann,R., Gilbert,E., Le,T.Q., et al. (2000) Foamy cells with

oligodendroglial phenotype in childhood ataxia with diffuse central nervous system hypomyelination syndrome. *Acta Neuropathol*, 100, 635-646.

19. Dietrich,J., Lacagnina,M., Gass,D., Richfield,E., Mayer-Pröschel,M., Noble,M., Torres,C. and Pröschel,C. (2005) EIF2B5 mutations compromise GFAP+ astrocyte generation in vanishing white matter leukodystrophy. *Nat. Med*, 11, 277-283.
20. Bugiani,M., Boor,I., van Kollenburg,B., Postma,N., Polder,E., van Berkel,C., van Kesteren,R.E., Windrem,M.S., Hol,E.M., Scheper,G.C., et al. (2011) Defective glial maturation in vanishing white matter disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol*, 70, 69-82.
21. Geva,M., Cabilly,Y., Assaf,Y., Mindroul,N., Marom,L., Raini,G., Pinchasi,D. and Elroy-Stein,O. (2010) A mouse model for eukaryotic translation initiation factor 2B-leucodystrophy reveals abnormal development of brain white matter. *Brain*, 133, 2448-2461.
22. Bain,G., Ray,W.J., Yao,M. and Gottlieb,D.I. (1996) Retinoic acid promotes neural and represses mesodermal gene expression in mouse embryonic stem cells in culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 223, 691-694.
23. Fraichard,A., Chassande,O., Bilbaut,G., Dehay,C., Savatier,P. and Samarut,J. (1995) In vitro differentiation of embryonic stem cells into glial cells and functional neurons. *J. Cell. Sci*, 108 (Pt 10), 3181-3188.
24. Hsieh,J., Nakashima,K., Kuwabara,T., Mejia,E. and Gage,F.H. (2004) Histone deacetylase inhibition-mediated neuronal differentiation of multipotent adult neural progenitor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, 101, 16659-16664.
25. Barres,B.A., Lazar,M.A. and Raff,M.C. (1994) A novel role for thyroid hormone, glucocorticoids and retinoic acid in timing oligodendrocyte development. *Development*, 120, 1097-1108.
26. Maden,M. (2007) Retinoic acid in the development, regeneration and maintenance of the nervous system. *Nat. Rev. Neurosci*, 8, 755-765.
27. Chiu,F.C., Norton,W.T. and Fields,K.L. (1981) The cytoskeleton of primary astrocytes in culture contains actin, glial fibrillary acidic protein, and the fibroblast-type filament protein, vimentin. *J. Neurochem*, 37, 147-155.

28. Okada, Y., Shimazaki, T., Sobue, G. and Okano, H. (2004) Retinoic-acid-concentration-dependent acquisition of neural cell identity during in vitro differentiation of mouse embryonic stem cells. *Dev. Biol.*, 275, 124-142.
29. Zhou, Q., Wang, S. and Anderson, D.J. (2000) Identification of a novel family of oligodendrocyte lineage-specific basic helix-loop-helix transcription factors. *Neuron*, 25, 331-343.
30. Feil, R., Wagner, J., Metzger, D. and Chambon, P. (1997) Regulation of Cre recombinase activity by mutated estrogen receptor ligand-binding domains. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 237, 752-757.
31. Indra, A.K., Warot, X., Brocard, J., Bornert, J.M., Xiao, J.H., Chambon, P. and Metzger, D. (1999) Temporally-controlled site-specific mutagenesis in the basal layer of the epidermis: comparison of the recombinase activity of the tamoxifen-inducible Cre-ER(T) and Cre-ER(T2) recombinases. *Nucleic Acids Res.*, 27, 4324-4327.
32. Coumoul, X., Li, W., Wang, R.-H. and Deng, C. (2004) Inducible suppression of Fgfr2 and Survivin in ES cells using a combination of the RNA interference (RNAi) and the Cre-LoxP system. *Nucleic Acids Res.*, 32, e85.
33. Lavial, F., Acloque, H., Bertocchini, F., Macleod, D.J., Boast, S., Bachelard, E., Montillet, G., Thenot, S., Sang, H.M., Stern, C.D., et al. (2007) The Oct4 homologue PouV and Nanog regulate pluripotency in chicken embryonic stem cells. *Development*, 134, 3549-3563.
34. Vallier, L., Mancip, J., Markossian, S., Lukaszewicz, A., Dehay, C., Metzger, D., Chambon, P., Samarut, J. and Savatier, P. (2001) An efficient system for conditional gene expression in embryonic stem cells and in their in vitro and in vivo differentiated derivatives. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 98, 2467-2472.
35. Rudnicki, M.A., Reuhl, K.R. and McBurney, M.W. (1989) Cell lines with developmental potential restricted to mesodermal lineages isolated from differentiating cultures of pluripotential P19 embryonal carcinoma cells. *Development*, 107, 361-372.
36. Karantzali, E., Lekakis, V., Ioannou, M., Hadjimichael, C., Papamatheakis, J. and Kretsovali, A. (2011) Sall1 regulates embryonic stem cell differentiation in association with nanog. *J. Biol. Chem.*, 286, 1037-1045.
37. Smith, J. (1997) Brachyury and the T-box genes. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 7, 474-480.

38. Alorainy,I.A., Patenaude,Y.G., O’Gorman,A.M., Black,D.N. and Meagher-Villemure,K. (1999) Cree leukoencephalopathy: neuroimaging findings. *Radiology*, 213, 400-406.
39. Pekny,M. and Pekna,M. (2004) Astrocyte intermediate filaments in CNS pathologies and regeneration. *J. Pathol*, 204, 428-437.
40. Van Haren,K., van der Voorn,J.P., Peterson,D.R., van der Knaap,M.S. and Powers,J.M. (2004) The life and death of oligodendrocytes in vanishing white matter disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol*, 63, 618-630.
41. Zhou,Q. and Anderson,D.J. (2002) The bHLH transcription factors OLIG2 and OLIG1 couple neuronal and glial subtype specification. *Cell*, 109, 61-73.
42. Cai,J., Chen,Y., Cai,W.-H., Hurlock,E.C., Wu,H., Kernie,S.G., Parada,L.F. and Lu,Q.R. (2007) A crucial role for Olig2 in white matter astrocyte development. *Development*, 134, 1887-1899.
43. Götz,M., Stoykova,A. and Gruss,P. (1998) Pax6 controls radial glia differentiation in the cerebral cortex. *Neuron*, 21, 1031-1044.
44. Estivill-Torres,G., Pearson,H., van Heyningen,V., Price,D.J. and Rashbass,P. (2002) Pax6 is required to regulate the cell cycle and the rate of progression from symmetrical to asymmetrical division in mammalian cortical progenitors. *Development*, 129, 455-466.
45. Berger,J., Berger,S., Tuoc,T.C., D’Amelio,M., Cecconi,F., Gorski,J.A., Jones,K.R., Gruss,P. and Stoykova,A. (2007) Conditional activation of Pax6 in the developing cortex of transgenic mice causes progenitor apoptosis. *Development*, 134, 1311-1322.
46. Suter,D.M., Tirefort,D., Julien,S. and Krause,K.-H. (2009) A Sox1 to Pax6 switch drives neuroectoderm to radial glia progression during differentiation of mouse embryonic stem cells. *Stem Cells*, 27, 49-58.
47. Sakakibara,S., Imai,T., Hamaguchi,K., Okabe,M., Aruga,J., Nakajima,K., Yasutomi,D., Nagata,T., Kurihara,Y., Uesugi,S., et al. (1996) Mouse-Musashi-1, a neural RNA-binding protein highly enriched in the mammalian CNS stem cell. *Dev. Biol*, 176, 230-242.
48. Dehmelt,L. and Halpain,S. (2005) The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins. *Genome Biol*, 6, 204.

49. Kele,J., Simplicio,N., Ferri,A.L.M., Mira,H., Guillemot,F., Arenas,E. and Ang,S.-L. (2006) Neurogenin 2 is required for the development of ventral midbrain dopaminergic neurons. *Development*, 133, 495-505.
50. Schuurmans,C., Armant,O., Nieto,M., Stenman,J.M., Britz,O., Klenin,N., Brown,C., Langevin,L.-M., Seibt,J., Tang,H., et al. (2004) Sequential phases of cortical specification involve Neurogenin-dependent and -independent pathways. *EMBO J*, 23, 2892-2902.
51. Casarosa,S., Fode,C. and Guillemot,F. (1999) Mash1 regulates neurogenesis in the ventral telencephalon. *Development*, 126, 525-534.
52. Parras,C.M., Galli,R., Britz,O., Soares,S., Galichet,C., Battiste,J., Johnson,J.E., Nakafuku,M., Vescovi,A. and Guillemot,F. (2004) Mash1 specifies neurons and oligodendrocytes in the postnatal brain. *EMBO J*, 23, 4495-4505.
53. Roybon,L., Mastracci,T.L., Ribeiro,D., Sussel,L., Brundin,P. and Li,J.-Y. (2010) GABAergic differentiation induced by Mash1 is compromised by the bHLH proteins Neurogenin2, NeuroD1, and NeuroD2. *Cereb. Cortex*, 20, 1234-1244.
54. Mountford,P., Zevnik,B., Düwel,A., Nichols,J., Li,M., Dani,C., Robertson,M., Chambers,I. and Smith,A. (1994) Dicistronic targeting constructs: reporters and modifiers of mammalian gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 91, 4303-4307.

Figure 1

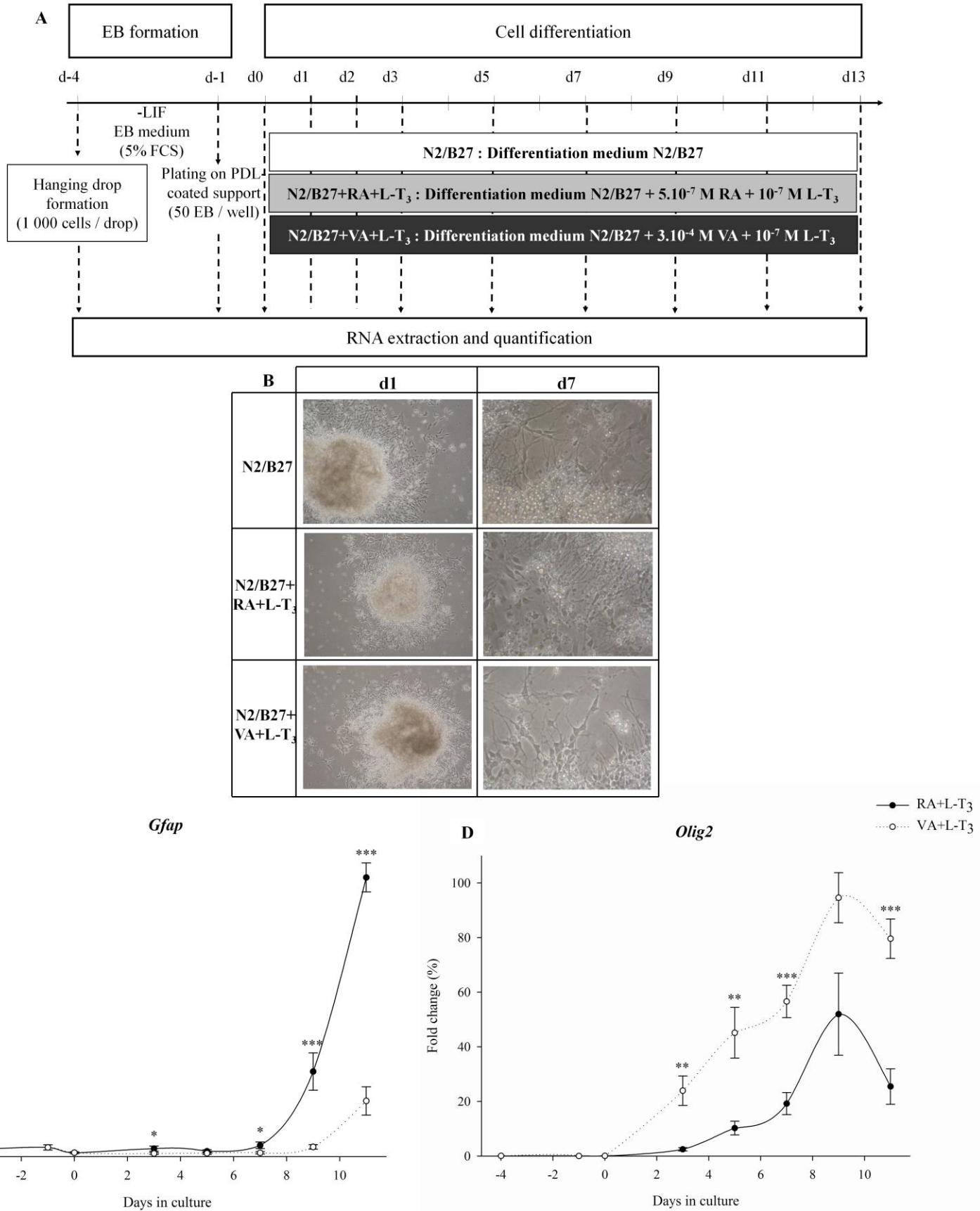


Figure 2

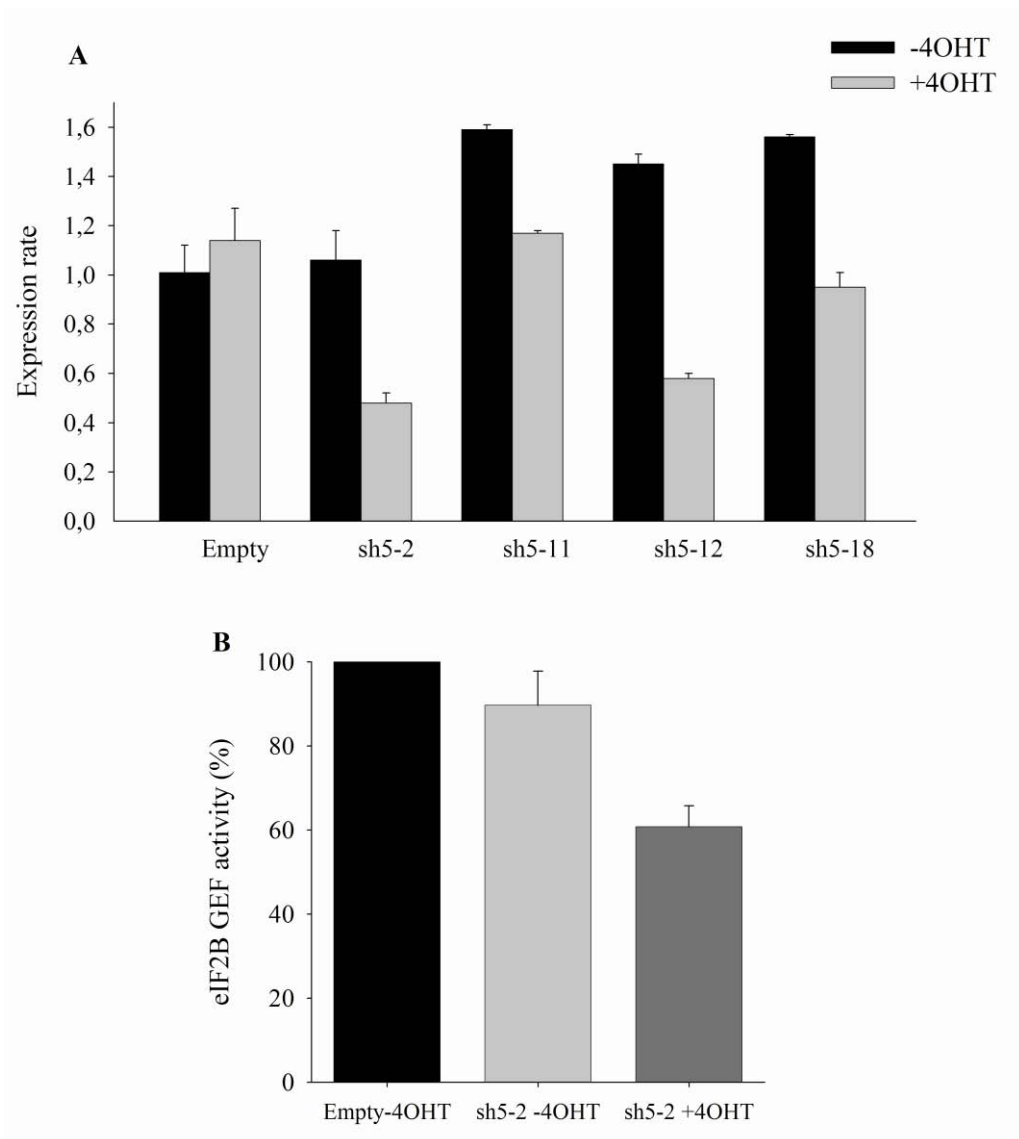


Figure 3

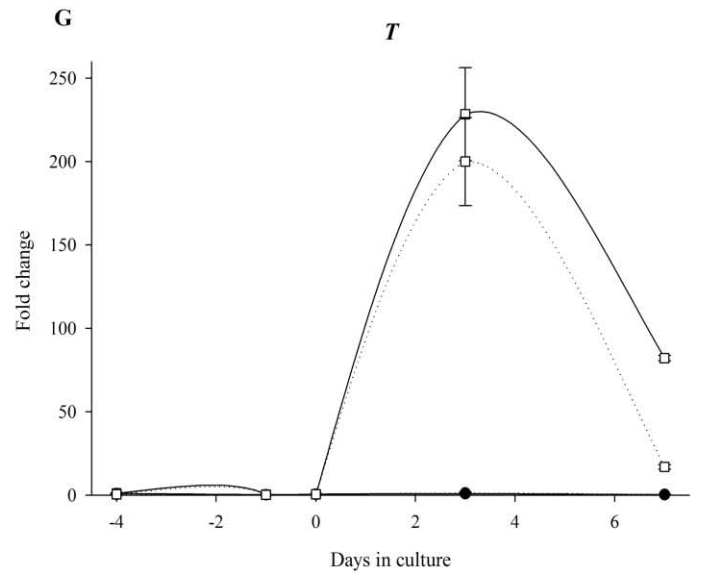
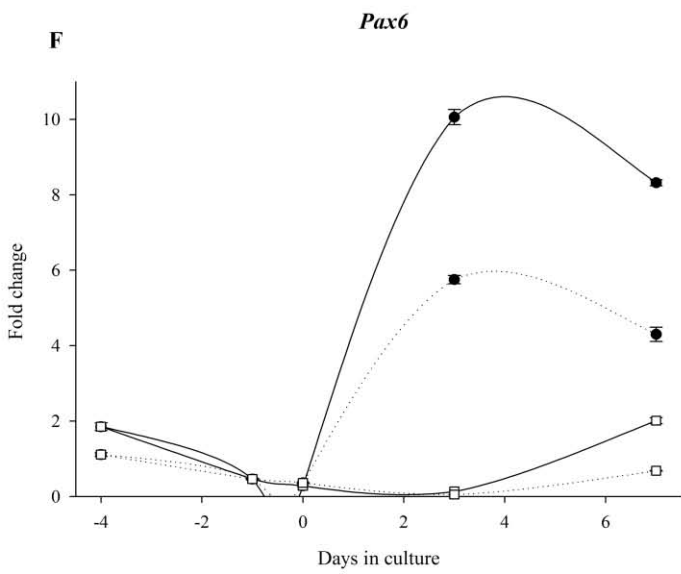
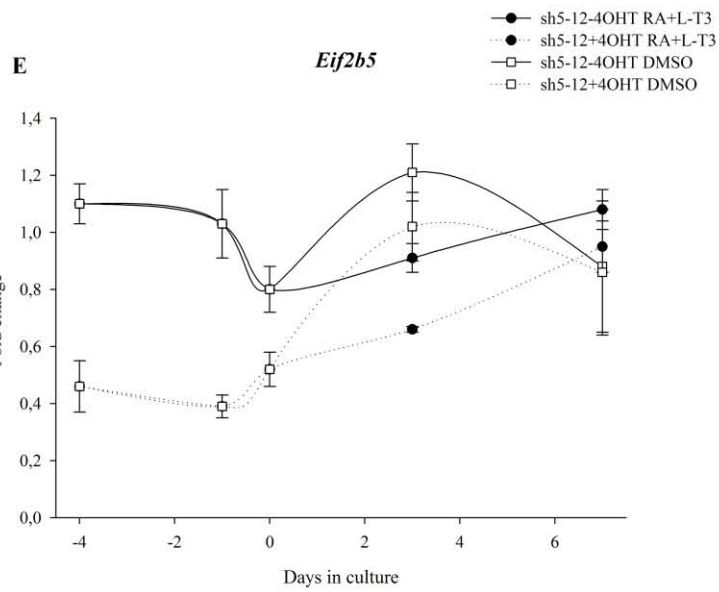
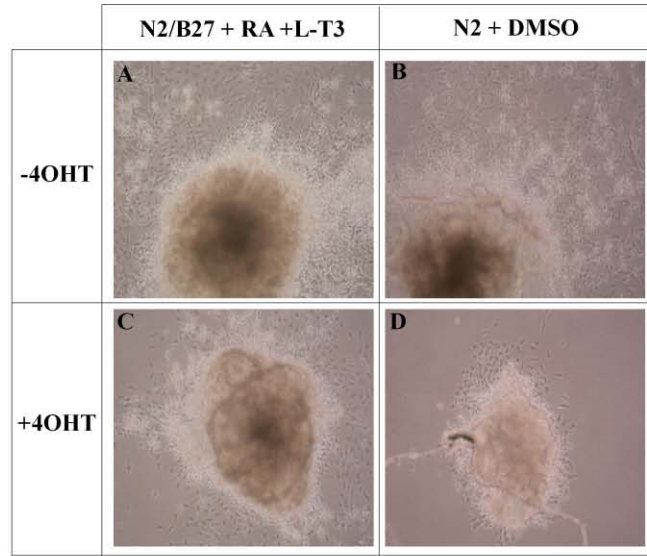


Figure 4

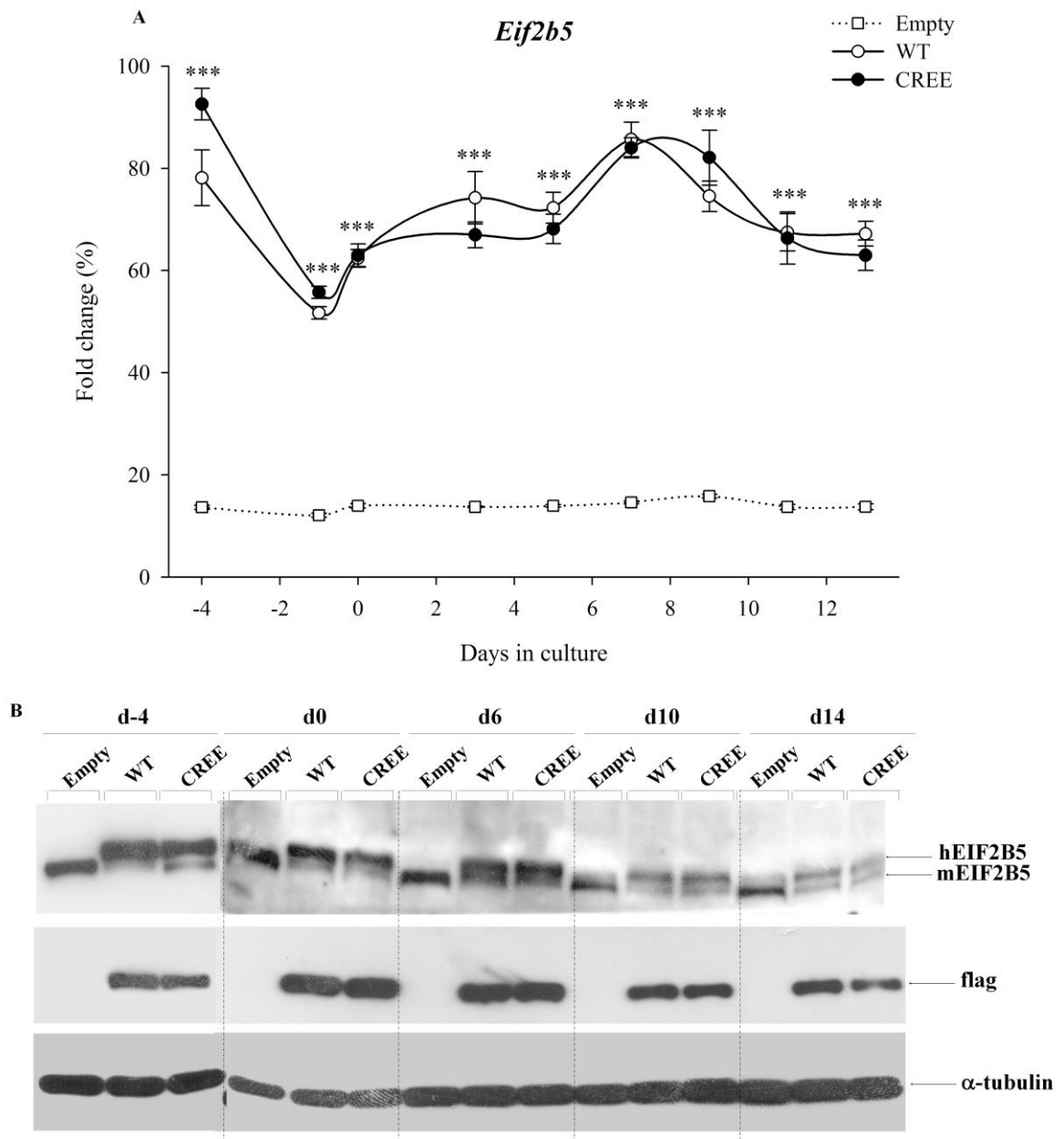


Figure 5

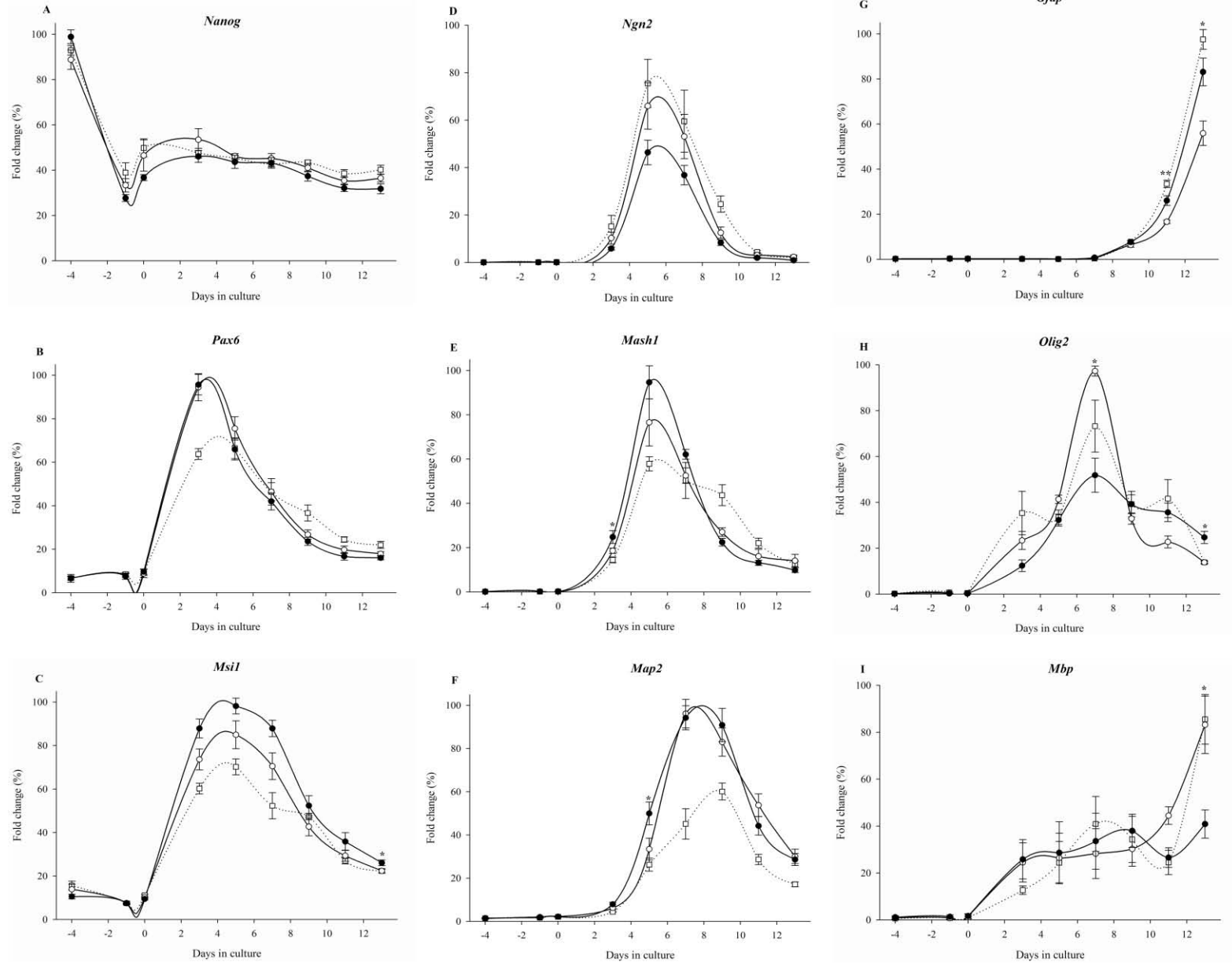
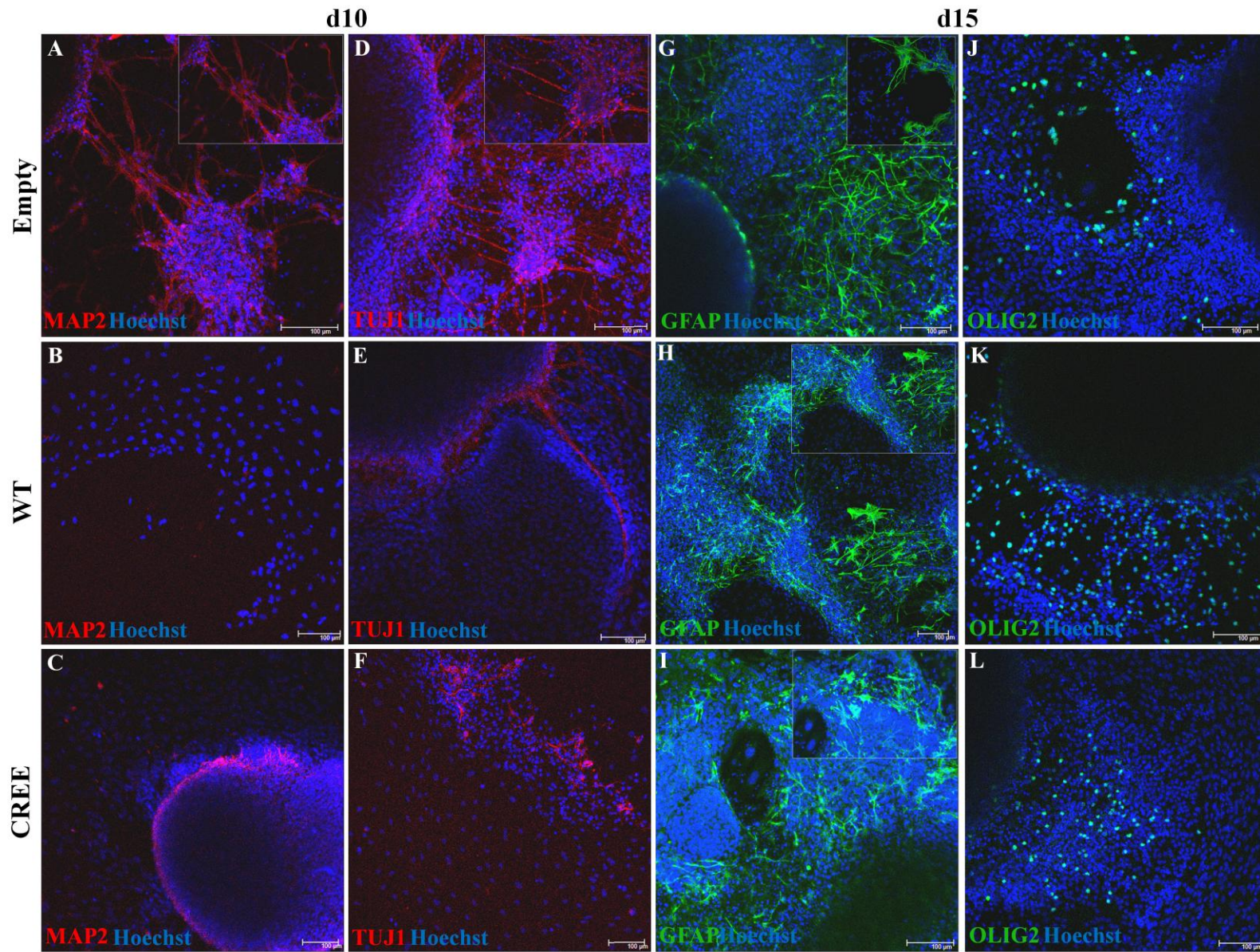


Figure 6



LEGENDS TO FIGURES

Figure 1. RA increases *Gfap* expression while VA increases *Olig2* one. A. Experimental protocol for differentiation of ES cells with RA+L-T₃ or VA+L-T₃. ES cells were allowed to form embryoid bodies (EBs) for three days in hanging drops and plated onto poly-D-lysine-coated 6-well plates. Differentiation medium N2/B27+RA+L-T₃ or N2/B27+VA+L-T₃ was added on day 0 and medium was changed every day until day 3 and every other day until day 13 of differentiation. Total mRNAs were extracted and analyzed by QRT-PCR at various time points of the kinetic as indicated. **B. Phase contrast images of differentiating mES cells at magnification x10 (at day 1) or x40 (at day 7).** At d1, EBs seeded into plate were adherent and new cells started to emerge from them. During next days cells increased, and they form rosettes, suggestive of neural precursor phenotype. **C, D. Analysis by QRT-PCR of *Gfap* and *Olig2* gene expression during the kinetic as described (A).** The fold changes were reported to the level of expression at day 0 and each sample was run in triplicate. The results were expressed as mean ± standard error (S.E.M.) from three independent experiments compared using the Mann-Whitney test (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

Figure 2. Analysis of *Eif2b5* gene expression and eIF2B GEF activity on *Eif2b5*-shRNA-transfected mES. A. mRNAs were isolated from mock-transfected mES cells (Empty) or *Eif2b5*-shRNA-5 individual clones treated (+4OHT) or not (-4OHT) with 4-hydroxytamoxifen and analyzed by QRT-PCR for the level of expression of *Eif2b5*. The fold changes were reported to the level of expression in mock-transfected cells non treated with 4OHT. Each sample was run in triplicate and errors bars represent standard deviation (s.d.). **B.** The eIF2B GEF activity was measured in mES from sh5-2 clone cells treated or not with 4OHT in comparison to the mock-transfected mES cells (Empty) not treated with 4OHT. Experiments were carried out in triplicate. Data are presented as percentage of exchange activity of control cells (Empty) ± s.d.

Figure 3. The eIF2B5-underexpressing cells fail to differentiate whatever the lineage fate choice. A-D. Phase contrast images of differentiating sh5-12 clone cells in different culture conditions 6 days after EB plating. Non treated cells maintained in N2/B27 in the presence of RA+L-T₃ (A) or N2+DMSO (B). 4OHT treated cells maintained in N2/B27 in the presence of RA+L-T₃ (C) or N2+DMSO (D). 4OHT treated cells are less numerous than the non treated counterparts and less differentiating cells emerge from EBs. Magnification x10. **E-G.**

mRNAs were isolated from *Eif2b5*-shRNA-12 clone cells at day -4, -1, 0, 3 and 7 during the kinetic from 4OHT treated or not treated cells. EBs induced by day 0 until the end of differentiation either in N2/B7 in the presence of RA+L-T3 or in N2+DMSO. mRNAs were then analyzed by QRT-PCR for the level of *Eif2b5* (E); and *Pax6* (F) and *T* (G) as respectively neurectodermal and mesodermal markers. The fold changes were reported to the level of expression in sh5-12 transfected cells non treated with 4OHT at day-4. Each sample was run in triplicate and errors bars represent standard deviation (s.d.).

Figure 4. mRNA and protein Eif2b5 overexpression is maintained in transduced ES cells during differentiation. **A.** mRNAs were isolated from the cells at the different time points of the RA+L-T3 kinetic in empty, WT and CREE overexpressing cells. Expression level of *EIF2B5* was assessed by QRT-PCR. The fold changes were reported to the level of expression at day 0 in empty mock cells and are represented as percentage. Each sample was run in triplicate and errors bars represent standard error (s.e.m.) from three independent experiments compared using a Kruskal-Wallis test followed by a post hoc paired comparison (** $P < 0.001$). **B.** 30 μ g of total protein were subjected to western blot analysis at the various time points of the kinetic of differentiation as indicated using antibodies specific for EIF2B5 (m: mouse and h: human proteins are recognized) and flag proteins. α -tubulin served as loading control.

Figure 5. Deregulation of neural differentiation in EIF2B5-overexpressing ES cells. mRNAs were isolated from the different overexpressing cell types (Empty, WT and CREE) all along the different time points of the kinetic as described. The level of gene expression was then analyzed by QRT-PCR for the pluripotent marker *Nanog* (A), the neurectoderm markers: *Pax6* (B), *Msi1* (C); the neuronal markers *Ng2* (D), *Mash1* (E), *Map2* (F), the glial markers *Gfap* (G) following RA+L-T₃ treatment, and *Olig2* (H) and *Mbp* (I) following VA+L-T₃ one. The fold changes were reported to the level of expression at day 0 in empty control cells and are represented as percentage. Each sample was run in triplicate and errors bars represent standard error (s.e.m.) from three independent experiments compared using a Kruskal-Wallis test followed by a post hoc paired comparison (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

Figure 6. Deregulation of neuronal and glial differentiation in EIF2B5-overexpressing ES cells. The different cell types (Empty, WT and CREE) were stained by

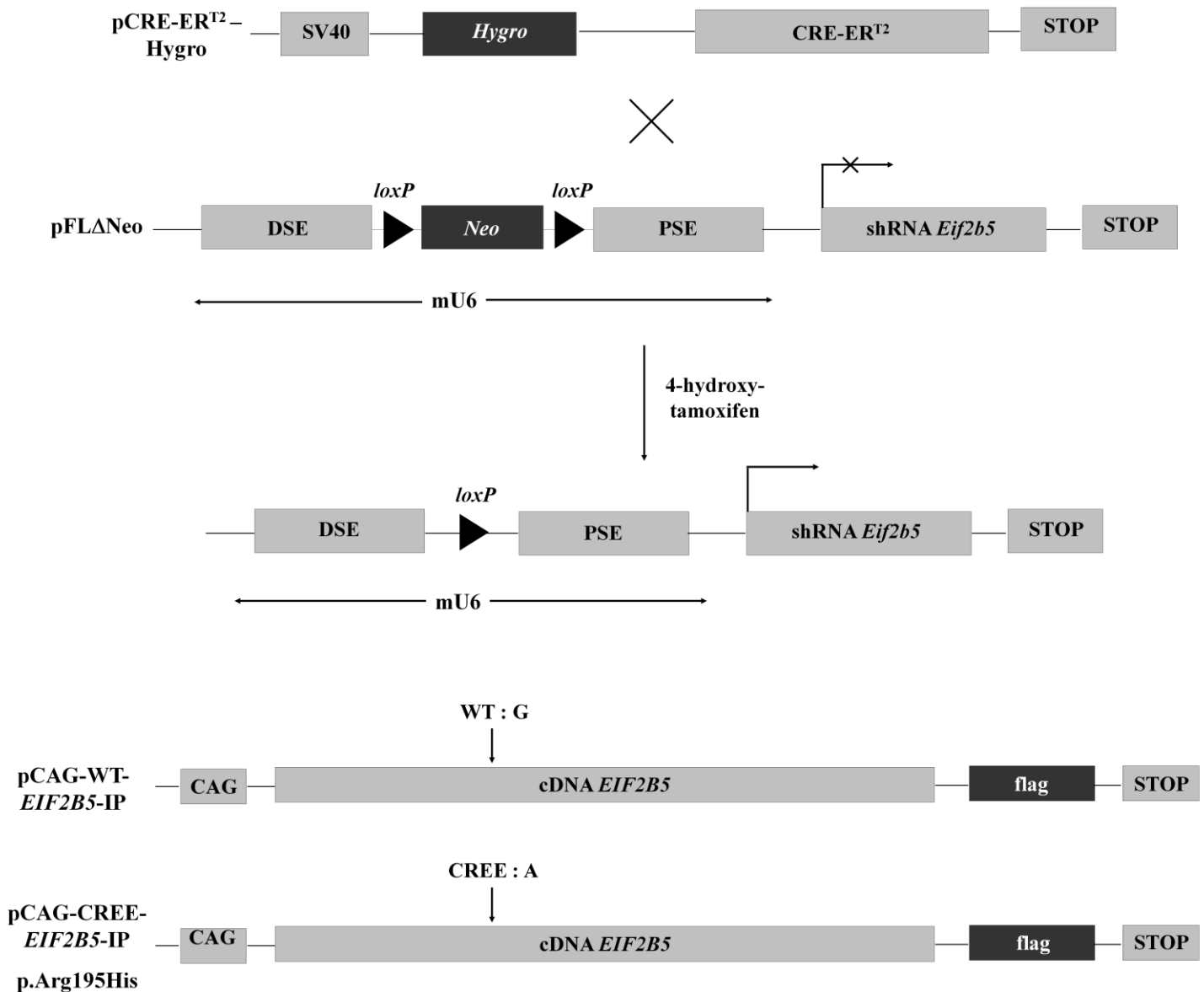
immunofluorescence for the neuronal markers MAP2 (**A-C**) and TUJ1 (**D-F**) at day 10 of the differentiation and for the glial markers GFAP (**G-I**) and OLIG2 (**J-L**) at day 15 of the differentiation. Nuclei are stained with Hoechst (blue) in all panels. Bars indicate 100µm.

Gene	Accession number	Cell marker	Taqman® probe
<i>Rs17</i>	BC086901	All (control)	Mm01318382_g1
<i>Eif2b5</i>	NM_172265	All	Mm00549265_m1
<i>Nanog</i>	NM_028016	Pluripotent	Mm02019550_s1
<i>Pax6</i>	NM_013627	Neurectoderm	Mm00443076_m1
<i>Msi1</i>	NM_008629	Neurectoderm	Mm00485224_m1
<i>Map2</i>	NM_008632	Neuron	Mm01256561_m1
<i>Neurog2</i>	NM_009718	Neuron	Mm00437603_g1
<i>NeuroD1</i>	NM_010894	Neuron	Mm01280117_m1
<i>Mash1</i>	NM_008553	Neuron	Mm03058063_m1
<i>Gfap</i>	NM_010277	Astrocyte	Mm00546086_m1
<i>Olig2</i>	NM_016967	Oligodendrocyte	Mm01210556_m1
<i>Mbp</i>	NM_001025251	Oligodendrocyte	Mm01262035_m1
<i>Ccnd1</i>	NM_007631	Proliferation / Differentiation	Mm00432360_m1
<i>Nkx2-5</i>	NM_008700	Mesoderm	Mm00657783_m1
<i>T</i>	NM_009309	Mesoderm	Mm01318252_m1

Supplemental data 1. List of the genes selected for QRT-PCR analysis. Gene names, accession numbers, their lineage of expression and Taqman Gene Expression Assay reference used for QRT-PCR quantitation are mentioned.

shRNA-<i>Eif2b5</i>	5'-3' sequence	Target exon
Sh1 (mi-RNA)	AGCTTTGAGCGCATGTGACAAGCTAGGGAATATAGTGAAGCCA CAGATGTATATCCCTAGTTGTCACATGCTGCCTAC	Exon 7
Sh2 (mi-RNA)	GCTTTGAGCGCTCTGACTTTCTCTTGATATTAGTGAAGCCACA GATGTAATATCAAGAGAAAGTCAGAGCTGCCTAC	Exon 3
Sh3	AGCTTGCTCTGACTTTCTCTTGATATTTCAAGAGAATATCAAG AGAAAGTCAGAGCTTTTTTC	Exon 3
Sh4	AGCTTAAGCTGCTCAGATCAAAGAAGTTCAAGAGAGTTCTTT GATCTGAGCAGCTTTTTTTC	Exon 2
Sh5	AGCTTGCATGTGACAAGCTAGGGAATATTCAAGAGATATTCCC TAGTTGTCACATGCTTTTTTC	Exon 7
Sh6	AGCTTGCGAGTCAAAGCTGAAGCCATATTCAAGAGATATGGCT TCAGTTTGACTCGCTTTTTTC	Exon 8
Sh7	AGCTTAAGGAACTACATAAAGCGTGCTTCAAGAGAGCACGCT TTATGTAGTTCCTTTTTTTC	Exon 14

Supplemental data 2. List of the 7 shRNA-*Eif2b5* selected. 5' to 3' sequences and target exons on the mouse *Eif2b5* cDNA are mentioned. Grey boxes represent the shRNA sequences corresponding to the target one.



Supplemental data 3. Schematic diagram of the inducible shRNA expression system (top). A loxP sites-flanked neomycin fragment replaces a 34-bp sequence between the distal and proximal sequence elements (DSE and PSE, respectively) within the mouse U6 promoter, blocking shRNA transcription. Upon induction of CRE-ER^{T2} recombinase by 4-hydroxy-tamoxifen, CRE-mediated excision of the neomycin cassette restores U6 activity, activating shRNA expression. **Cloning of the *EIF2B5* cDNA into pCAG-IP (bottom).** We first performed a PCR on the vector pNflag-huZB5 provided by Pr O. Elroy-Stein containing the human *EIF2B5* cDNA. The PCR product was then cloned into pGemT-easy and sequenced to ensure the integrity of the sequence. We then performed a site directed mutagenesis by inverse PCR on the clone pGemT-easy-WT-*EIF2B5* to obtain a CREE mutated version of the plasmid pGemT-easy-CREE-*EIF2B5*. The vector pCAG-IP was digested with EcoRI and dephosphorylated to prevent recircularisation. The WT and CREE *EIF2B5*-pGemT-easy vectors were then also digested by EcoRI to create compatible extremities and perform a cohesive end non directional cloning.

CONCLUSION GENERALE

Les eIF2B-pathies représentent aujourd'hui un groupe hétérogène de formes cliniques de sévérité variable dont le **diagnostic** repose sur l'analyse clinico-IRM des patients ainsi que sur le séquençage des cinq gènes *EIF2B1-5*. La validation de **marqueurs biologiques** tels que la diminution de l'activité GEF du facteur eIF2B dans les llb des patients atteints d'eIF2B-pathie en tant que test diagnostique permettra d'accélérer le dépistage de cette pathologie. De plus, l'identification d'une certaine corrélation entre le taux d'activité GEF et l'âge de début de la maladie constitue une aide **pronostique** intéressante pour la recherche des mutations induisant un phénotype sévère (taux d'activité GEF les plus bas) (publication 1).

Les résultats présentés sont également en faveur d'un impact des mutations du facteur eIF2B sur la **susceptibilité au stress** que développent les patients atteints. En effet, une détérioration clinique est observée chez les patients atteints d'eIF2B-pathie à la suite d'infections virales ou de traumatismes crâniens. Toutefois, nos résultats suggèrent que cette susceptibilité aux stress ne serait pas un mécanisme spécifique des eIF2B-pathies mais un processus biologique **commun aux LDs**, malgré le rôle du facteur eIF2B dans la régulation de l'initiation de la traduction en cas de stress cellulaire. Il semblerait que cette susceptibilité aux stress soit dépendante du caractère quiescent des cellules : les cellules en division active comme les llb seraient ainsi moins sensibles (publication 2) alors que des cellules plus quiescentes comme les Fbs développeraient une hyper-sensibilité (Kantor et al., 2005).

Des cultures de cellules gliales établies à partir de cerveau de patients porteurs de mutations dans le gène *EIF2B5* ont permis de démontrer que le dysfonctionnement du complexe eIF2B induisait une anomalie de maturation des astrocytes (Dietrich et al., 2005). Ceci permet de proposer l'hypothèse que le défaut de maturation des astrocytes peut contribuer à l'altération de la SB observée chez les patients même au cours des phases pré-symptomatiques. Or, la biogenèse de la myéline requiert une synthèse protéique importante et le défaut du facteur eIF2B pourrait donc conduire à une **maturation anormale des cellules gliales** (astrocytes et/ou OLs) du SNC pouvant expliquer une sensibilité accrue de la SB aux stress qui surviennent tout au long de la vie. Dans les formes adultes, la présence de la mutation récurrente c.338G>A (p.Arg113His) dans le gène *EIF2B5* suggère que cette mutation n'aurait pas un effet majeur au cours de la phase de maturation des cellules gliales ce qui expliquerait que les patients ne présentent pas de symptômes au cours de la phase de myélinogenèse. Par contre, cette mutation induirait une hypersensibilité aux stress des cellules gliales expliquant ainsi la dégradation neurologique progressive. A l'inverse, les phénotypes

sévères tels que les formes congénitales et infantiles précoces, qui présentent une atteinte de multiples organes en plus de l'atteinte cérébrale, résulteraient d'un défaut majeur développemental non plus dû à l'impact du stress cellulaire mais plutôt au dysfonctionnement sévère du facteur eIF2B sur les cellules en développement actif.

L'étude transcriptomique décrite a d'ailleurs permis d'étayer cette hypothèse et d'apporter des éléments de réponse à l'atteinte majeure de la SB causée par le dysfonctionnement du facteur eIF2B, pourtant ubiquitaire. Les mutations du facteur eIF2B affectent notamment des transcrits codant pour des protéines de **régulation de la transcription et de stabilisation et/ou d'épissage des ARNm**, ainsi que des protéines intervenant dans le **métabolisme des mitochondries**. La modification de l'épissage d'ARNm spécifiques des cellules gliales tels que *GFAP* ou *PLP1*, pourrait être ainsi à l'origine de l'altération de la maturation et/ou la différenciation de ces cellules au cours du développement. De même, une altération du métabolisme et du transport des mitochondries pourrait induire un défaut développemental des cellules gliales (publication 3).

Dans cette optique, nous avons également mis au point un modèle *in vitro* de l'altération de différenciation des cellules gliales à partir de cellules souches embryonnaires murines sur-exprimant une forme mutée du gène *EIF2B5* et permettant ainsi de mimer l'anomalie gliale développementale survenant dans la pathologie (publication 4). Ce modèle pourra faire l'objet d'études plus approfondies afin d'étudier les mécanismes physiopathologiques en cause.

Les analyses fonctionnelles réalisées sur les cellules de patients atteints d'eIF2B-pathie ont donc permis de mieux caractériser les **voies de régulation** mises en jeu dans la physiopathologie et ouvrent donc de nouvelles perspectives d'étude des **conséquences fonctionnelles des mutations du facteur eIF2B**.

Nous avons également apporté une nouvelle preuve d'un effet majeur des mutations du facteur eIF2B au cours du **développement**. En effet, nous avons confirmé la surexpression d'une sélection de transcrits uniquement dans des échantillons de cerveaux de fœtus porteurs de mutations du facteur eIF2B et à l'inverse une sous-expression dans des cerveaux d'enfants et d'adultes atteints d'eIF2B-pathie. Ce travail ouvre donc la voie à des études plus approfondies sur la régulation de l'épissage de transcrits spécifiques et du métabolisme des mitochondries au cours de la maturation et de la différenciation des cellules gliales du SNC.

L'ensemble de ces travaux nous a permis de faire l'hypothèse d'un **mécanisme physiopathologique** pour ces eIF2B-pathies comprenant deux processus pathologiques présents à des degrés divers selon la **sévérité** :

(1) un **trouble primitif du développement** responsable de l'altération congénitale de la structure de la SB observée à l'imagerie cérébrale chez tous les patients, parfois associée à des anomalies de l'œil ou à une dysgénésie ovarienne,

(2) une **dégradation du fonctionnement axonal** très fréquemment précipitée par des situations de **stress cellulaire** (infections virales bénignes, traumatisme crânien, troubles psychoaffectifs, etc). Malgré le caractère ubiquitaire de la protéine mutée, la SB serait plus sensible au stress cellulaire du fait de son trouble du développement.

PERSPECTIVES

Les perspectives à donner à l'étude transcriptomique seraient d'étudier plus précisément **l'épissage et la stabilité d'autres transcrits important pour la myélinisation** tels que *MBP*. En effet, connaissant le rôle de la protéine hnRNPA2 dans l'activation de la traduction de *MBP* au niveau des sites de contact axone-glie (White et al., 2008), des expériences de sous-expression du gène *EIF2B5* endogène ou de surexpression du gène muté pourront être menées dans des modèles d'OLs murins et humains (Oli-neu et MO3.13) afin d'étudier l'impact d'un défaut du facteur eIF2B sur l'épissage du transcrit *MBP*. Des résultats préliminaires de cette équipe indiquent également qu'une diminution de l'expression de *HNRNPF* par siRNA conduit à une diminution du niveau protéique de MBP dans les OLs primaires, impliquant ainsi hnRNPF comme partenaire potentiel de cette voie de régulation et soulignant le rôle de ces hnRNP dans le processus de myélinisation.

Par ailleurs, d'autres protéines de la myéline telles que MAG, MOG, MOBP et CNPase subissent un épissage alternatif au cours du développement et pourraient être les cibles d'hnRNP, conduisant potentiellement à des défauts de maturation et de différenciation des cellules du SNC au cours du développement.

Un projet débuté en collaboration avec le Dr. Bertrand Pain vise à **générer des iPSC (induced Pluripotent Stem Cells)** à partir de Fbs de patients atteints. Ces cellules somatiques peuvent être reprogrammées en cellules pluripotentes qui recouvrent une capacité d'auto-renouvellement, grâce à l'induction de l'expression de facteurs de pluripotence.

Les premières études ont été réalisées à partir de Fbs embryonnaires ou adultes de souris, dans lesquelles la pluripotence cellulaire a été induite par l'expression des quatre facteurs : Oct4, Sox2, c-Myc et Klf4 dans un vecteur rétroviral s'intégrant dans le génome (Takahashi et Yamanaka, 2006). Ce protocole a été adapté pour les iPSC humaines à partir de Fbs de fœtus, d'enfants et d'adultes (Park et al., 2008) puis amélioré par la suite en modifiant et en diminuant le nombre de facteurs nécessaires (Huangfu et al., 2008), en utilisant les vecteurs lentiviraux voire des vecteurs épisomaux non viraux et non intégratifs dans des Fbs murins (Okita et al., 2008) ou humains (Yu et al., 2009).

Les iPSC ainsi générées :

- expriment les gènes de pluripotence induits de manière exogène (phénomènes épigénétiques) et expriment la majorité des marqueurs de pluripotence des ESC ;
- ont un profil d'expression proche de celui des ESC (analyse transcriptomique) ;
- sont pluripotentes avec possibilité de se différencier en les trois feuilletts embryonnaires (mésoderme, endoderme et ectoderme) avec formation d'un

tératome après injection ciblée des iPSC dans des souris nude.

Les iPSC peuvent alors théoriquement être différenciées en n'importe quelle lignée cellulaire. Pour des pathologies touchant des cellules, tissus et organes difficilement disponibles comme dans le cas des maladies neurodégénératives, ces iPSC représentent une alternative très prometteuse.

Le but de ce projet est d'obtenir des cellules humaines capables de se différencier en cellules gliales, représentant la diversité des mutations observée chez les patients et utiles pour de futurs tests thérapeutiques.

A ce jour, les Fbs de patients et fœtus contrôles et avec eIF2B-pathies (4 couples de Fbs d'enfants et 1 couple de FB de fœtus) ont été transmis à Lyon. La reprogrammation des Fbs sera effectuée par transduction des cellules à l'aide du cocktail de gènes décrit dans la littérature, notamment l'association de *Nanog*, *Oct4*, *Sox2* et *Lin28*, l'ensemble permettant une meilleure reprogrammation des cellules humaines. Le potentiel de différenciation des iPSC obtenues sera évalué par la formation d'EB et au cours de l'obtention de cellules gliales.

Ainsi, les différents paramètres testés sur le potentiel de reprogrammation seront :

- les différents types de mutations touchant deux gènes différents (*EIF2B5* et *EIF2B2*) impliqués dans les eIF2B-pathies ;
- les sévérités cliniques associées ;
- les mécanismes physiopathologiques en jeu ;
- l'âge à la biopsie de peau (fœtus à 10 ans).

Une fois le protocole de production des iPSC maîtrisé et les différents paramètres ci-dessus testés entre Fbs mutés et contrôles, nos mises au point d'induction des mESC en cellules gliales seront appliquées aux iPSC générées dans ce projet.

Les résultats de notre étude transcriptomique différentielle dans les Fbs de patients, les anomalies de maturation des cellules gliales et la description d'atteintes autres que le SNC dans les eIF2B-pathies (ovaires, pancréas, chambre antérieure de l'œil) suggèrent que les mutations du facteur eIF2B sont responsables d'anomalies développementales. L'hypothèse physiopathologique détaillée dans la partie VII. de l'étude bibliographique repose sur cette anomalie primitive du développement des cellules gliales cérébrales, responsable de la susceptibilité accrue de la SB cérébrale aux mutations du facteur eIF2B, ce qui expliquerait les anomalies de la SB rapportées à l'IRM. Les épisodes de stress cellulaires touchant la SB mal formée expliqueraient dans un second temps la dégradation neurologique observée. Pour

étudier l'impact des mutations du facteur eIF2B ubiquitaire sur le développement cérébral et les voies cellulaires en cause dans ces pathologies, l'utilisation de **modèles animaux** est indispensable. Le KO *Eif2b5* constitutif étant léthal, une première approche alternative a été développée par l'équipe du Dr. Orna Elroy-Stein qui a récemment généré un modèle de souris KI portant une mutation dans le gène *Eif2b5*: p.Arg132His, correspondant à la mutation p.Arg136His entraînant un phénotype sévère chez un de nos patients. Les résultats montrent un léger retard de myélinisation au sein de la SB cérébrale dans différentes régions du cerveau, mais de manière générale, le phénotype de ces souris reste très modéré comparativement à l'homme (Geva et al., 2010).

Une stratégie de KO conditionnel inductible dans le temps et dans un type cellulaire donné pour le gène *Eif2b5* (cKO-*Eif2b5*) a été mise en place au sein de mon laboratoire d'accueil. En effet, le croisement de souris *Eif2b5*-flox (floxées entre les exons 2 et 7 du gène *Eif2b5*) avec des souris pPLP-CRE-ER^{T2} ou pGLAST-CRE-ER^{T2} permettra d'obtenir une lignée de souris dont l'inactivation du gène *Eif2b5* sera induite dans le temps par ajout de tamoxifène (permettant l'expression de la recombinaise modifiée CRE-ER^{T2}) et dans un type cellulaire donné (OLs quand la recombinaise CRE-ER^{T2} est sous le contrôle du promoteur PLP ou astrocytes quand elle est sous le contrôle du promoteur GLAST). Des analyses comportementales, RMN, électrophysiologiques et neuropathologiques seront menées pour caractériser cette souris et identifier le moment où le défaut du facteur eIF2B est délétère pour la myélinisation du SNC.

L'étude de ces souris cKO-*Eif2b5* permettra d'analyser l'impact de la sous-expression du gène *Eif2b5* dans les astrocytes et les OLs à différents moments du développement cruciaux pour la myélinisation et ainsi i) comprendre l'impact du défaut du facteur eIF2B sur le développement cérébral, ii) comprendre la physiopathologie des eIF2B-pathies et valider des voies métaboliques en cause, et iii) valider ce modèle animal pour pouvoir tester des molécules potentiellement thérapeutiques avant de les tester sur des patients.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adamsbaum C (2001) Atlas d'IRM du cerveau foetal: guide d'interprétation des aspects normaux. Elsevier Masson.
- Allen NJ, Barres BA (2009) Neuroscience: Glia - more than just brain glue. *Nature* 457:675-677.
- Amiel-Tison C (2005) Neurologie périnatale. Elsevier Masson.
- Anthony TG, Fabian JR, Kimball SR, Jefferson LS (2000) Identification of domains within the epsilon-subunit of the translation initiation factor eIF2B that are necessary for guanine nucleotide exchange activity and eIF2B holoprotein formation. *Biochim Biophys Acta* 1492:56-62.
- Antonow-Schlorke I, Helgert A, Gey C, Coksaygan T, Schubert H, Nathanielsz PW, Witte OW, Schwab M (2009) Adverse effects of antenatal glucocorticoids on cerebral myelination in sheep. *Obstet Gynecol* 113:142-151.
- Armati P, Mathey E (2010) The Biology of Oligodendrocytes. Cambridge University Press.
- Bain G, Ray WJ, Yao M, Gottlieb DI (1996) Retinoic acid promotes neural and represses mesodermal gene expression in mouse embryonic stem cells in culture. *Biochem Biophys Res Commun* 223:691-694.
- Baird SD, Turcotte M, Korneluk RG, Holcik M (2006) Searching for IRES. *RNA* 12:1755-1785.
- Baron W, Hoekstra D (2010) On the biogenesis of myelin membranes: sorting, trafficking and cell polarity. *FEBS Lett* 584:1760-1770.
- Barres BA, Raff MC (1993) Proliferation of oligodendrocyte precursor cells depends on electrical activity in axons. *Nature* 361:258-260.
- Baumann N, Pham-Dinh D (2001) Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol Rev* 81:871-927.
- Baumann N, Turpin JC (2000) Adult-onset leukodystrophies. *J Neurol* 247:751-759.
- Benarroch EE (2005) Neuron-astrocyte interactions: partnership for normal function and disease in the central nervous system. *Mayo Clin Proc* 80:1326-1338.
- Del Bigio MR (2010) Ependymal cells: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 119:55-73.
- Black DN, Watters GV, Andermann E, Dumont C, Kabay ME, Kaplan P, Meagher-Villemure K, Michaud J, O'Gorman G, Reece E (1988) Encephalitis among Cree children in northern Quebec. *Ann Neurol* 24:483-489.
- Blüml S, Philippart M, Schiffmann R, Seymour K, Ross BD (2003) Membrane phospholipids and high-energy metabolites in childhood ataxia with CNS hypomyelination. *Neurology* 61:648-654.
- Boesen T, Mohammad SS, Pavitt GD, Andersen GR (2004) Structure of the catalytic fragment of translation initiation factor 2B and identification of a critically important catalytic residue. *J Biol Chem* 279:10584-10592.

- Boespflug-Tanguy O, Labauge P, Fogli A, Vaur-Barriere C (2008) Genes involved in leukodystrophies: a glance at glial functions. *Curr Neurol Neurosci Rep* 8:217-229.
- Bradl M, Lassmann H (2010) Oligodendrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 119:37-53.
- Brocard J, Warot X, Wendling O, Messaddeq N, Vonesch JL, Chambon P, Metzger D (1997) Spatio-temporally controlled site-specific somatic mutagenesis in the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:14559-14563.
- Brück W, Herms J, Brockmann K, Schulz-Schaeffer W, Hanefeld F (2001) Myelinopathia centralis diffusa (vanishing white matter disease): evidence of apoptotic oligodendrocyte degeneration in early lesion development. *Ann Neurol* 50:532-536.
- Brüstle O, Jones KN, Learish RD, Karram K, Choudhary K, Wiestler OD, Duncan ID, McKay RD (1999) Embryonic stem cell-derived glial precursors: a source of myelinating transplants. *Science* 285:754-756.
- Bugiani M, Boor I, van Kollenburg B, Postma N, Polder E, van Berkel C, van Kesteren RE, Windrem MS, Hol EM, Scheper GC, Goldman SA, van der Knaap MS (2011) Defective glial maturation in vanishing white matter disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 70:69-82.
- Burdon T, Smith A, Savatier P (2002) Signalling, cell cycle and pluripotency in embryonic stem cells. *Trends Cell Biol* 12:432-438.
- Cailloux F, Gauthier-Barichard F, Mimault C, Isabelle V, Courtois V, Giraud G, Dastugue B, Boespflug-Tanguy O (2000) Genotype-phenotype correlation in inherited brain myelination defects due to proteolipid protein gene mutations. *Clinical European Network on Brain Dysmyelinating Disease. Eur J Hum Genet* 8:837-845.
- Campagnoni AT (1988) Molecular biology of myelin proteins from the central nervous system. *J Neurochem* 51:1-14.
- Casarosa S, Fode C, Guillemot F (1999) Mash1 regulates neurogenesis in the ventral telencephalon. *Development* 126:525-534.
- Chabriat H, Joutel A, Dichgans M, Tournier-Lasserre E, Boussier M-G (2009) Cadasil. *Lancet Neurol* 8:643-653.
- Chambers I (2004) The molecular basis of pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Cloning Stem Cells* 6:386-391.
- Chiu FC, Norton WT, Fields KL (1981) The cytoskeleton of primary astrocytes in culture contains actin, glial fibrillary acidic protein, and the fibroblast-type filament protein, vimentin. *J Neurochem* 37:147-155.
- Cochard LR, Netter FH (2003) *Atlas d'embryologie humaine de Netter*. Elsevier Masson.
- Coumoul X, Li W, Wang R-H, Deng C (2004) Inducible suppression of Fgfr2 and Survivin in ES cells using a combination of the RNA interference (RNAi) and the Cre-LoxP system. *Nucleic Acids Res* 32:e85.

- Damon-Perriere N, Menegon P, Olivier A, Boespflug-Tanguy O, Niel F, Creveaux I, Dousset V, Brochet B, Goizet C (2008) Intra-familial phenotypic heterogeneity in adult onset vanishing white matter disease. *Clin Neurol Neurosurg* 110:1068-1071.
- Dehmelt L, Halpain S (2005) The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins. *Genome Biol* 6:204.
- Delépine M, Nicolino M, Barrett T, Golamaully M, Lathrop GM, Julier C (2000) EIF2AK3, encoding translation initiation factor 2-alpha kinase 3, is mutated in patients with Wolcott-Rallison syndrome. *Nat Genet* 25:406-409.
- Delhay-Bouchaud N (2001) Développement du système nerveux central chez les mammifères/Development of the central nervous system in mammals. *Neurophysiologie Clinique/Clinical Neurophysiology* 31:63-82.
- Denier C, Orgibet A, Roffi F, Jouvent E, Buhl C, Niel F, Boespflug-Tanguy O, Said G, Ducreux D (2007) Adult-onset vanishing white matter leukoencephalopathy presenting as psychosis. *Neurology* 68:1538-1539.
- Deon M, Sitta A, Barschak AG, Coelho DM, Pigatto M, Schmitt GO, Jardim LB, Giugliani R, Wajner M, Vargas CR (2007) Induction of lipid peroxidation and decrease of antioxidant defenses in symptomatic and asymptomatic patients with X-linked adrenoleukodystrophy. *Int J Dev Neurosci* 25:441-444.
- Dever TE (2002) Gene-specific regulation by general translation factors. *Cell* 108:545-556.
- Dholakia JN, Wahba AJ (1989) Mechanism of the nucleotide exchange reaction in eukaryotic polypeptide chain initiation. Characterization of the guanine nucleotide exchange factor as a GTP-binding protein. *J Biol Chem* 264:546-550.
- Dietrich J, Lacagnina M, Gass D, Richfield E, Mayer-Pröschel M, Noble M, Torres C, Pröschel C (2005) EIF2B5 mutations compromise GFAP+ astrocyte generation in vanishing white matter leukodystrophy. *Nat Med* 11:277-283.
- DiMauro S, Schon EA (2008) Mitochondrial disorders in the nervous system. *Annu Rev Neurosci* 31:91-123.
- Dreha-Kulaczewski SF, Dechent P, Finsterbusch J, Brockmann K, Gärtner J, Frahm J, Hanefeld FA (2008) Early reduction of total N-acetyl-aspartate-compounds in patients with classical vanishing white matter disease. A long-term follow-up MRS study. *Pediatr Res* 63:444-449.
- Encha-Razavi F, Escudier E (2011) *Unité foeto-placentaire*. Elsevier Masson.
- Erickson FL, Nika J, Rippel S, Hannig EM (2001) Minimum requirements for the function of eukaryotic translation initiation factor 2. *Genetics* 158:123-132.
- Estivill-Torres G, Pearson H, van Heyningen V, Price DJ, Rashbass P (2002) Pax6 is required to regulate the cell cycle and the rate of progression from symmetrical to asymmetrical division in mammalian cortical progenitors. *Development* 129:455-466.
- Evans MJ, Kaufman MH (1981) Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292:154-156.

- Fancy SPJ, Chan JR, Baranzini SE, Franklin RJM, Rowitch DH (2011) Myelin regeneration: a recapitulation of development? *Annu Rev Neurosci* 34:21-43.
- Federico A, Scali O, Stromillo ML, Di Perri C, Bianchi S, Sicurelli F, De Stefano N, Malandrini A, Dotti MT (2006) Peripheral neuropathy in vanishing white matter disease with a novel EIF2B5 mutation. *Neurology* 67:353-355.
- Feil R, Wagner J, Metzger D, Chambon P (1997) Regulation of Cre recombinase activity by mutated estrogen receptor ligand-binding domains. *Biochem Biophys Res Commun* 237:752-757.
- Fluckiger A-C, Dehay C, Savatier P (2003) [Embryonic stem cells and cell replacement therapies in the nervous system]. *Med Sci (Paris)* 19:699-708.
- Fogli A, Boespflug-Tanguy O (2006) The large spectrum of eIF2B-related diseases. *Biochem Soc Trans* 34:22-29.
- Fogli A, Dionisi-Vici C, Deodato F, Bartuli A, Boespflug-Tanguy O, Bertini E (2002a) A severe variant of childhood ataxia with central hypomyelination/vanishing white matter leukoencephalopathy related to EIF21B5 mutation. *Neurology* 59:1966-1968.
- Fogli A, Rodriguez D, Eymard-Pierre E, Boespflug-Tanguy O (2003a) [eIF2B and Cree Indian leukodystrophies]. *Med Sci (Paris)* 19:283-284.
- Fogli A, Rodriguez D, Eymard-Pierre E, Bouhour F, Labauge P, Meaney BF, Zeesman S, Kaneski CR, Schiffmann R, Boespflug-Tanguy O (2003b) Ovarian failure related to eukaryotic initiation factor 2B mutations. *Am J Hum Genet* 72:1544-1550.
- Fogli A, Schiffmann R, Bertini E, Ughetto S, Combes P, Eymard-Pierre E, Kaneski CR, Pineda M, Troncoso M, Uziel G, Surtees R, Pugin D, Chaunu M-P, Rodriguez D, Boespflug-Tanguy O (2004a) The effect of genotype on the natural history of eIF2B-related leukodystrophies. *Neurology* 62:1509-1517.
- Fogli A, Schiffmann R, Hugendubler L, Combes P, Bertini E, Rodriguez D, Kimball SR, Boespflug-Tanguy O (2004b) Decreased guanine nucleotide exchange factor activity in eIF2B-mutated patients. *Eur J Hum Genet* 12:561-566.
- Fogli A, Wong K, Eymard-Pierre E, Wenger J, Bouffard J-P, Goldin E, Black DN, Boespflug-Tanguy O, Schiffmann R (2002b) Cree leukoencephalopathy and CACH/VWM disease are allelic at the EIF2B5 locus. *Ann Neurol* 52:506-510.
- Fontenelle LM da C, Scheper GC, Brandão L, van der Knaap MS (2008) Atypical presentation of vanishing white matter disease. *Arq Neuropsiquiatr* 66:549-551.
- Forman MS, Lee VM-Y, Trojanowski JQ (2003) « Unfolding » pathways in neurodegenerative disease. *Trends Neurosci* 26:407-410.
- Fraichard A, Chassande O, Bilbaut G, Dehay C, Savatier P, Samarut J (1995) In vitro differentiation of embryonic stem cells into glial cells and functional neurons. *J Cell Sci* 108 (Pt 10):3181-3188.
- Francalanci P, Eymard-Pierre E, Dionisi-Vici C, Boldrini R, Piemonte F, Virgili R, Fariello G, Bosman C, Santorelli FM, Boespflug-Tanguy O, Bertini E (2001) Fatal infantile

- leukodystrophy: a severe variant of CACH/VWM syndrome, allelic to chromosome 3q27. *Neurology* 57:265-270.
- Fukuda S, Kondo T, Takebayashi H, Taga T (2004) Negative regulatory effect of an oligodendrocytic bHLH factor OLIG2 on the astrocytic differentiation pathway. *Cell Death Differ* 11:196-202.
- Garlatti M, Barouki R (2002) Le stress du réticulum endoplasmique : adaptation et toxicité. *médecine/sciences* 18:10.
- Gaspar NJ, Kinzy TG, Scherer BJ, Hümbelin M, Hershey JW, Merrick WC (1994) Translation initiation factor eIF-2. Cloning and expression of the human cDNA encoding the gamma-subunit. *J Biol Chem* 269:3415-3422.
- Gebauer F, Hentze MW (2004) Molecular mechanisms of translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:827-835.
- Georgala PA, Carr CB, Price DJ (2011) The role of Pax6 in forebrain development. *Dev Neurobiol* 71:690-709.
- Geva M, Cabilly Y, Assaf Y, Mindroul N, Marom L, Raini G, Pinchasi D, Elroy-Stein O (2010) A mouse model for eukaryotic translation initiation factor 2B-leucodystrophy reveals abnormal development of brain white matter. *Brain* 133:2448-2461.
- Goffinet A (1994) Anatomie clinique du système nerveux central. Presses universitaires de Namur.
- Gomez E, Mohammad SS, Pavitt GD (2002) Characterization of the minimal catalytic domain within eIF2B: the guanine-nucleotide exchange factor for translation initiation. *EMBO J* 21:5292-5301.
- Gomez E, Pavitt GD (2000) Identification of domains and residues within the epsilon subunit of eukaryotic translation initiation factor 2B (eIF2Bepsilon) required for guanine nucleotide exchange reveals a novel activation function promoted by eIF2B complex formation. *Mol Cell Biol* 20:3965-3976.
- Gordon N (2007) Sjögren-Larsson syndrome. *Dev Med Child Neurol* 49:152-154.
- Götz (1999) Cerebral cortex development. *Encyclopedia of life sciences*, Nature, Publishing Group, London.
- Hagemann TL, Connor JX, Messing A (2006) Alexander disease-associated glial fibrillary acidic protein mutations in mice induce Rosenthal fiber formation and a white matter stress response. *J Neurosci* 26:11162-11173.
- Hanefeld F, Holzbach U, Kruse B, Wilichowski E, Christen HJ, Frahm J (1993) Diffuse white matter disease in three children: an encephalopathy with unique features on magnetic resonance imaging and proton magnetic resonance spectroscopy. *Neuropediatrics* 24:244-248.
- Harding HP, Novoa I, Zhang Y, Zeng H, Wek R, Schapira M, Ron D (2000) Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol Cell* 6:1099-1108.

- Van Haren K, van der Voorn JP, Peterson DR, van der Knaap MS, Powers JM (2004) The life and death of oligodendrocytes in vanishing white matter disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 63:618-630.
- He L, Hannon GJ (2004) MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet* 5:522-531.
- Hellen CU, Sarnow P (2001) Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules. *Genes Dev* 15:1593-1612.
- Henneke M, Diekmann S, Ohlenbusch A, Kaiser J, Engelbrecht V, Kohlschütter A, Krätzner R, Madruga-Garrido M, Mayer M, Opitz L, Rodriguez D, Rüschenhoff F, Schumacher J, Thiele H, Thoms S, Steinfeld R, Nürnberg P, Gärtner J (2009) RNASET2-deficient cystic leukoencephalopathy resembles congenital cytomegalovirus brain infection. *Nat Genet* 41:773-775.
- Hirokawa N, Takemura R (2005) Molecular motors and mechanisms of directional transport in neurons. *Nat Rev Neurosci* 6:201-214.
- Holcik M, Sonenberg N (2005) Translational control in stress and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:318-327.
- Horzinski L, Gonthier C, Rodriguez D, Scherer C, Boespflug-Tanguy O, Fogli A (2008) Exon deletion in the non-catalytic domain of eIF2Bepsilon due to a splice site mutation leads to infantile forms of CACH/VWM with severe decrease of eIF2B GEF activity. *Ann Hum Genet* 72:410-415.
- Horzinski L, Huyghe A, Cardoso M-C, Gonthier C, Ouchchane L, Schiffmann R, Blanc P, Boespflug-Tanguy O, Fogli A (2009) Eukaryotic initiation factor 2B (eIF2B) GEF activity as a diagnostic tool for EIF2B-related disorders. *PLoS ONE* 4:e8318.
- Huangfu D, Osafunde K, Maehr R, Guo W, Eijkelenboom A, Chen S, Muhlestein W, Melton DA (2008). Induction of pluripotent stem cell from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nature Biotechnology* 26:1269-1275.
- Hudson LD (2001) Oligodendrocytes. *Encyclopedia of life sciences*, Nature, Publishing Group, London.
- Huntsman RJ, Seshia S, Lowry N, Lemire EG, Harder SL (2007) Peripheral neuropathy in a child with Cree leukodystrophy. *J Child Neurol* 22:766-768.
- Indra AK, Warot X, Brocard J, Bornert JM, Xiao JH, Chambon P, Metzger D (1999) Temporally-controlled site-specific mutagenesis in the basal layer of the epidermis: comparison of the recombinase activity of the tamoxifen-inducible Cre-ER(T) and Cre-ER(T2) recombinases. *Nucleic Acids Res* 27:4324-4327.
- Inoue K (2005) PLP1-related inherited dysmyelinating disorders: Pelizaeus-Merzbacher disease and spastic paraplegia type 2. *Neurogenetics* 6:1-16.
- Iwata K, Matsuzaki H, Manabe T, Mori N (2011) Altering the expression balance of hnRNP C1 and C2 changes the expression of myelination-related genes. *Psychiatry Res* Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21684615>.

- Jahn O, Tenzer S, Werner HB (2009) Myelin proteomics: molecular anatomy of an insulating sheath. *Mol Neurobiol* 40:55-72.
- Jansen AC, Andermann E, Niel F, Creveaux I, Boespflug-Tanguy O, Andermann F (2008) Leucoencephalopathy with vanishing white matter may cause progressive myoclonus epilepsy. *Epilepsia* 49:910-913.
- Kaczorowska M, Kuczynski D, Jurkiewicz E, Scheper GC, van der Knaap MS, Jozwiak S (2006) Acute fright induces onset of symptoms in vanishing white matter disease-case report. *Eur J Paediatr Neurol* 10:192-193.
- Kantor L, Harding HP, Ron D, Schiffmann R, Kaneski CR, Kimball SR, Elroy-Stein O (2005) Heightened stress response in primary fibroblasts expressing mutant eIF2B genes from CACH/VWM leukodystrophy patients. *Hum Genet* 118:99-106.
- Kantor L, Pinchasi D, Mintz M, Hathout Y, Vanderver A, Elroy-Stein O (2008) A point mutation in translation initiation factor 2B leads to a continuous hyper stress state in oligodendroglial-derived cells. *PLoS ONE* 3:e3783.
- Karinch AM, Kimball SR, Vary TC, Jefferson LS (1993) Regulation of eukaryotic initiation factor-2B activity in muscle of diabetic rats. *Am J Physiol* 264:E101-108.
- Kaufman RJ (2004) Regulation of mRNA translation by protein folding in the endoplasmic reticulum. *Trends Biochem Sci* 29:152-158.
- Kaye EM (2001) Update on genetic disorders affecting white matter. *Pediatr Neurol* 24:11-24.
- Kele J, Simplicio N, Ferri ALM, Mira H, Guillemot F, Arenas E, Ang S-L (2006) Neurogenin 2 is required for the development of ventral midbrain dopaminergic neurons. *Development* 133:495-505.
- Kierszenbaum AL (2006) *Histologie et biologie cellulaire: Une introduction à l'anatomie pathologique*. De Boeck Supérieur.
- Kim SU, de Vellis J (2005) Microglia in health and disease. *J Neurosci Res* 81:302-313.
- Kimball SR (1999) Eukaryotic initiation factor eIF2. *Int J Biochem Cell Biol* 31:25-29.
- Kimball SR, Jefferson LS (1995) Allosteric regulation of eukaryotic initiation factor eIF-2B by adenine nucleotides. *Biochem Biophys Res Commun* 212:1074-1081.
- Kimball SR, Vary TC, Jefferson LS (1992) Age-dependent decrease in the amount of eukaryotic initiation factor 2 in various rat tissues. *Biochem J* 286 (Pt 1):263-268.
- van der Knaap MS, Barth PG, Gabreëls FJ, Franzoni E, Begeer JH, Stroink H, Rotteveel JJ, Valk J (1997) A new leucoencephalopathy with vanishing white matter. *Neurology* 48:845-855.
- van der Knaap MS, van Berkel CGM, Herms J, van Coster R, Baethmann M, Naidu S, Boltshauser E, Willemsen MAAP, Plecko B, Hoffmann GF, Proud CG, Scheper GC, Pronk JC (2003) eIF2B-related disorders: antenatal onset and involvement of multiple organs. *Am J Hum Genet* 73:1199-1207.

- van der Knaap MS, Leegwater PAJ, van Berkel CGM, Brenner C, Storey E, Di Rocco M, Salvi F, Pronk JC (2004) Arg113His mutation in eIF2Bepsilon as cause of leukoencephalopathy in adults. *Neurology* 62:1598-1600.
- van der Knaap MS, Leegwater PAJ, Könst AAM, Visser A, Naidu S, Oudejans CBM, Schutgens RBH, Pronk JC (2002) Mutations in each of the five subunits of translation initiation factor eIF2B can cause leukoencephalopathy with vanishing white matter. *Ann Neurol* 51:264-270.
- van der Knaap MS, Pronk JC, Scheper GC (2006) Vanishing white matter disease. *Lancet Neurol* 5:413-423.
- Kohlschütter A, Bley A, Brockmann K, Gärtner J, Krägeloh-Mann I, Rolfs A, Schöls L (2010) Leukodystrophies and other genetic metabolic leukoencephalopathies in children and adults. *Brain Dev* 32:82-89.
- van Kollenburg B, van Dijk J, Garbern J, Thomas AAM, Scheper GC, Powers JM, van der Knaap MS (2006) Glia-specific activation of all pathways of the unfolded protein response in vanishing white matter disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 65:707-715.
- Krishnamoorthy T, Pavitt GD, Zhang F, Dever TE, Hinnebusch AG (2001) Tight binding of the phosphorylated alpha subunit of initiation factor 2 (eIF2alpha) to the regulatory subunits of guanine nucleotide exchange factor eIF2B is required for inhibition of translation initiation. *Mol Cell Biol* 21:5018-5030.
- Labauge P, Boespflug-Tanguy O (2010) [Genetic demyelinating diseases]. *Presse Med* 39:363-370.
- Labauge P, Fogli A, Niel F, Rodriguez D, Boespflug-Tanguy O (2007) [CACH/VWM syndrome and leucodystrophies related to EIF2B mutations]. *Rev Neurol (Paris)* 163:793-799.
- Labauge P, Horzinski L, Ayrignac X, Blanc P, Vukusic S, Rodriguez D, Mauguier F, Peter L, Goizet C, Bouhour F, Denier C, Confavreux C, Obadia M, Blanc F, de Sèze J, Fogli A, Boespflug-Tanguy O (2009) Natural history of adult-onset eIF2B-related disorders: a multi-centric survey of 16 cases. *Brain* 132:2161-2169.
- Laursen LS, Chan CW, French-Constant C (2011) Translation of myelin basic protein mRNA in oligodendrocytes is regulated by integrin activation and hnRNP-K. *J Cell Biol* 192:797-811.
- Lazzarini RA (2004) Myelin biology and disorders. Elsevier Academic Press.
- Leegwater PA, Könst AA, Kuyt B, Sandkuijl LA, Naidu S, Oudejans CB, Schutgens RB, Pronk JC, van der Knaap MS (1999) The gene for leukoencephalopathy with vanishing white matter is located on chromosome 3q27. *Am J Hum Genet* 65:728-734.
- Leegwater PA, Vermeulen G, Könst AA, Naidu S, Mulders J, Visser A, Kersbergen P, Mobach D, Fonds D, van Berkel CG, Lemmers RJ, Frants RR, Oudejans CB, Schutgens RB, Pronk JC, van der Knaap MS (2001) Subunits of the translation initiation factor eIF2B are mutant in leukoencephalopathy with vanishing white matter. *Nat Genet* 29:383-388.

- van der Lei HDW, van Berkel CGM, van Wieringen WN, Brenner C, Feigenbaum A, Mercimek-Mahmutoglu S, Philippart M, Tatli B, Wassmer E, Scheper GC, van der Knaap MS (2010) Genotype-phenotype correlation in vanishing white matter disease. *Neurology* 75:1555-1559.
- Levison SW, Goldman JE (1993) Both oligodendrocytes and astrocytes develop from progenitors in the subventricular zone of postnatal rat forebrain. *Neuron* 10:201-212.
- Li C, Trapp B, Ludwin S, Peterson A, Roder J (1998) Myelin associated glycoprotein modulates glia-axon contact in vivo. *J Neurosci Res* 51:210-217.
- Li W, Wang X, Van Der Knaap MS, Proud CG (2004) Mutations linked to leukoencephalopathy with vanishing white matter impair the function of the eukaryotic initiation factor 2B complex in diverse ways. *Mol Cell Biol* 24:3295-3306.
- Li X-J, Du Z-W, Zarnowska ED, Pankratz M, Hansen LO, Pearce RA, Zhang S-C (2005) Specification of motoneurons from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 23:215-221.
- Liedtke W, Edelman W, Bieri PL, Chiu FC, Cowan NJ, Kucherlapati R, Raine CS (1996) GFAP is necessary for the integrity of CNS white matter architecture and long-term maintenance of myelination. *Neuron* 17:607-615.
- Liu AR, van der Lei HDW, Wang X, Wortham NC, Tang H, van Berkel CGM, Mufunde TA, Huang W, van der Knaap MS, Scheper GC, Proud CG (2011) Severity of Vanishing White Matter disease does not correlate with deficits in eIF2B activity or the integrity of eIF2B complexes. *Hum Mutat* Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21560189>.
- Liu S, Qu Y, Stewart TJ, Howard MJ, Chakraborty S, Holekamp TF, McDonald JW (2000) Embryonic stem cells differentiate into oligodendrocytes and myelinate in culture and after spinal cord transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:6126-6131.
- Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser CA, Darnell J (2005) *Biologie moléculaire de la cellule*. De Boeck Supérieur.
- Lu PD, Harding HP, Ron D (2004) Translation reinitiation at alternative open reading frames regulates gene expression in an integrated stress response. *J Cell Biol* 167:27-33.
- Lüllmann-Rauch R (2008) *Histologie*. De Boeck Supérieur.
- Maletkovic J et al. (2008) Genetic and clinical heterogeneity in eIF2B-related disorder. *J Child Neurol* 23:205-215.
- Malhotra JD, Kaufman RJ (2007) The endoplasmic reticulum and the unfolded protein response. *Semin Cell Dev Biol* 18:716-731.
- Maragakis NJ, Rothstein JD (2006) Mechanisms of Disease: astrocytes in neurodegenerative disease. *Nat Clin Pract Neurol* 2:679-689.
- Martin GR (1981) Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:7634-7638.

- Mathis S, Scheper GC, Baumann N, Petit E, Gil R, van der Knaap MS, Neau J-P (2008) The ovarioloekodystrophy. *Clin Neurol Neurosurg* 110:1035-1037.
- Matsui M, Mizutani K, Ohtake H, Miki Y, Ishizu K, Fukuyama H, Shimohata T, Onodera O, Nishizawa M, Takayama Y, Shibasaki H (2007) Novel mutation in EIF2B gene in a case of adult-onset leukoencephalopathy with vanishing white matter. *Eur Neurol* 57:57-58.
- Matsukawa T, Wang X, Liu R, Wortham NC, Onuki Y, Kubota A, Hida A, Kowa H, Fukuda Y, Ishiura H, Mitsui J, Takahashi Y, Aoki S, Takizawa S, Shimizu J, Goto J, Proud CG, Tsuji S (2011) Adult-onset leukoencephalopathies with vanishing white matter with novel missense mutations in EIF2B2, EIF2B3, and EIF2B5. *Neurogenetics* Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21484434>.
- Meyer-Franke A, Shen S, Barres BA (1999) Astrocytes induce oligodendrocyte processes to align with and adhere to axons. *Mol Cell Neurosci* 14:385-397.
- Mignot C, Boespflug-Tanguy O, Gelot A, Dautigny A, Pham-Dinh D, Rodriguez D (2004) Alexander disease: putative mechanisms of an astrocytic encephalopathy. *Cell Mol Life Sci* 61:369-385.
- Miller RH (2002) Regulation of oligodendrocyte development in the vertebrate CNS. *Prog Neurobiol* 67:451-467.
- Mitchell B, Alberti E-M, Sharma R (2005) *Embryologie*. Elsevier Masson.
- Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, Segawa K, Murakami M, Takahashi K, Maruyama M, Maeda M, Yamanaka S (2003) The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* 113:631-642.
- Mohammad-Qureshi SS, Jennings MD, Pavitt GD (2008) Clues to the mechanism of action of eIF2B, the guanine-nucleotide-exchange factor for translation initiation. *Biochem Soc Trans* 36:658-664.
- Motlekar N, de Almeida RA, Pavitt GD, Diamond SL, Napper AD (2009) Discovery of chemical modulators of a conserved translational control pathway by parallel screening in yeast. *Assay Drug Dev Technol* 7:479-494.
- Mueller PP, Hinnebusch AG (1986) Multiple upstream AUG codons mediate translational control of GCN4. *Cell* 45:201-207.
- Nag S (2011) Morphology and properties of astrocytes. *Methods Mol Biol* 686:69-100.
- Nguyen CH, Ming H, Zhao P, Hugendubler L, Gros R, Kimball SR, Chidiac P (2009) Translational control by RGS2. *J Cell Biol* 186:755-765.
- Nichols J, Zevnik B, Anastassiadis K, Niwa H, Klewe-Nebenius D, Chambers I, Schöler H, Smith A (1998) Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* 95:379-391.
- Niwa H (2007) How is pluripotency determined and maintained? *Development* 134:635-646.

- Niwa H, Miyazaki J, Smith AG (2000) Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet* 24:372-376.
- Ohlenbusch A, Henneke M, Brockmann K, Goerg M, Hanefeld F, Kohlschütter A, Gärtner J (2005) Identification of ten novel mutations in patients with eIF2B-related disorders. *Hum Mutat* 25:411.
- Ohtake H et al. (2004) Adult-onset leukoencephalopathy with vanishing white matter with a missense mutation in EIF2B5. *Neurology* 62:1601-1603.
- Okabe S, Forsberg-Nilsson K, Spiro AC, Segal M, McKay RD (1996) Development of neuronal precursor cells and functional postmitotic neurons from embryonic stem cells in vitro. *Mech Dev* 59:89-102.
- Okita K, Nakagawa M, Hyenjong H, Ichisaka T, Yamanaka S (2008) Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science* 322: 949-953.
- Pain VM (1996) Initiation of protein synthesis in eukaryotic cells. *Eur J Biochem* 236:747-771.
- Panatier, Robitaille (2007) Astrocytes and brain signalling. *Encyclopedia of life sciences*, Nature, Publishing Group, London.
- Pandol SJ, Gorelick FS, Lugea A (2011) Environmental and genetic stressors and the unfolded protein response in exocrine pancreatic function - a hypothesis. *Front Physiol* 2:8.
- Pap M, Cooper GM (2002) Role of translation initiation factor 2B in control of cell survival by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/glycogen synthase kinase 3beta signaling pathway. *Mol Cell Biol* 22:578-586.
- Park IH, Zhao R, West JA, Yabuuchi A, Huo H, Ince TA, Lerou PH, Lensch MW, Daley GQ (2008) Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature* 451: 141-147.
- Passemard S, Gelot A, Fogli A, N'Guyen S, Barnerias C, Niel F, Doummar D, Arbues AS, Mignot C, de Villemeur TB, Ponsot G, Boespflug-Tanguy O, Rodriguez D (2007) Progressive megalencephaly due to specific EIF2Bepsilon mutations in two unrelated families. *Neurology* 69:400-402.
- Pavitt GD, Ramaiah KV, Kimball SR, Hinnebusch AG (1998) eIF2 independently binds two distinct eIF2B subcomplexes that catalyze and regulate guanine-nucleotide exchange. *Genes Dev* 12:514-526.
- Pavitt GD, Yang W, Hinnebusch AG (1997) Homologous segments in three subunits of the guanine nucleotide exchange factor eIF2B mediate translational regulation by phosphorylation of eIF2. *Mol Cell Biol* 17:1298-1313.
- Pekny M, Pekna M (2004) Astrocyte intermediate filaments in CNS pathologies and regeneration. *J Pathol* 204:428-437.
- Perea G, Navarrete M, Araque A (2009) Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci* 32:421-431.

- Perng M-D, Wen S-F, Gibbon T, Middeldorp J, Sluijs J, Hol EM, Quinlan RA (2008) Glial fibrillary acidic protein filaments can tolerate the incorporation of assembly-compromised GFAP-delta, but with consequences for filament organization and alphaB-crystallin association. *Mol Biol Cell* 19:4521-4533.
- Peter L, Niel F, Catenoix H, Jung J, Demarquay G, Petiot P, Rudigoz RC, Boespflug-Tanguy O, Ryvlin P, Mauguère F (2008) Acute neurological deterioration in ovariokodystrophy related to EIF2B mutations: pregnancy with oocyte donation is a potentially precipitating factor. *Eur J Neurol* 15:94-97.
- Pineda M, R-Palmero A, Baquero M, O'Callaghan M, Aracil A, van der Knaap M, Scheper GC (2008) Vanishing white matter disease associated with progressive macrocephaly. *Neuropediatrics* 39:29-32.
- Price N, Proud C (1994) The guanine nucleotide-exchange factor, eIF-2B. *Biochimie* 76:748-760.
- Price NT, Kimball SR, Jefferson LS, Proud CG (1996a) Cloning of cDNA for the gamma-subunit of mammalian translation initiation factor 2B, the guanine nucleotide-exchange factor for eukaryotic initiation factor 2. *Biochem J* 318 (Pt 2):631-636.
- Price NT, Mellor H, Craddock BL, Flowers KM, Kimball SR, Wilmer T, Jefferson LS, Proud CG (1996b) eIF2B, the guanine nucleotide-exchange factor for eukaryotic initiation factor 2. Sequence conservation between the alpha, beta and delta subunits of eIF2B from mammals and yeast. *Biochem J* 318 (Pt 2):637-643.
- Pritchard TC, Alloway KD (2002) *Neurosciences médicales: les bases neuroanatomiques et neurophysiologiques*. De Boeck Supérieur.
- Proud CG (2005) eIF2 and the control of cell physiology. *Semin Cell Dev Biol* 16:3-12.
- Purves D (2005) *Neurosciences*. De Boeck Supérieur.
- Ramaswamy V, Chan AK, Kolski HK (2006) Vanishing white matter disease with periodic (paroxysmal) hemiparesis. *Pediatr Neurol* 35:65-68.
- Richardson JP, Mohammad SS, Pavitt GD (2004) Mutations causing childhood ataxia with central nervous system hypomyelination reduce eukaryotic initiation factor 2B complex formation and activity. *Mol Cell Biol* 24:2352-2363.
- Rodriguez D, Gelot A, della Gaspera B, Robain O, Ponsot G, Sarliève LL, Ghandour S, Pompidou A, Dautigny A, Aubourg P, Pham-Dinh D (1999) Increased density of oligodendrocytes in childhood ataxia with diffuse central hypomyelination (CACH) syndrome: neuropathological and biochemical study of two cases. *Acta Neuropathol* 97:469-480.
- Ron D (2002) Translational control in the endoplasmic reticulum stress response. *J Clin Invest* 110:1383-1388.
- Rudnicki MA, Reuhl KR, McBurney MW (1989) Cell lines with developmental potential restricted to mesodermal lineages isolated from differentiating cultures of pluripotential P19 embryonal carcinoma cells. *Development* 107:361-372.

- Sakakibara S, Imai T, Hamaguchi K, Okabe M, Aruga J, Nakajima K, Yasutomi D, Nagata T, Kurihara Y, Uesugi S, Miyata T, Ogawa M, Mikoshiba K, Okano H (1996) Mouse-Musashi-1, a neural RNA-binding protein highly enriched in the mammalian CNS stem cell. *Dev Biol* 176:230-242.
- Scheper GC, Proud CG, van der Knaap MS (2006) Defective translation initiation causes vanishing of cerebral white matter. *Trends Mol Med* 12:159-166.
- Scheper GC, Thomas AA, van Wijk R (1998) Inactivation of eukaryotic initiation factor 2B in vitro by heat shock. *Biochem J* 334 (Pt 2):463-467.
- Schiffmann R, Boespflug-Tanguy O (2001) An update on the leukodystrophies. *Curr Opin Neurol* 14:789-794.
- Schiffmann R, Moller JR, Trapp BD, Shih HH, Farrer RG, Katz DA, Alger JR, Parker CC, Hauer PE, Kaneski CR (1994) Childhood ataxia with diffuse central nervous system hypomyelination. *Ann Neurol* 35:331-340.
- Schiffmann R, Tedeschi G, Kinkel RP, Trapp BD, Frank JA, Kaneski CR, Brady RO, Barton NW, Nelson L, Yanovski JA (1997) Leukodystrophy in patients with ovarian dysgenesis. *Ann Neurol* 41:654-661.
- Schwenk F, Kuhn R, Angrand PO, Rajewsky K, Stewart AF (1998) Temporally and spatially regulated somatic mutagenesis in mice. *Nucleic Acids Res* 26:1427-1432.
- Sébille A, Vibert J-F, Boureau F, Mazières L (2011) *Neurophysiologie: De la physiologie à l'exploration fonctionnelle*. Elsevier Masson.
- Simons M, Trajkovic K (2006) Neuron-glia communication in the control of oligodendrocyte function and myelin biogenesis. *J Cell Sci* 119:4381-4389.
- Simons M, Trotter J (2007) Wrapping it up: the cell biology of myelination. *Curr Opin Neurobiol* 17:533-540.
- Smith AG (2001) Embryo-derived stem cells: of mice and men. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17:435-462.
- Sonenberg N, Dever TE (2003) Eukaryotic translation initiation factors and regulators. *Curr Opin Struct Biol* 13:56-63.
- Southwood CM, Garbern J, Jiang W, Gow A (2002) The unfolded protein response modulates disease severity in Pelizaeus-Merzbacher disease. *Neuron* 36:585-596.
- Stevens A, Lowe J (1997) *Histologie humaine*. De Boeck Supérieur.
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131:861-872.
- Takahashi K, Yamanaka S (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126: 663-676.

- Talbott JF, Loy DN, Liu Y, Qiu MS, Bunge MB, Rao MS, Whittemore SR (2005) Endogenous Nkx2.2+/Olig2+ oligodendrocyte precursor cells fail to remyelinate the demyelinated adult rat spinal cord in the absence of astrocytes. *Exp Neurol* 192:11-24.
- Trajkovic K, Dhaunchak AS, Goncalves JT, Wenzel D, Schneider A, Bunt G, Nave K-A, Simons M (2006) Neuron to glia signaling triggers myelin membrane exocytosis from endosomal storage sites. *J Cell Biol* 172:937-948.
- Tritsch D, Chesnoy-Marchais D, Feltz A (1999) *Physiologie du neurone*. Editions Doin.
- Tuckow AP, Vary TC, Kimball SR, Jefferson LS (2010) Ectopic expression of eIF2Bepsilon in rat skeletal muscle rescues the sepsis-induced reduction in guanine nucleotide exchange activity and protein synthesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 299:E241-248.
- Vallier L, Mancip J, Markossian S, Lukaszewicz A, Dehay C, Metzger D, Chambon P, Samarut J, Savatier P (2001) An efficient system for conditional gene expression in embryonic stem cells and in their in vitro and in vivo differentiated derivatives. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:2467-2472.
- Vanderver A, Hathout Y, Maletkovic J, Gordon ES, Mintz M, Timmons M, Hoffman EP, Horzinski L, Niel F, Fogli A, Boespflug-Tanguy O, Schiffmann R (2008) Sensitivity and specificity of decreased CSF asialotransferrin for eIF2B-related disorder. *Neurology* 70:2226-2232.
- Vanderver A, Schiffmann R, Timmons M, Kellersberger KA, Fabris D, Hoffman EP, Maletkovic J, Hathout Y (2005) Decreased asialotransferrin in cerebrospinal fluid of patients with childhood-onset ataxia and central nervous system hypomyelination/vanishing white matter disease. *Clin Chem* 51:2031-2042.
- Vargas CR, Wajner M, Sirtori LR, Goulart L, Chiochetta M, Coelho D, Latini A, Llesuy S, Bello-Klein A, Giugliani R, Deon M, Mello CF (2004) Evidence that oxidative stress is increased in patients with X-linked adrenoleukodystrophy. *Biochim Biophys Acta* 1688:26-32.
- Vattem KM, Wek RC (2004) Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:11269-11274.
- Vaurs-Barrière C, Deville M, Sarret C, Giraud G, Des Portes V, Prats-Viñas J-M, De Michele G, Dan B, Brady AF, Boespflug-Tanguy O, Touraine R (2009) Pelizaeus-Merzbacher-Like disease presentation of MCT8 mutated male subjects. *Ann Neurol* 65:114-118.
- Vermeulen G, Seidl R, Mercimek-Mahmutoglu S, Rotteveel JJ, Scheper GC, van der Knaap MS (2005) Fright is a provoking factor in vanishing white matter disease. *Ann Neurol* 57:560-563.
- van der Voorn JP, van Kollenburg B, Bertrand G, Van Haren K, Scheper GC, Powers JM, van der Knaap MS (2005) The unfolded protein response in vanishing white matter disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 64:770-775.

- Wang E, Cambi F (2009) Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins H and F regulate the proteolipid protein/DM20 ratio by recruiting U1 small nuclear ribonucleoprotein through a complex array of G runs. *J Biol Chem* 284:11194-11204.
- Wang E, Dimova N, Cambi F (2007) PLP/DM20 ratio is regulated by hnRNPH and F and a novel G-rich enhancer in oligodendrocytes. *Nucleic Acids Res* 35:4164-4178.
- Wang S, Sdrulla AD, diSibio G, Bush G, Nofziger D, Hicks C, Weinmaster G, Barres BA (1998) Notch receptor activation inhibits oligodendrocyte differentiation. *Neuron* 21:63-75.
- Wang X, Paulin FE, Campbell LE, Gomez E, O'Brien K, Morrice N, Proud CG (2001) Eukaryotic initiation factor 2B: identification of multiple phosphorylation sites in the epsilon-subunit and their functions in vivo. *EMBO J* 20:4349-4359.
- Welsh GI, Miyamoto S, Price NT, Safer B, Proud CG (1996) T-cell activation leads to rapid stimulation of translation initiation factor eIF2B and inactivation of glycogen synthase kinase-3. *J Biol Chem* 271:11410-11413.
- White R, Gonsior C, Krämer-Albers E-M, Stöhr N, Hüttelmaier S, Trotter J (2008) Activation of oligodendroglial Fyn kinase enhances translation of mRNAs transported in hnRNP A2-dependent RNA granules. *J Cell Biol* 181:579-586.
- Williams DD, Price NT, Loughlin AJ, Proud CG (2001) Characterization of the mammalian initiation factor eIF2B complex as a GDP dissociation stimulator protein. *J Biol Chem* 276:24697-24703.
- Wilson CJ, Pronk JC, Van der Knaap MS (2005) Vanishing white matter disease in a child presenting with ataxia. *J Paediatr Child Health* 41:65-67.
- Wong K, Armstrong RC, Gyure KA, Morrison AL, Rodriguez D, Matalon R, Johnson AB, Wollmann R, Gilbert E, Le TQ, Bradley CA, Crutchfield K, Schiffmann R (2000) Foamy cells with oligodendroglial phenotype in childhood ataxia with diffuse central nervous system hypomyelination syndrome. *Acta Neuropathol* 100:635-646.
- Woods YL, Cohen P, Becker W, Jakes R, Goedert M, Wang X, Proud CG (2001) The kinase DYRK phosphorylates protein-synthesis initiation factor eIF2Bepsilon at Ser539 and the microtubule-associated protein tau at Thr212: potential role for DYRK as a glycogen synthase kinase 3-priming kinase. *Biochem J* 355:609-615.
- Wu Y, Pan Y, Du L, Wang J, Gu Q, Gao Z, Li J, Leng X, Qin J, Wu X, Jiang Y (2009) Identification of novel EIF2B mutations in Chinese patients with vanishing white matter disease. *J Hum Genet* 54:74-77.
- Yu J, Hu K, Smuga-Otto K, Tian S, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA (2009) Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science* 8: 797-801.
- Zara F, Biancheri R, Bruno C, Bordo L, Assereto S, Gazzerò E, Sotgia F, Wang XB, Gianotti S, Stringara S, Pedemonte M, Uziel G, Rossi A, Schenone A, Tortori-Donati P, van der Knaap MS, Lisanti MP, Minetti C (2006) Deficiency of hyccin, a newly identified membrane protein, causes hypomyelination and congenital cataract. *Nat Genet* 38:1111-1113.

- Zearfoss NR, Clingman CC, Farley BM, McCoig LM, Ryder SP (2011) Quaking regulates Hnrnpa1 expression through its 3' UTR in oligodendrocyte precursor cells. *PLoS Genet* 7:e1001269.
- Zhou Q, Anderson DJ (2002) The bHLH transcription factors OLIG2 and OLIG1 couple neuronal and glial subtype specification. *Cell* 109:61-73.
- Zhou Q, Choi G, Anderson DJ (2001) The bHLH transcription factor Olig2 promotes oligodendrocyte differentiation in collaboration with Nkx2.2. *Neuron* 31:791-807.
- Zhou Q, Wang S, Anderson DJ (2000) Identification of a novel family of oligodendrocyte lineage-specific basic helix-loop-helix transcription factors. *Neuron* 25:331-343.

ANNEXES

ANNEXE 1

Mutations des cinq gènes codant le facteur eIF2B décrites.

Mutations (ADN)	Mutations (protéine)	Gène	Nombre	Source
c.547G>T/c.547G>T	p.Val183Phe/p.Val183Phe	<i>EIF2B1</i>	2	1
c.IVS2G>A/c.622A>T	S84ins22st/p.Asn208Tyr	<i>EIF2B1</i>	1	2
c.610del3/c.824A>G	p.Gly204del1/p.Tyr275Cys	<i>EIF2B1</i>	1	3
c.512C>T/c.599G>T	p.Ser171Phe/p.Gly200Val	<i>EIF2B2</i>	1	1
c.586C>T/c.638A>G	p.Pro196Ser/p.Glu213Gly	<i>EIF2B2</i>	1	1
c.512C>T/c.607del15insTG	p.Ser171Phe/p.Met203fs	<i>EIF2B2</i>	1	4
c.547C>T/c.638A>G	p.Arg183st/p.Glu213Gly	<i>EIF2B2</i>	1	4
c.599G>C/c.638A>G	p.Gly200Ala/p.Glu213Gly	<i>EIF2B2</i>	1	5
c.638A>G /c.818A>G	p.Glu213Gly/p.Lys273Arg	<i>EIF2B2</i>	2	5
c.638A>G/c.910G>T	p.Glu213Gly/p.Glu304st	<i>EIF2B2</i>	2	5
c.599G>T/c.871C>T	p.Gly200Val/p.Pro291Ser	<i>EIF2B2</i>	4	3, 6
c.548del/c.818A>G	p.Arg183fs/p.Lys273Arg	<i>EIF2B2</i>	1	7
c.607-612delinsTG/c.986G>T	p.Met203Trpfs/p.Gly329Val	<i>EIF2B2</i>	2	1, 7
c.947T>A/c.638A>G	p.Val316Asp/p.Glu213Gly	<i>EIF2B2</i>	1	7
c.638A>G/c.638A>G	p.Glu213Gly/p.Glu213Gly	<i>EIF2B2</i>	12	1, 5, 7
c.375T>A/c.375T>A	p.Val85Glu/p.Val85Glu	<i>EIF2B2</i>	1	8
c.674G>A/c.674G>A	p.Arg225Gln/p.Arg225Gln	<i>EIF2B3</i>	4	1, 3, 9
c.776G>A/c.1295_1296delTG	p.Arg225Gln/p.Val398fs	<i>EIF2B3</i>	1	2
c.362C>T/c.362C>T	p.Ala87Val/p.Ala87Val	<i>EIF2B3</i>	1	2
c.687T>G/c.1118C>T	p.Ile229Met/p.Ser373Leu	<i>EIF2B3</i>	1	3
c.32G>T/c.32G>T	p.Gly11Val/p.Gly11Val	<i>EIF2B3</i>	1	3
c.407A>C/c.407A>C	p.Gln136Pro/p.Gln136Pro	<i>EIF2B3</i>	1	5
c.1023T>G/c.1023T>G	p.His341Gln/p.His341Gln	<i>EIF2B3</i>	1	5
c.80T>A/c.80T>A	p.Leu27Gln/p.Leu27Gln	<i>EIF2B3</i>	1	8
c.140G>A/c.1037T>C	p.Gly47Glu/p.Ile346Thr	<i>EIF2B3</i>	1	9
c.1037T>C/c.1037T>C	p.Ile346Thr/p.Ile346Thr	<i>EIF2B3</i>	2	9
/c.362C>T	p.Ser14Phe/p.Ala87Val	<i>EIF2B3</i>	1	10
c.625C>T/c.626G>A	p.Ala202Thr/p.Arg438st	<i>EIF2B3</i>	1	10
c.806T>G/c.1120C>T	p.Arg209st/p.Arg209Gln	<i>EIF2B4</i>	1	1
c.IVS11+1G>A/c.702C>T	p.Leu269Arg/p.Arg374Cys	<i>EIF2B4</i>	1	1
c.1089G>A/c.1139C>T	p.Glu397ins11/p.Ala228Val	<i>EIF2B4</i>	1	2
c.1399C>T/c.1399C>T	p.Arg357Gln/p.Arg374Cys	<i>EIF2B4</i>	1	2
c.1393T>C/c.1465T>C	p.Arg467Trp/p.Arg467Trp	<i>EIF2B4</i>	1	3
c.1120C>T/c.1120C>T	p.Cys465Arg/p.Tyr489His	<i>EIF2B4</i>	2	4
c.1120C>T/c.1465T>C	p.Arg374Cys/p.Arg374Cys	<i>EIF2B4</i>	2	3, 5
c.728C>T/c.728C>T	p.Arg374Cys/p.Tyr489His	<i>EIF2B4</i>	1	5
c.626G>A/c.626G>A	p.Pro243Leu/p.Pro243Leu	<i>EIF2B4</i>	4	5
c.1069C>T/c.1069C>T	p.Arg209Gln/p.Arg209Gln	<i>EIF2B4</i>	2	5
c.1172C>A/c.1172C>A	p.Arg357Trp/p.Arg357Trp	<i>EIF2B4</i>	1	5
c.1447C>T/c.1447C>T	p.Ala391Asp/p.Ala391Asp	<i>EIF2B4</i>	1	6
c.203T>C/c.453_454del	p.Arg483Trp/p.Arg483Trp	<i>EIF2B4</i>	2	6
c.220G>A/c.1003T>C	p.Leu68Ser/p.Tyr152fs	<i>EIF2B5</i>	1	1
c.338G>A/c.929G>T	p.Ala74Thr/p.Cys335Arg	<i>EIF2B5</i>	1	1
	p.Arg113His/p.Cys310Phe	<i>EIF2B5</i>	1	1

c.805C>G/c.805C>G	p.Arg269Gly/p.Arg269Gly	EIF2B5	1	1
c.935A>G/c.338G>A	p.Asp312Gly/p.Arg113His	EIF2B5	1	3
c.952G>A/c.338G>A	p.Val318Ile/p.Arg113His	EIF2B5	1	3
c.233A>C/c.911A>C	p.Tyr78Ser/p.His304Pro	EIF2B5	1	3
c.338G>A/c.583C>T	p.Arg113His/p.Arg195Cys	EIF2B5	1	5
c.161G>C/c.337C>T	p.Arg54Pro/p.Arg113Cys	EIF2B5	1	5
c.338G>A/c.584G>A	p.Arg113His/p.Arg195His	EIF2B5	2	5
c.338G>A/c.G1444ins17	p.Arg113His/p.Gly481fs493st	EIF2B5	1	5
c.338G>A/c.1264C>T	p.Arg113His/p.Arg422st	EIF2B5	1	5
c.338G>A/c.1016G>C	p.Arg113His/p.Arg339Pro	EIF2B5	1	5
c.592G>A/c.1996del21	p.Glu198Lys/p.664del7	EIF2B5	1	5
c.943C>T/c.271A>G	p.Arg315Cys/p.Thr91Ala	EIF2B5	1	5
c.338G>A/c.1884G>A	p.Arg113His/p.Trp628st	EIF2B5	1	5
c.338G>A/c.967C>T	p.Arg113His/p.Pro323Ser	EIF2B5	1	5
c.406C>T/c.1015C>T	p.Arg136Cys/p.Arg339Trp	EIF2B5	1	5
c.338G>A/c.1948G>A	p.Arg113His/p.Glu650Leu	EIF2B5	2	5
c.338G>A/c.1160A>G	p.Arg113His/p.Asp387Gly	EIF2B5	2	5
c.338G>A/c.1274T>G	p.Arg113His/p.Leu425Arg	EIF2B5	1	5
c.967C>T/c.1280C>T	p.Pro323Ser/p.Pro427Leu	EIF2B5	1	5
c.241G>A/c.338G>A	p.Glu81Lys/p.Arg113His	EIF2B5	4	3, 5
c.1016G>A/c.338G>A	p.Arg339Gln/p.Arg113His	EIF2B5	2	3, 7
c.338G>A/c.338G>A	p.Arg113His/p.Arg113His	EIF2B5	41	3, 5, 7, 10, 15-21
c.218T>G/c.338G>A	p.Val73Gly/p.Arg113His	EIF2B5	4	5, 7
c.271A>G/c.1015C>T	p.Thr91Ala/p.Arg339Trp	EIF2B5	5	5, 7
c.338G>A/c.806G>T	p.Arg113His/p.Arg269Lys	EIF2B5	2	5, 11
c.1028A>G/c.1153A>G	p.Tyr343Cys/p.Ile385Val	EIF2B5	3	5, 11
c.47C>A/c.338G>A	p.Ala16Asp/p.Arg113His	EIF2B5	2	5, 22
c.338G>A/c.1015C>T	p.Arg113His/p.Arg339Trp	EIF2B5	2	5, 22
c.166T>G/c.944G>A	p.Phe56Val/p.Arg315His	EIF2B5	4	5, 23
c.584G>A/c.584G>A	p.Arg195His/p.Arg195His	EIF2B5	4	5, 25
c.1484A>G/c.1484A>G	p.Tyr495Cys/p.Tyr495Cys	EIF2B5	1	6
c.1289T>C/c.1340C>T	p.Val430Arg/p.Tyr495Cys	EIF2B5	1	6
c.1015C>T/c.338G>A	p.Arg339Trp/p.Arg113His	EIF2B5	1	7
c.1264C>T/c.338G>A	p.Arg422st/p.Arg113His	EIF2B5	1	7
c.1389T>C/c.338G>A	p.Val430Ala/p.Arg113His	EIF2B5	1	7
c.1948G>A/c.338G>A	p.Glu650Lys/p.Arg113His	EIF2B5	1	7
c.892delTinsACA/c.338G>A	p.Phe264fs/p.Arg113His	EIF2B5	2	7
c.1157G>T/c.338G>A	p.Gly386Val/p.Arg113His	EIF2B5	2	7
c.1016G>C/c.271A>G	p.Arg339Pro/p.Thr91Ala	EIF2B5	3	7
c.1882T>C/c.271A>G	p.Trp628Arg/p.Thr91Ala	EIF2B5	1	7
c.318A>T/c.944G>A	p.Leu106Phe/p.Arg315His	EIF2B5	1	7
c.943C>G/c.943C>G	p.Arg315Gly/p.Arg315Gly	EIF2B5	2	7, 9
c.895G>A/c.338G>A	p.Arg299His/p.Arg113His	EIF2B5	3	7, 13
c.271A>G/c.271A>G	p.Thr91Ala/p.Thr91Ala	EIF2B5	8	7, 14
c.808G>C/c.808G>C	p.Asp270His/p.Asp270His	EIF2B5	1	8
c.337C>T/c.806G>A	p.Arg113Cys/p.Arg269Gln	EIF2B5	1	9
c.1126A>G/c.1340C>T	p.Asn376Asp/p.Ser447Leu	EIF2B5	1	9
c.805C>T/c.1004G>C	p.Arg269st/p.Cys335Ser	EIF2B5	1	9

c.185A>T/c.1016G>C	p.Asp62Val/p.Arg339Pro	<i>EIF2B5</i>	1	9
c.1157G>T/c.1827-1838del	p.Gly386Val/p.Ser610Asp613del	<i>EIF2B5</i>	1	9
c.338G>A/c.943C>T	p.Arg113His/p.Arg315Cys	<i>EIF2B5</i>	1	10
c.338G>A/c.664C>T	p.Arg113His/p.Arg222Trp	<i>EIF2B5</i>	1	10
c.338G>A/c.1280C>T	p.Arg113His/p.Pro427Leu	<i>EIF2B5</i>	1	10
c.1448C>A/c.584G>A	p.Tyr483Cys/p.Arg195His	<i>EIF2B5</i>	1	10
c.338G>A/c.2081delG	p.Arg113His/?	<i>EIF2B5</i>	1	10
c.1280C>T/c.1280C>T	p.Pro427Leu/p.Pro427Leu	<i>EIF2B5</i>	1	10
c.338G>A/c.318A>T	p.Arg113His/p.Leu106Phe	<i>EIF2B5</i>	1	10
c.641A>G/c.805C>T	p.His214Arg/p.Arg269st	<i>EIF2B5</i>	1	10
c.407G>A/c.407G>A	p.Arg136His/p.Arg136His	<i>EIF2B5</i>	2	10, 22
c.1399C>T/c.1399C>T	p.Arg466Trp/p.Arg466Trp	<i>EIF2B4</i>	1	11
c.338G>A/c.805C>T	p.Arg113His/p.Arg269st	<i>EIF2B5</i>	1	11
c.545C>T/c.545C>T	p.Thr182Met/p.Thr182Met	<i>EIF2B5</i>	1	12
c.338G>A/c.895G>A	p.Arg113His/p.Arg299His	<i>EIF2B5</i>	1	13
c.331T>C/c.1360C>T	p.Trp111Arg/p.Pro454Ser	<i>EIF2B5</i>	1	14
c.1448C>A/c.584G>A	p.Tyr483Cys/p.Arg195His	<i>EIF2B5</i>	1	21
c.743A>T/c.743A>T	p.His248Leu/p.His248Leu	<i>EIF2B5</i>	1	21
c.925G>C/c.925G>C	p.Val309Leu/p.Val309Leu	<i>EIF2B5</i>	2	24
c.338G>A/c.766-1G>A	p.Arg113His/p.256-281del	<i>EIF2B5</i>	1	26
c.203T>C/c.806G>A	p.Leu68Ser/p.Arg269Gln	<i>EIF2B5</i>	1	27
c.1459G>A/c.1459G>A	p.Glu487Ala/p.Glu487Ala	<i>EIF2B5</i>	1	28
c.338G>A/c.468G>C	p.Arg113His/p.Ile156Met	<i>EIF2B5</i>	1	29
c.338G>A/c.1813delC	p.Arg113His/?	<i>EIF2B5</i>	1	30
c.338G>A/?	p.Arg113His/p.Met608Ile	<i>EIF2B5</i>	1	31
c.338G>A/c.1810C>T	p.Arg113His/p.Pro604Ser	<i>EIF2B5</i>	1	32

Fs: mutation frameshift (décalage du cadre de lecture)

insx : insertion de x acides aminés

st : codon stop

delx : délétion de x nucléotides

Publications :

- 1- (Ohlenbusch et al., 2005)
- 2- (van der Knaap et al., 2002)
- 3- (Maletkovic et al., 2008)
- 4- (Fogli et al., 2003b)
- 5- (Fogli et al., 2004a)
- 6- (van der Knaap et al., 2003)
- 7- (Leegwater et al., 2001)
- 8- (Matsukawa et al., 2011)
- 9- (Wu et al., 2009)
- 10- (Horzinski et al., 2009)
- 11- (Vanderver et al., 2008)
- 12- (Ohtake et al., 2004)
- 13- (Peter et al., 2008)
- 14- (Vermeulen et al., 2005)
- 15- (van der Knaap et al., 2004)
- 16- (Ramaswamy et al., 2006)

- 17- (Denier et al., 2007)
- 18- (Mathis et al., 2008)
- 19- (Damon-Perriere et al., 2008)
- 20- (Jansen et al., 2008)
- 21- (Labauge et al., 2009)
- 22- (Kantor et al., 2005)
- 23- (Passemar et al., 2007)
- 24- (Fogli et al., 2002b)
- 25- (Huntsman et al., 2007)
- 26- (Horzinski et al., 2008)
- 27- (Federico et al., 2006)
- 28- (Matsui et al., 2007)
- 29- (Pineda et al., 2008)
- 30- (Wilson et al., 2005)
- 31- (Fontenelle et al., 2008)
- 32- (Kaczorowska et al., 2006)

ANNEXE 2

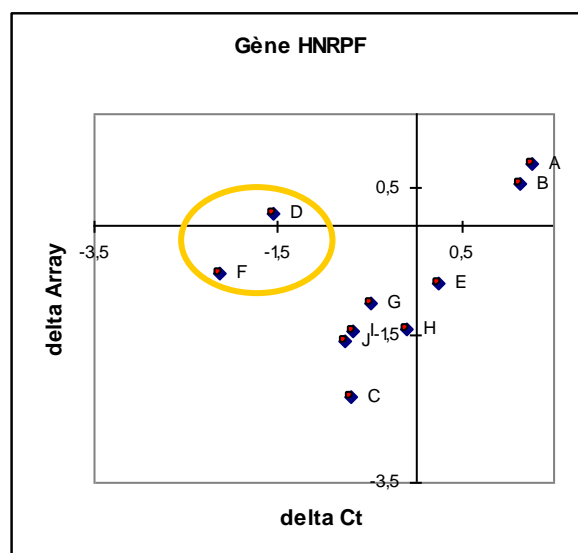
Analyse de corrélation entre les données de l'étude transcriptomique et de QRT-PCR pour 10 gènes sélectionnés.

Tables et figures des calculs de corrélation entre les données de l'étude transcriptomique (log des ratios d'intensité) et QRT-PCR (valeur $\Delta\Delta Ct$) pour 10 gènes sélectionnés différemment exprimés entre patients atteints d'eIF2B-pathie et contrôles. **A à J** : Corrélation à partir des 10 couples patient atteint d'eIF2B-pathie/contrôle. Les couples D et F présentant un défaut de corrélation pour la majorité des gènes testés (en jaune). **K à T** : Corrélation à partir de 8 couples (couples D et F enlevés) patient atteint d'eIF2B-pathie/contrôle. Une corrélation significative ($p\text{-value} \leq 0,05$) est retrouvée pour 6 des 10 gènes testés (**K à Q**).

A.

Gène
HNRPF

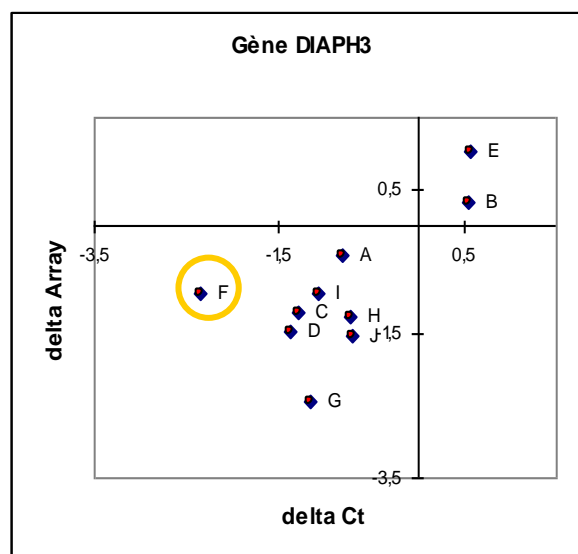
Patient	Contrôle	Couple	delta Ct	delta Array	R	p-value
432-2	1596-1	A	1,26	0,83	0,43	0,21
590-2	1178-2	B	1,13	0,55		
393-1	1540-1	C	-0,70	-2,34		
393-2	1541-1	D	-1,55	0,16		
291-1	1530-1	E	0,25	-0,81		
431-1	1178-1	F	-2,14	-0,67		
375-1	1545-1	G	-0,49	-1,06		
894-1	1538-1	H	-0,11	-1,41		
894-2	1539-1	I	-0,69	-1,43		
1036-1	1537-1	J	-0,77	-1,57		



B.

Gène
DIAPH3

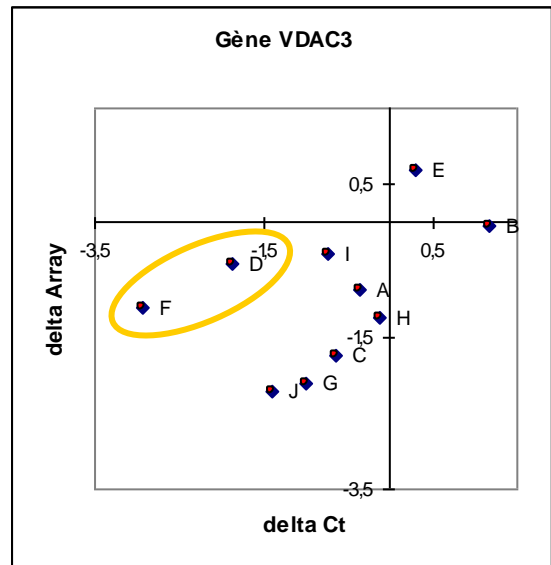
Patient	Contrôle	Couple	delta Ct	delta Array	R	p-value
432-2	1596-1	A	-0,82	-0,41	0,68	0,02
590-2	1178-2	B	0,55	0,32		
393-1	1540-1	C	-1,29	-1,22		
393-2	1541-1	D	-1,39	-1,48		
291-1	1530-1	E	0,57	1,03		
431-1	1178-1	F	-2,35	-0,93		
375-1	1545-1	G	-1,17	-2,45		
894-1	1538-1	H	-0,72	-1,28		
894-2	1539-1	I	-1,08	-0,94		
1036-1	1537-1	J	-0,71	-1,52		



C.

Gène
VDAC3

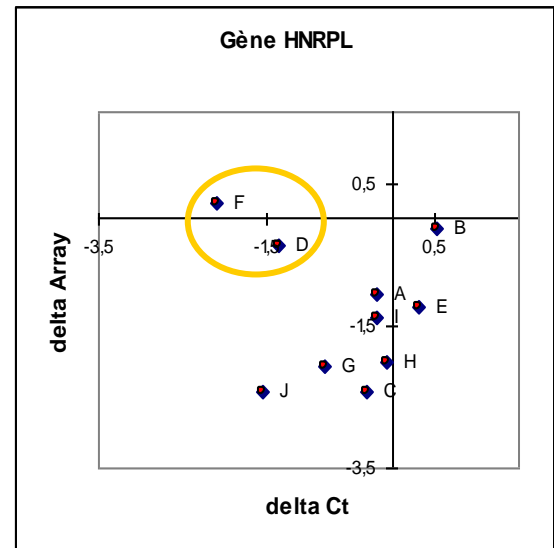
Patient	Contrôle	Couple	delta Ct	delta Array	R	p-value
432-2	1596-1	A	-0,36	-0,88	0,45	0,2
590-2	1178-2	B	1,16	-0,05		
393-1	1540-1	C	-0,65	-1,74		
393-2	1541-1	D	-1,88	-0,53		
291-1	1530-1	E	0,30	0,68		
431-1	1178-1	F	-2,93	-1,12		
375-1	1545-1	G	-1,00	-2,11		
894-1	1538-1	H	-0,14	-1,25		
894-2	1539-1	I	-0,75	-0,42		
1036-1	1537-1	J	-1,39	-2,22		



D.

Gène
HNRPL

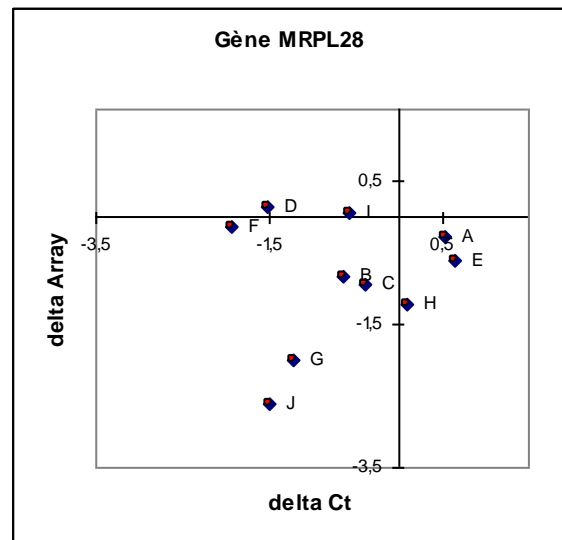
Patient	Contrôle	Couple	delta Ct	delta Array	R	p-value
432-2	1596-1	A	-0,19	-1,05	-0,14	0,7
590-2	1178-2	B	0,52	-0,15		
393-1	1540-1	C	-0,30	-2,44		
393-2	1541-1	D	-1,35	-0,36		
291-1	1530-1	E	0,32	-1,22		
431-1	1178-1	F	-2,08	0,21		
375-1	1545-1	G	-0,81	-2,06		
894-1	1538-1	H	-0,06	-2,02		
894-2	1539-1	I	-0,20	-1,39		
1036-1	1537-1	J	-1,55	-2,42		



E.

Gène
MRPL28

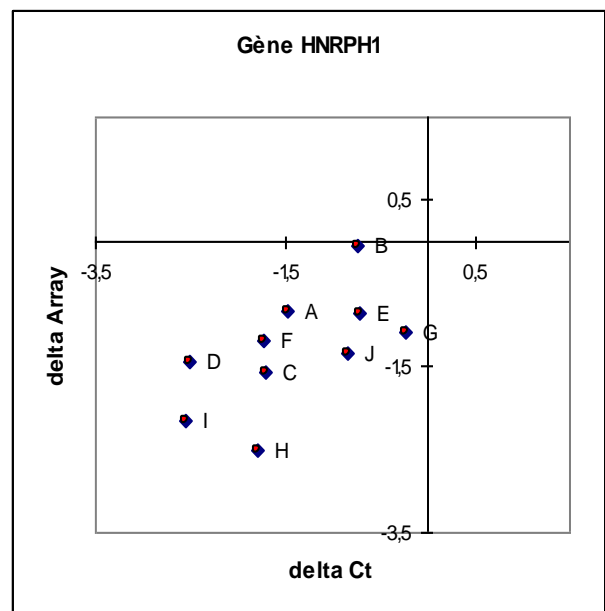
Patient	Contrôle	Couple	delta Ct	delta Array	R	p-value
432-2	1596-1	A	0,52	-0,27	0,16	0,66
590-2	1178-2	B	-0,65	-0,83		
393-1	1540-1	C	-0,39	-0,95		
393-2	1541-1	D	-1,51	0,15		
291-1	1530-1	E	0,66	-0,60		
431-1	1178-1	F	-1,94	-0,13		
375-1	1545-1	G	-1,22	-2,01		
894-1	1538-1	H	0,10	-1,22		
894-2	1539-1	I	-0,57	0,04		
1036-1	1537-1	J	-1,49	-2,60		



F.

Gène
HNRPH1

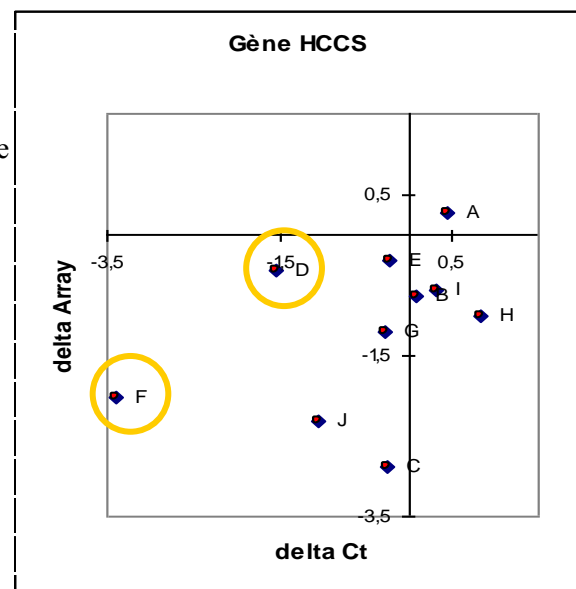
Patient	Contrôle	Couple	delta Ct	delta Array	R	p-value
432-2	1596-1	A	-1,49	-0,82	0,61	0,06
590-2	1178-2	B	-0,74	-0,06		
393-1	1540-1	C	-1,71	-1,56		
393-2	1541-1	D	-2,51	-1,43		
291-1	1530-1	E	-0,71	-0,85		
431-1	1178-1	F	-1,72	-1,19		
375-1	1545-1	G	-0,23	-1,09		
894-1	1538-1	H	-1,80	-2,51		
894-2	1539-1	I	-2,54	-2,17		
1036-1	1537-1	J	-0,85	-1,34		



G.

Gène
HCCS

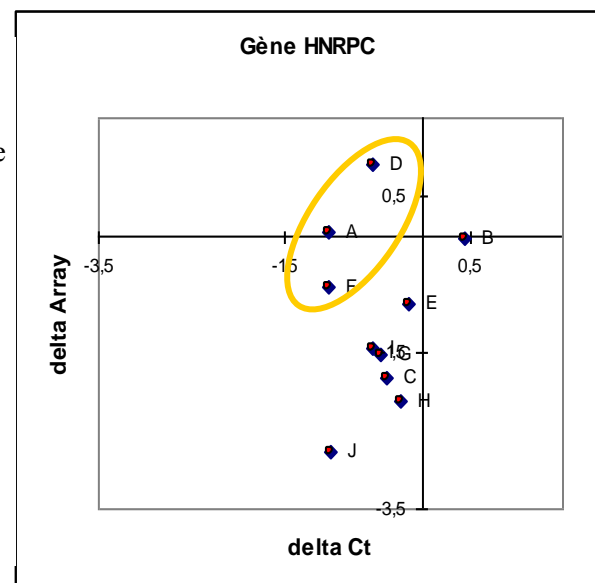
Patient	Contrôle	Couple	delta Ct	delta Array	R	p-value
432-2	1596-1	A	0,44	0,28	0,40	0,25
590-2	1178-2	B	0,08	-0,77		
393-1	1540-1	C	-0,25	-2,88		
393-2	1541-1	D	-1,55	-0,45		
291-1	1530-1	E	-0,22	-0,32		
431-1	1178-1	F	-3,40	-2,03		
375-1	1545-1	G	-0,28	-1,20		
894-1	1538-1	H	0,84	-1,02		
894-2	1539-1	I	0,30	-0,70		
1036-1	1537-1	J	-1,05	-2,31		



H.

Gène
HNRPC

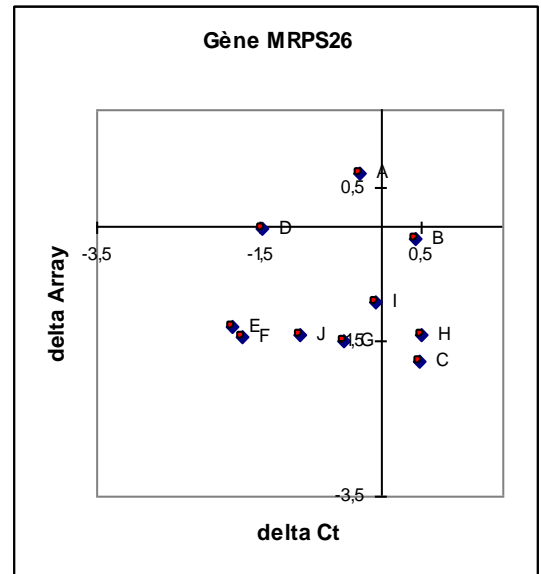
Patient	Contrôle	Couple	delta Ct	delta Array	R	p-value
432-2	1596-1	A	-1,02	0,04	0,14	0,69
590-2	1178-2	B	0,44	-0,05		
393-1	1540-1	C	-0,40	-1,84		
393-2	1541-1	D	-0,54	0,89		
291-1	1530-1	E	-0,17	-0,87		
431-1	1178-1	F	-1,02	-0,66		
375-1	1545-1	G	-0,46	-1,53		
894-1	1538-1	H	-0,25	-2,12		
894-2	1539-1	I	-0,56	-1,45		
1036-1	1537-1	J	-0,99	-2,77		



I.

Gène
MRPS26

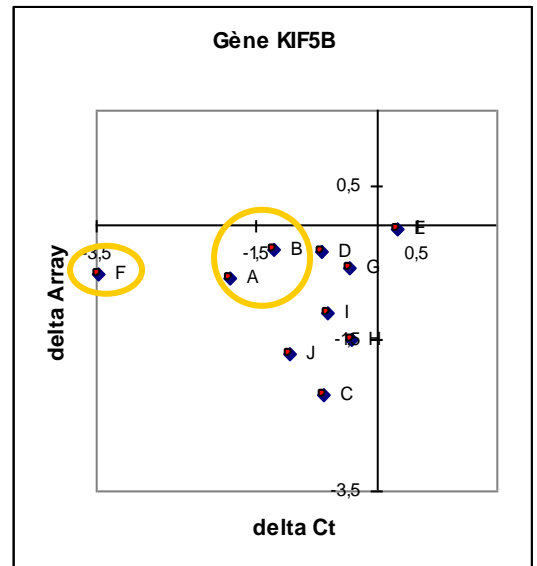
Patient	Contrôle	Couple	delta Ct	delta Array	R	p-value
432-2	1596-1	A	-0,27	0,67	0,04	0,9
590-2	1178-2	B	0,41	-0,16		
393-1	1540-1	C	0,46	-1,76		
393-2	1541-1	D	-1,46	-0,04		
291-1	1530-1	E	-1,84	-1,31		
431-1	1178-1	F	-1,71	-1,44		
375-1	1545-1	G	-0,47	-1,49		
894-1	1538-1	H	0,49	-1,41		
894-2	1539-1	I	-0,07	-0,99		
1036-1	1537-1	J	-0,99	-1,40		



J.

Gène
KIF5B

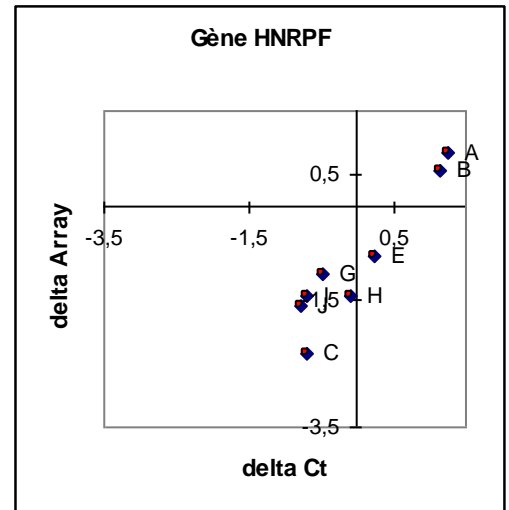
Patient	Contrôle	Couple	delta Ct	delta Array	R	p-value
432-2	1596-1	A	-1,84	-0,70	-0,06	0,87
590-2	1178-2	B	-1,29	-0,33		
393-1	1540-1	C	-0,66	-2,25		
393-2	1541-1	D	-0,69	-0,35		
291-1	1530-1	E	0,25	-0,05		
431-1	1178-1	F	-3,47	-0,65		
375-1	1545-1	G	-0,33	-0,58		
894-1	1538-1	H	-0,33	-1,51		
894-2	1539-1	I	-0,61	-1,15		
1036-1	1537-1	J	-1,10	-1,71		



K.

Gène
HNRPF

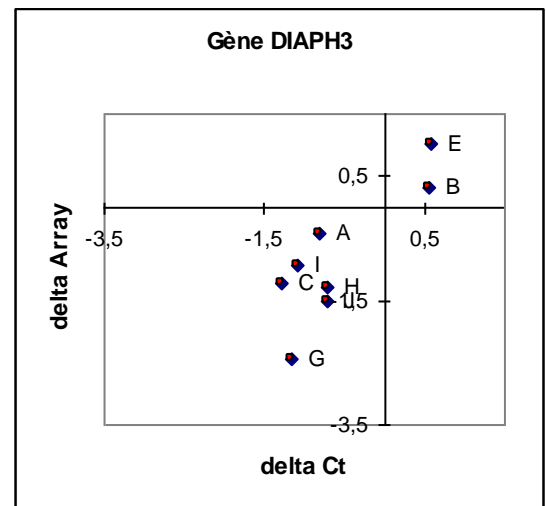
Patient	Contrôle	Couple	delta Ct	delta Array	R	p-value
432-2	1596-1	A	1,26	0,83	0,94	0,0005
590-2	1178-2	B	1,13	0,55		
393-1	1540-1	C	-0,70	-2,34		
291-1	1530-1	E	0,25	-0,81		
375-1	1545-1	G	-0,49	-1,06		
894-1	1538-1	H	-0,11	-1,41		
894-2	1539-1	I	-0,69	-1,43		
1036-1	1537-1	J	-0,77	-1,57		



L.

Gène
DIAPH3

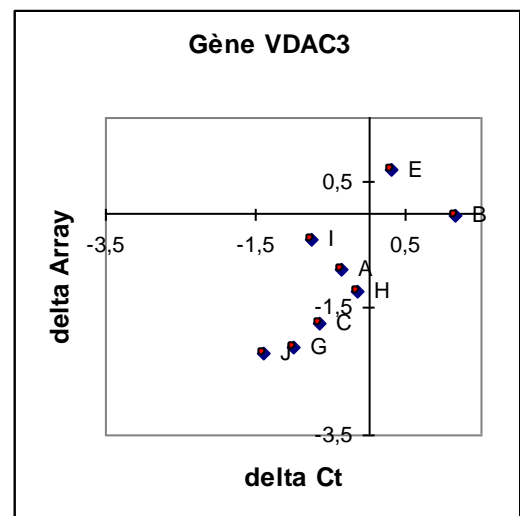
Patient	Contrôle	Couple	delta Ct	delta Array	R	p-value
432-2	1596-1	A	-0,82	-0,41	0,84	0,008
590-2	1178-2	B	0,55	0,32		
393-1	1540-1	C	-1,29	-1,22		
291-1	1530-1	E	0,57	1,03		
375-1	1545-1	G	-1,17	-2,45		
894-1	1538-1	H	-0,72	-1,28		
894-2	1539-1	I	-1,08	-0,94		
1036-1	1537-1	J	-0,71	-1,52		



M.

Gène
VDAC3

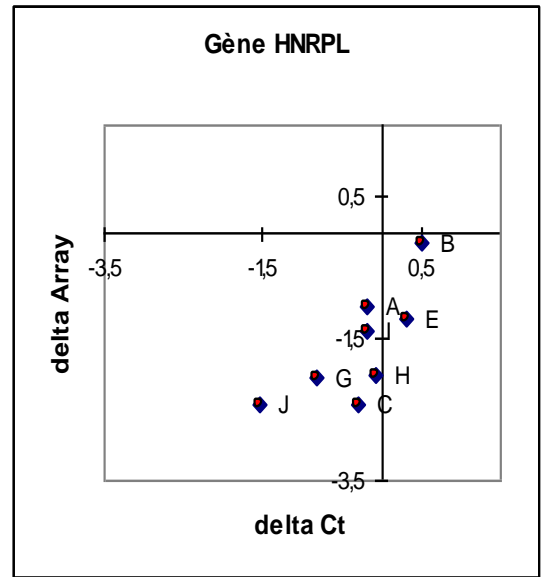
Patient	Contrôle	Couple	delta Ct	delta Array	R	p-value
432-2	1596-1	A	-0,36	-0,88	0,77	0,02
590-2	1178-2	B	1,16	-0,05		
393-1	1540-1	C	-0,65	-1,74		
291-1	1530-1	E	0,30	0,68		
375-1	1545-1	G	-1,00	-2,11		
894-1	1538-1	H	-0,14	-1,25		
894-2	1539-1	I	-0,75	-0,42		
1036-1	1537-1	J	-1,39	-2,22		



N.

Gène
HNRPL

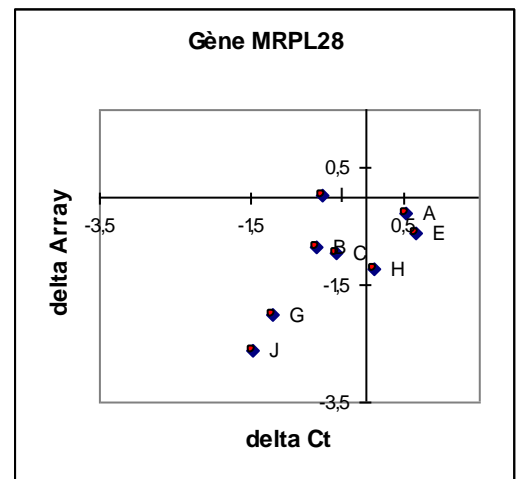
Patient	Contrôle	Couple	delta Ct	delta Array	R	p-value
432-2	1596-1	A	-0,19	-1,05	0,74	0,03
590-2	1178-2	B	0,52	-0,15		
393-1	1540-1	C	-0,30	-2,44		
291-1	1530-1	E	0,32	-1,22		
375-1	1545-1	G	-0,81	-2,06		
894-1	1538-1	H	-0,06	-2,02		
894-2	1539-1	I	-0,20	-1,39		
1036-1	1537-1	J	-1,55	-2,42		



O.

Gène
MRPL28

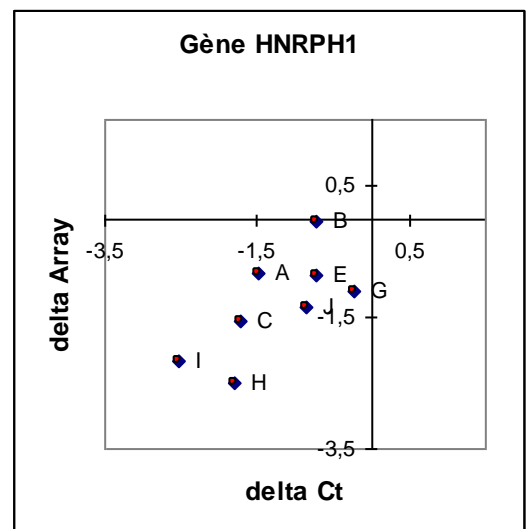
Patient	Contrôle	Couple	delta Ct	delta Array	R	p-value
432-2	1596-1	A	0,52	-0,27	0,71	0,05
590-2	1178-2	B	-0,65	-0,83		
393-1	1540-1	C	-0,39	-0,95		
291-1	1530-1	E	0,66	-0,60		
375-1	1545-1	G	-1,22	-2,01		
894-1	1538-1	H	0,10	-1,22		
894-2	1539-1	I	-0,57	0,04		
1036-1	1537-1	J	-1,49	-2,60		



P.

Gène
HNRPH1

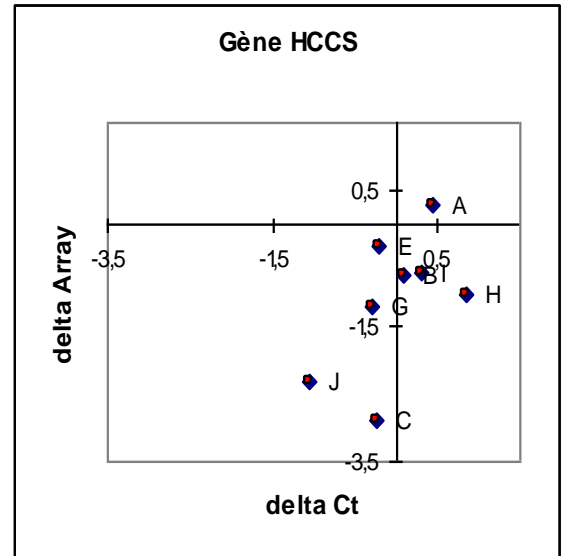
Patient	Contrôle	Couple	delta Ct	delta Array	R	p-value
432-2	1596-1	A	-1,49	-0,82	0,69	0,05
590-2	1178-2	B	-0,74	-0,06		
393-1	1540-1	C	-1,71	-1,56		
291-1	1530-1	E	-0,71	-0,85		
375-1	1545-1	G	-0,23	-1,09		
894-1	1538-1	H	-1,80	-2,51		
894-2	1539-1	I	-2,54	-2,17		
1036-1	1537-1	J	-0,85	-1,34		



Q.

Gène
HCCS

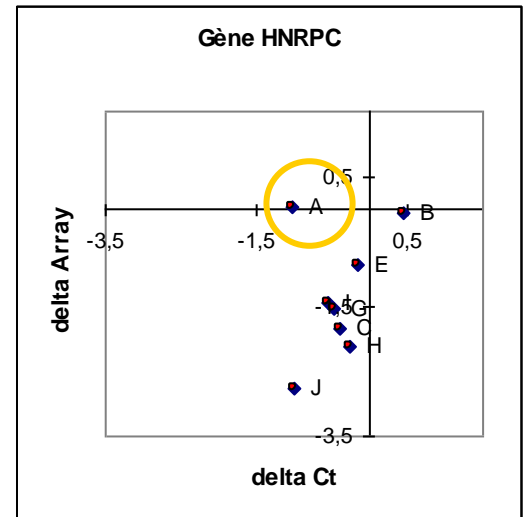
Patient	Contrôle	Couple	delta Ct	delta Array	R	p-value
432-2	1596-1	A	0,44	0,28	0,58	0,13
590-2	1178-2	B	0,08	-0,77		
393-1	1540-1	C	-0,25	-2,88		
291-1	1530-1	E	-0,22	-0,32		
375-1	1545-1	G	-0,28	-1,20		
894-1	1538-1	H	0,84	-1,02		
894-2	1539-1	I	0,30	-0,70		
1036-1	1537-1	J	-1,05	-2,31		



R.

Gène
HNRPC

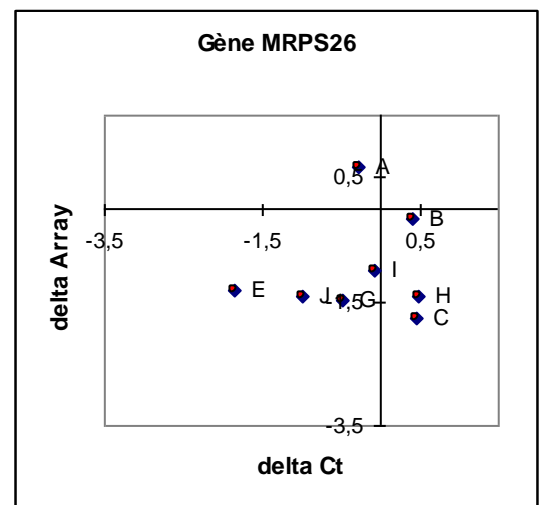
Patient	Contrôle	Couple	delta Ct	delta Array	R	p-value
432-2	1596-1	A	-1,02	0,04	0,34	0,4
590-2	1178-2	B	0,44	-0,05		
393-1	1540-1	C	-0,40	-1,84		
291-1	1530-1	E	-0,17	-0,87		
375-1	1545-1	G	-0,46	-1,53		
894-1	1538-1	H	-0,25	-2,12		
894-2	1539-1	I	-0,56	-1,45		
1036-1	1537-1	J	-0,99	-2,77		



S.

Gène
MRPS26

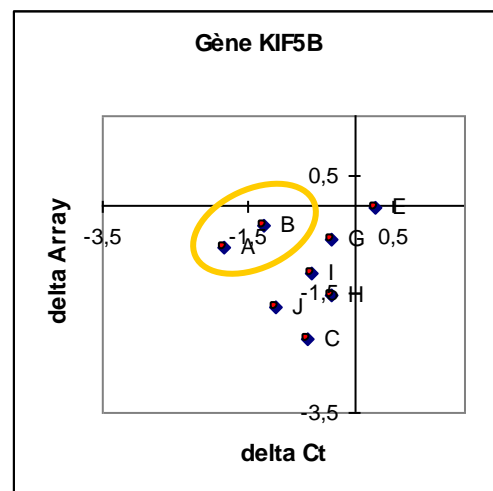
Patient	Contrôle	Couple	delta Ct	delta Array	R	p-value
432-2	1596-1	A	-0,27	0,67	0,13	0,76
590-2	1178-2	B	0,41	-0,16		
393-1	1540-1	C	0,46	-1,76		
291-1	1530-1	E	-1,84	-1,31		
375-1	1545-1	G	-0,47	-1,49		
894-1	1538-1	H	0,49	-1,41		
894-2	1539-1	I	-0,07	-0,99		
1036-1	1537-1	J	-0,99	-1,40		



T.

Gène
KIF5B

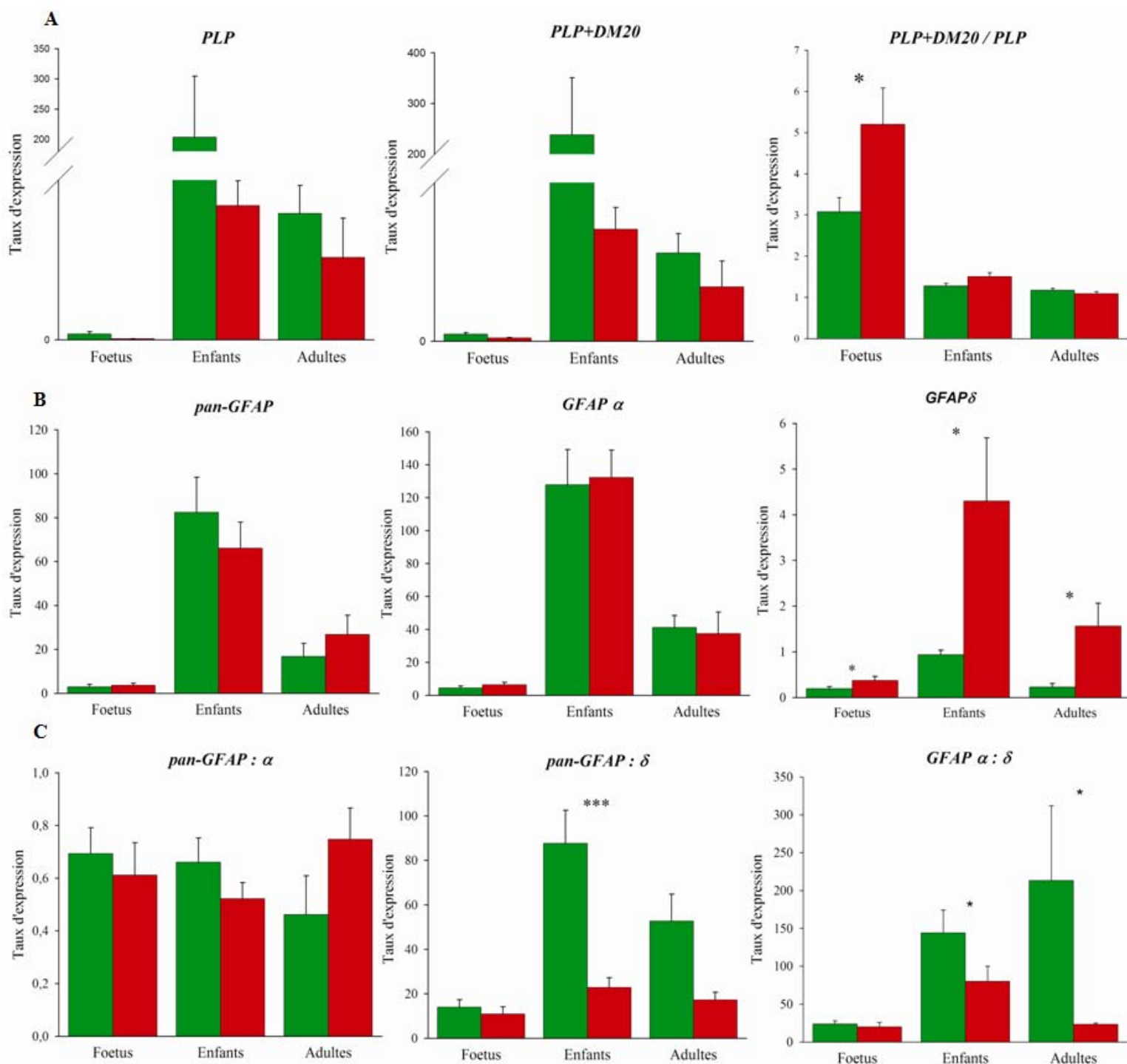
Patient	Contrôle	Couple	delta Ct	delta Array	R	p-value
432-2	1596-1	A	-1,84	-0,70	0,10	0,8
590-2	1178-2	B	-1,29	-0,33		
393-1	1540-1	C	-0,66	-2,25		
291-1	1530-1	E	0,25	-0,05		
375-1	1545-1	G	-0,33	-0,58		
894-1	1538-1	H	-0,33	-1,51		
894-2	1539-1	I	-0,61	-1,15		
1036-1	1537-1	J	-1,10	-1,71		



Chaque point représente les niveaux de ratio d'expression entre patients atteints d'eIF2B-pathie et contrôle pour un gène testé par analyse transcriptomique (axe Y) et par QRT-PCR (axe X). Pour chaque gène, le coefficient de corrélation (R) et la p-value ont été calculé. Les couples patient/contrôle qui montrent un défaut de corrélation entre l'étude transcriptomique et les analyses de QRT-PCR pour un gène testé sont surlignés en jaune.

ANNEXE 3

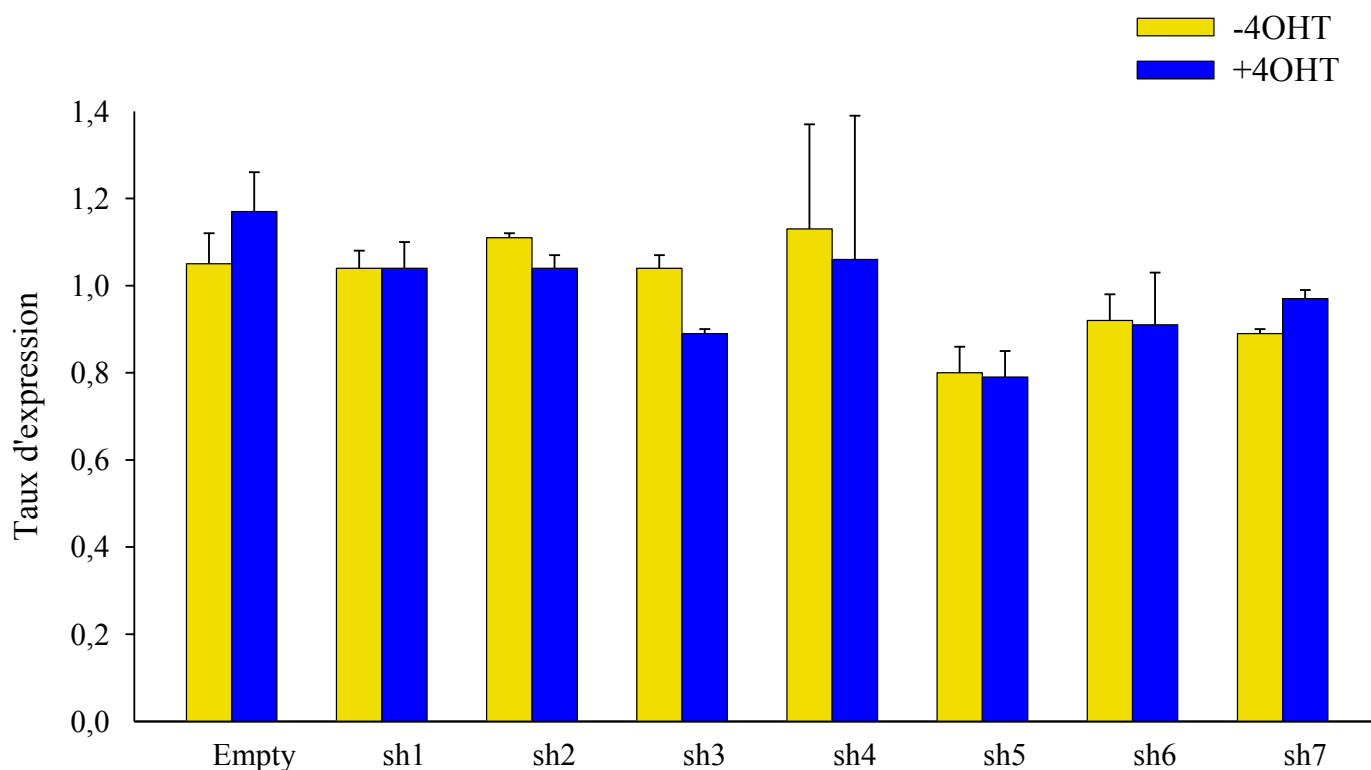
Etude de l'épissage des gènes *PLP1* et *GFAP* dans les cerveaux de patients avec eIF2B-pathies en QRT-PCR.



Les ARNm ont été isolés de cerveaux contrôles (vert) vs cerveaux de patients eIF2B-mutés (rouge) et les expressions des isoformes *PLP*, *PLP+DM20*, *Pan-GFAP*, *GFAPα* et *GFAPδ* ont été analysés par QRT-PCR. Les taux d'expression ont été calculés grâce à la formule $2^{(-\Delta Ct)}$ avec la $\beta 2$ -microglobuline comme gène de référence et les ratios des différentes isoformes ont ensuite été réalisés. Les barres d'erreurs représentent l'écart standard à la moyenne (s.e.m.) (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

ANNEXE 4

Expression du gène *Eif2b5* dans les mESC après transfection par les différents shARN.



Les ARNm ont été isolés des mESC (CGR8) transfectées avec le vecteur vide (Empty) ou avec les shARN 1 à 7 dirigés contre le transcrite *Eif2b5* et traitées ou non au 4-hydroxy-tamoxifène (4OHT). L'expression d'*Eif2b5* a ensuite été analysée par QRT-PCR grâce à la formule $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ avec *Ribosomal protein S17 (Rs17)* comme gène de référence. Les taux d'expression ont tous été rapportés à celui du plasmide vide (Empty) non traités au 4OHT. Chaque échantillon a été analysé en triplicat et les barres d'erreurs représentent la déviation standard (s.d.).

RESUME

Les eIF2B-pathies représentent un groupe de leucodystrophies de transmission autosomique récessive du à des mutations du facteur ubiquitaire eIF2B. Celui-ci intervient dans l'initiation de la traduction et ses régulations, particulièrement en cas de stress cellulaires, grâce à son activité d'échange de guanine (GEF). Un large spectre clinique et mutationnel a été décrit pour cette pathologie. La diminution de l'activité GEF a pu être validée comme marqueur diagnostique spécifique des eIF2B-pathies dans les lymphoblastes de patients atteints avec un seuil d'activité à 77,5% pour une spécificité de 100% et une sensibilité de 89%.

La compréhension des mécanismes moléculaires en cause a ensuite été recherchée selon trois approches : (i) une première focalisée sur l'étude de la réponse au stress du réticulum endoplasmique (RE) dans les lymphoblastes de patients eIF2B-mutés. L'hyper-activation transcriptionnelle et traductionnelle des gènes de la réponse au stress du RE, observée dans d'autres études et sur d'autres types cellulaires n'a pas été retrouvée dans cette étude ; (ii) une approche globale d'étude transcriptomique différentielle dans des fibroblastes primaires de patients eIF2B-mutés soumis ou non à un stress cellulaire. La comparaison du transcriptome avec celui de contrôles sains et de patients porteurs d'une autre leucodystrophie n'a pas permis de mettre en évidence un effet spécifique du stress dans les fibroblastes eIF2B-mutés. En revanche, il a pu être montré une dérégulation de l'expression de 70 gènes spécifiquement dans ces fibroblastes ainsi que l'implication de voies métaboliques telles que l'épissage et la stabilité des ARNm, importantes au cours du développement du système nerveux central. Ces gènes trouvés dérégulés dans les fibroblastes, appartenant notamment à la famille des hnRNP, ont été ensuite validés dans les cerveaux de patients eIF2B-mutés et une anomalie d'épissage de certains transcrits importants pour les cellules gliales a également été identifiée ; (iii) enfin, pour valider l'hypothèse d'une anomalie développementale des cellules gliales, le modèle des cellules souches embryonnaires (ESC) a été utilisé et un défaut génétique a été introduit dans ces cellules afin de mimer les mutations eIF2B. Une anomalie de différenciation de ces ESC en cellules gliales a pu être mise en évidence dans ce modèle qui pourrait alors constituer un outil de choix pour tester des molécules pouvant potentiellement améliorer la différenciation de ces cellules, principales en cause dans cette pathologie.

Mots clés : eIF2B-pathies, activité GEF, stress, transcriptome, épissage, cellules gliales, cellules souches embryonnaires.

ABSTRACT

eIF2B-related disorders are an autosomal recessive leukodystrophy caused by mutations in the ubiquitary eIF2B factor. This one is involved in the translation initiation step and its regulation, particularly upon cellular stresses, thanks to its guanine nucleotide exchange factor (GEF) activity. A wide continuum clinical and mutational spectrum has been described for this pathology. The decrease of eIF2B GEF activity has been validated as an eIF2B-pathies specific biomarker in affected patients' lymphoblasts with 100% specificity and 89% sensibility using a threshold at 77.5%.

Functional molecular mechanisms involved in the physiopathology of eIF2B-related disorders have been searched by three approaches: (i) the first one focalized on the study of the endoplasmic reticulum stress response in lymphoblasts from eIF2B-mutated patients. The translational hyper-induction of specific genes involved in the unfolded protein response, identified in other cell types, was not observed in this study; (ii) a global approach using a differential transcriptomic study of primary fibroblasts from eIF2B-mutated patients submitted or not to a cellular stress. The comparison with the transcriptomic profile of fibroblasts from healthy controls and patients presenting with other types of leukodystrophies not allowed us to identify a specific stress effect in eIF2B-mutated fibroblasts. On the other hand, it has been shown 70 genes specifically differentially deregulated in eIF2B-mutated fibroblasts as well as metabolic pathways implication, like splicing and mRNA stability, that are critical during the central nervous system development. We then validated that these genes, belonging the the hnRNP family, were also deregulated in brains from eIF2B-mutated patients and a splice abnormality of genes implicated in glial cells network has also been identified; (iii) finally, in order to validate the hypothesis of an abnormal glial cell development, the embryonic stem cells (ESC) model has been used and a genetic default has been introduced in these cells to mimic eIF2B mutations. We identified an abnormal differentiation of these ESC into glial cells. Therefore, this model would provide a unique tool to search therapeutic agents that would improve glial cell differentiation, the major cells implicated in this pathology.

Key words : eIF2B-related disorders, GEF activity, stress, transcriptomic analysis, mRNA splicing, glial cells, embryonic stem cells.