HAL
open science

Rôle des gènes de polarité Dlg1 et Crb3 dans la géométrie de la myéline du nerf périphérique

Laurent Cotter

To cite this version:

Laurent Cotter. Rôle des gènes de polarité Dlg1 et Crb3 dans la géométrie de la myéline du nerf périphérique. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Montpellier, 2017. Français. NNT : 2017MONTT113 . tel-01705332

HAL Id: tel-01705332

https://theses.hal.science/tel-01705332

Submitted on 9 Feb 2018

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

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

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

PAR LA VALIDATION DES ACQUIS DE L'EXPERIENCE

Année universitaire 2016-2017

En Biologie Santé

École doctorale Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé (CBS2)

Unité de recherche INSERM 1051 - Institut des Neurosciences de Montpellier

SYNTHÈSE DES TRAVAUX DE RECHERCHE

Présentée par Laurent COTTER
Le 6 novembre 2017

Référent : Nicolas TRICAUD

Devant le jury composé de

John DE VOS, Professeur des universités – Praticien hospitalier, IRMB	Président du jury
Pascale DURBEC, Directeur de recherche, Institut de Biologie de développement de Marseille	Rapporteur
Roman CHRAST, Associate professor, Karolinska Institute	Rapporteur
Nicolas TRICAUD, Chargé de recherche, Institut des Neurosciences de Montpellier	Référent titulaire de l'HDR

UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

Rôle des gènes de polarité, Dlg1 et Crb3, dans la géométrie de la myéline du nerf périphérique

L'altération de la géométrie de la myéline est liée à divers neuropathies humaines au niveau du système nerveux central et périphérique. Chez les vertébrés, la vitesse de la conduction nerveuse dépend du processus de myélinisation. Le diamètre et la longueur de la myéline sont optimisés pour une conduction optimale.

Dans le système nerveux périphérique, ce sont les cellules de Schwann qui en s'enroulant autour de l'axone, constituent les gaines de myéline. Entre chaque segment myélinisé se trouvent les nœuds de Ranvier. Les potentiels d'action sont forcés de «sauter» d'un nœud de Ranvier à l'autre ce qui accélère leur vitesse de propagation.

La polarisation cellulaire de la cellule de Schwann myélinisante (CSm) a été mis en évidence par mon groupe c'est pourquoi notre hypothèse fut que ce processus est capital pour la formation d'une gaine de myéline fonctionnelle. Trois complexes protéiques établissent et maintiennent la polarisation cellulaire. Chez les mammifères, ces complexes sont aPKC/Par3/Par6, Pals1/Patj/Crb3 et Dlg1/Lgl/Scrib.

À l'aide d'une technique qui permet la transduction, *in vivo*, de la CSm, j'ai étudié l'importance de Dlg1 et Crb3 durant la myélinisation.
Premièrement, j'ai observé que «l'effacage», *in vivo*, de Dlg1 provoque une augmentation de l'épaisseur de la gaine de myéline suggérant un rôle d'inhibiteur de la myélinisation. Plus précisément, j'ai montré que Dlg1via PTEN inhibe l'activation d'AKT, une enzyme essentielle pour la myélinisation.

J'ai aussi démontré que la protéine axonale Neuréguline-1 (Nrg1) qui est connue pour stimuler la myélinisation, diminue l'ubiquitinylation de Dlg1 et PTEN, favorisant ainsi leur interaction. Ainsi la NRG1 active deux voies antagonistes : l'une bien établie, via AKT, stimule la myélinisation et l'autre, via Dlg1 et PTEN, la stoppe. Ce mécanisme permet d'atteindre l'épaisseur optimale de la myéline et d'éviter une myélinisation excessive.

Utilisant la même technique, j'ai observé que la diminution de l'expression de Crb3 dans les CS produit un allongement de ces cellules. Plus précisément, Crb3 inhibe l'allongement de la gaine de myéline. Crb3 régule la localisation cellulaire du cofacteur de transcription YAP (en le séquestrant dans le cytoplasme) et par conséquent son activité. Comme YAP peut contrôler directement les gènes de la myéline au niveau des promoteurs cela nous permet de formuler l'hypothèse suivante: lors de l'élongation des nerfs, Crb3 régule de manière négative l'accroissement de longueur de la myéline en tempérant l'activité de YAP. Cela empêche YAP de réguler l'expression des gènes de la myéline.

En mettant en évidence les mécanismes qui président à la myélinisation, mon travail permet d'envisager de nouvelles voies thérapeutiques concernant diverses neuropathies humaines.

Changes in the myelin geometry are linked to several human neuropathies in the central and peripheral nervous system. In the mammalian nervous system, the nerve conduction velocity depends on the myelin sheath. Optimal conduction is obtained by adjusting the geometry (length and thickness) of the myelin according to the axon diameter.

In the peripheral nervous system, myelin is produced by Schwann cells. Successive myelin segments isolate axons. Between each segment the highly specialized nodes of Ranvier are responsible for efficient and rapid propagation of action potentials along the nerve.

The polarization of the myelinating Schwann cell (mSC) was shown by our group, therefore we assumed that cell polarity proteins were the key players for the formation of the myelin sheath. Three complexes are known to organize polarized cellular processes. In mammals, these complexes are aPKC/Par3/Par6, Pals1/Patj/Crb3 and Dlg1/Lgl/Scrib.

Using an approach that allowed the *in vivo* transduction of mSC, I investigated the relevance of Dlg1 and Crb3 during myelin formation.

First, I observed that *in vivo* Dlg1 silencing induced an increase of myelin sheath thickness, which indicated that Dlg1 acts as an inhibitor of SC myelination. More precisely, I showed that Dlg1 together with PTEN inhibits AKT activation, an enzyme required for myelination.

I also demonstrated that the axonal Neuregulin-1 (Nrg1) which was known to stimulate myelination also prevented the Dlg1and PTEN ubiquitination. The lack of ubiquitination leads to more Dlg1-Pten complexes in mSC. So we concluded that actually Nrg1 plays a dual role during myelination, besides promoting myelination, this protein is also involved in avoiding overmyelination.

Using the same technique, I observed that Crb3 silencing increases the length of the myelin sheath. More precisely, I showed that Crb3 is a specific inhibitor of myelin sheath elongation. Crb3 can prevent the shuttling of YAP, a transcription cofactor, into the nucleus, thereby inhibitng its activity. YAP can directly control important myelin genes at the promotor level, therefore, we hypothesized that myelin elongation in mSC is driven by the stimulation of YAP and Crb3 can tempered this to reach the optimal length.

By highlighting the mechanisms that control myelin formation, this work could lead to better strategies to treat human neuropathies

Sommaire

1. Contexte…… p.1

1.1 Conduction nerveuse et myélinisation……p.1

1.2 Les cellules de Schwann myélinisantes (CSm)…… p.2
1.2.1 Structure de la cellule de Schwann myelinisante (CSm)…. p.3

1.3 La relation axone-cellule de Schwann……p.10

1.4 Polarité cellulaire et polarisation de la cellule de Schwann…… p.10

1.5 Originalité de mon travail…….. p12

2.1 Mes travaux…… p.14

2.2 Bilan et perspectives…… p.45

3. Références……p.47

4. Publications…….. p.50

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury pour avoir accepté d'analyser ce travail.

Je tiens également à remercier le Dr. Nicolas Tricaud pour m'avoir accueilli dans son groupe à l'ETH de Zurich puis dans son équipe à Montpellier. J'ai beaucoup appris à son contact et aimé travailler avec lui.
Je tiens à remercier le Professeur Ueli Suter et toute son équipe à ETH de Zurich. J'y ai trouvé un cadre de travail stimulant et des collègues hors-pair.

Un grand merci à Mme Ruani Fernando avec qui j'ai travaillé sur le projet Crb3. Grâce à ce travail, j'ai rencontré une scientifique stimulante et aussi une amie.

Je remercie également mon laboratoire actuel à l'institut Pasteur de Paris, le laboratoire perception et mémoire. En particulier, je remercie M. Pierre-Marie Lledo, le directeur du laboratoire et Mme Francoise Lazarini pour leur soutien. Grâce à eux et à mon environnement pasteurien j'ai eu envie d'entreprendre cette démarche de validation des acquis de l'expérience.

Finalement, je tiens à remercier Mme Ilana Gabanyi, sans laquelle je n'aurai jamais mené cette procédure à son terme.

1. Contexte

D'avril 2009 à fin mars 2014, j'ai travaillé dans le groupe du Dr. Nicolas Tricaud. Tout d'abord en Suisse, à l'Ecole Polytechnique Fédérale de Zürich puis nous avons rejoint l'Institut des Neurosciences de Montpellier. Mon sujet d'étude a été la myélinisation dans le système nerveux périphérique (SNP). Plus précisément, nous avons étudié l'implication des complexes protéiques régulant la polarité cellulaire dans le processus de myélinisation.

1.1 Conduction nerveuse et myélinisation

La vitesse de la conduction nerveuse dépend du processus de myélinisation. Chez l'être humain, ce processus est essentiel au bon fonctionnement du système nerveux central (SNC) et périphérique (SNP). Dans le SNP, ce sont les cellules de Schwann (CS) qui en enroulant et compactant leur membrane à plusieurs reprises autour de l'axone, constituent des gaines électriquement isolantes, appelées myéline ou gaines de myéline. Entre deux gaines successives se trouve sur l'axone une zone, non isolée, où les protéines responsables de la propagation du potentiel d'action sont rassemblées. Ces intervalles réguliers sont appelés nœud de Ranvier (Figure 1). La myéline étant un isolant efficace très peu perméable au courant, les potentiels d'action sont forcés de « sauter » d'un nœud de Ranvier à un autre, ce qui accélère la vitesse de propagation de la fibre nerveuse.

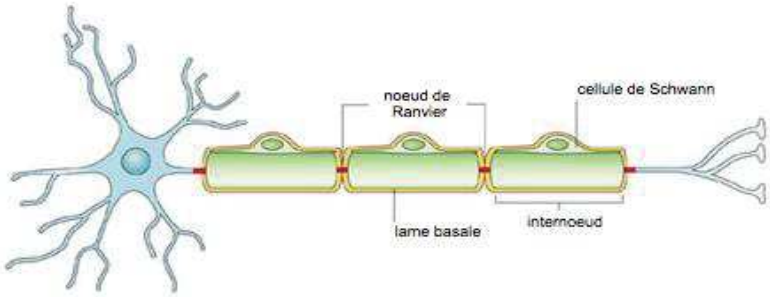

Figure 1: Schéma de la structure d'un axone myélinisé dans le SNP. *La succession de plusieurs CS myélinisantes forment la gaine de myéline (représentée en vert) autour de l'axone et assure une transmission rapide du potentiel d'action par conduction saltatoire. Les nœuds de Ranvier sont représentés en rouges. Figure adaptée de Poliak et Peles (2003)*

L'isolation électrique fournit par la myéline est cruciale pour le fonctionnement correct et efficace du système nerveux. La production de myéline est donc strictement régulée et la quantité de myéline générée est proportionnelle au diamètre de l'axone isolé. Ainsi le rapport entre le diamètre des axones et le diamètre total des fibres nerveuses, appelé g-ratio, est conservé pour chaque calibre d'axones. Quant à la longueur de la myéline qui correspond à la distance entre deux nœuds de Ranvier successifs, aussi appelée distance internodale, celle-ci est corrélée avec son épaisseur mais aussi avec le diamètre de l'axone isolé.

En résumé, la "géométrie" de la gaine de myéline, son diamètre et sa longueur, est donc un paramètre essentiel de la conduction de l'influx nerveux et ses deux composantes sont donc soigneusement ajustés en relation avec le diamètre de l'axone isolé pour obtenir une conduction optimale ((**1**) Waxman, 1997 et (**2**) Tomassy, G.S.*, et al.* (2014).).

L'importance de la géométrie de la myéline est mise en évidence par les pathologies associées à son altération. Les neuropathies périphériques sont dues à des facteurs génétiques ou acquis. Les neuropathies héréditaires résultent d'une amyélinisation (absence de myéline), d'une dysmélinisation (altération de la géométrie "optimale" de la myéline) ou d'une démyélinisation (destruction de la myéline) souvent due à une dysmelinisation. Elles sont regroupées sous le nom générique de maladies de Charcot-Marie-Tooth (ou CMT) ((**3**) Suter et al., 2003).

Les neuropathies démyélinisante acquises sont fréquentes et sont dues à des agents infectieux (p.ex. Mycobacterium leprae responsable de la lèpre), à l'usage de drogues ou à des causes inflammatoires (Syndrome de Guillain-Barré) par exemple.

1.2 Les cellules de Schwann myélinisantes (CSm)

Les cellules de Schwann dérivent d'une structure embryonnaire, la crête neurale. Tout d'abord sous forme de précurseurs puis de cellules de Schwann immatures. Chez la souris, peu avant la naissance, les CS immatures entourent un large groupe d'axone avec lesquels elles sont étroitement associées ((**4**) Jessen et Mirsky, 2005). Au moment de la naissance ces cellules se différencient pour former des CS matures myélinisantes ou non-

myélinisantes. Les CS subissent de grands changements morphologiques lors de la transition entre cellules immatures et matures. Tout d'abord chaque CS établit une relation avec un seul axone. Cette étape est nommée «tri radial» ((**4**) Jessen et Mirsky2005) et le devenir de chaque CS (myélinisante ou non) dépend du diamètre de l'axone avec lequel elles sont associées ((**5**) Taveggia et al., 2005). Puis les CS myélinisantes s'alignent par rapport à leur axone et adoptent une morphologie bipolaire caractéristique des CS matures myélinisantes. Dès lors, la myélinisation proprement dite peut débuter avec l'élaboration de la gaine de myéline suivie du regroupement des composés axonaux associés à la formation du nœud de Ranvier ((**6**) Gatto et al., 2003). La mise en place et la maturation de la myéline dure environ 6 mois chez la souris et 20 ans chez l'homme.

1.2.1 Structure de la cellule de Schwann myélinisantes (CSm)

Structurellement, la CSm se divise en deux sous-domaines aux fonctionnements distincts: la myéline compacte et la myéline non compacte. Chacun de ces domaines contient des protéines qui remplissent des fonctions bien spécifiques. Des mutations des gènes codant pour certaines d'entre elles ont été identifiées chez des patients atteints de neuropathies périphériques telles que les CMT.

La myéline compacte

La myéline compacte résulte de l'accolement des membranes plasmiques adjacentes de la CS lors de son enroulement progressif autour de l'axone. Dans ces régions, la myéline ne contient plus de cytoplasme. Les membranes compactes de la myéline sont riches en lipides: phospholipides, glycosphingolipides et de cholestérol ((**7**) Bosio et al., 1998 ; (**8**) Chrast et al., 2011) et contiennent quelques protéines spécialisées. La protéine *myelin protein zero* (P0) est la plus abondante de la myéline périphérique. Elle joue un rôle dans la compaction des différentes couches lipidiques lors de leur enroulement autour de l'axone. En effet, cette protéine transmembranaire permet «l'attachement» des couches lipidiques par sa capacité à établir des liaisons homophiliques ((**9**) Giese et al., 1992), fonction essentielle pour la formation et la maintenance de la gaine de myéline. Deux autres protéines sont des

composantes majeures de la myéline compacte: la *myelin basic protein* (MBP) et la *peripheral myelin protein 22* (PMP22). La MBP est une protéine cytoplasmique très chargée positivement, associée à la partie intracellulaire de la membrane compacte. Quant à la protéine PMP22 c'est une protéine intégrale comportant quatre domaines transmembranaires. La quantité de cette dernière est finement régulée faute de quoi, de graves anomalies de myélinisation sont observées. Par exemple, sa surexpression (duplication du gène *PMP22*) est la cause de la forme la plus répandue des CMT, la CMT de type 1A ((**10**) Suter et al., 1992).

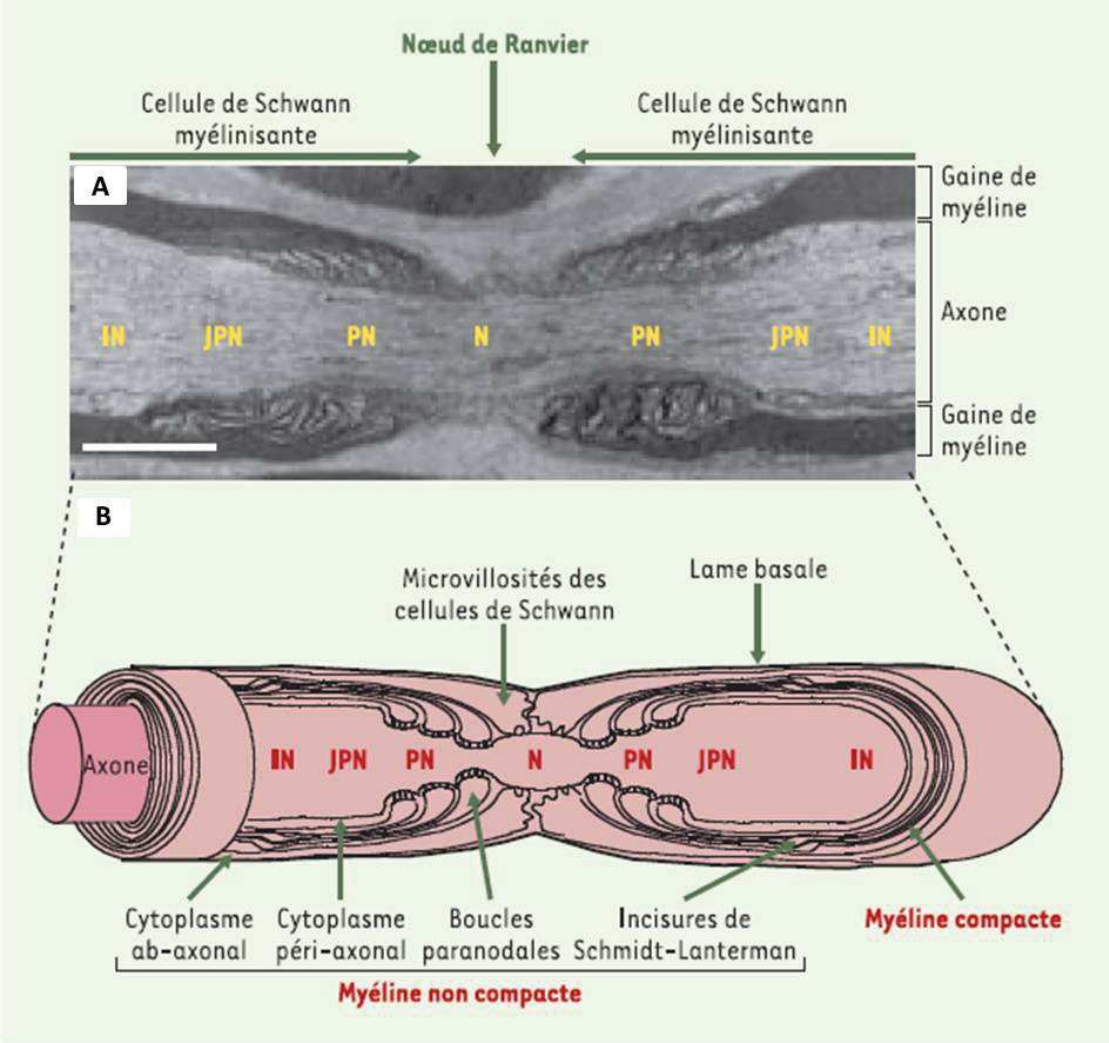

Figure 2: Organisation ultrastructurelle de la myéline non compacte dans le SNP. A *Photo en microscopie électronique, au niveau d'un nœud de Ranvier du nerf phrénique (échelle, 2um).* ***B*** *Schéma des sous-domaines de la myéline non-compacte. Ces domaines sont les boucles paranodales, les incisures de Schmitd-Lanterman, , la région ou cytoplasme ab-axonale, la région ou cytoplasme ad-axonale et les microvillosités. L'enroulement de la CS autour de l'axone définit 3 domaines le long de ce dernier : le nœud (N), le paranoeud (PN) et le juxtaparanoeud (JPN). Adapté de Oguievetskaia K et al., (2005)*

Quant à la myéline non compacte, cela correspond à tous les domaines cytoplasmiques de la CS. Ces régions sont les boucles gliales paranodales, les incisures de Schmidt-Lanterman, la région ad-axonale (ou cytoplasme péri-axonal), la région ab-axonale (ou cytoplasme ab-axonal) et les microvillosités (Figure 2).

La myéline non-compacte

Les boucles paranodales sont des domaines cytoplasmiques localisées aux extrémités latérales de chaque spirale de gaine de myéline. Ces boucles forment des jonctions de type «septé» avec la membrane axonale de part et d'autre du nœud (Figure 3). Ce type de contact défini le domaine axonal, appelé paranoeud (Figure 2 et 3). La CS y exprime la Neurofascine 155 (NF155) qui interagit avec le complexe composé de la glycoprotéine *Contactin-associated protein* (Caspr), aussi nommée Paranodine et la Contactine exprimées au niveau de la membrane axonale.

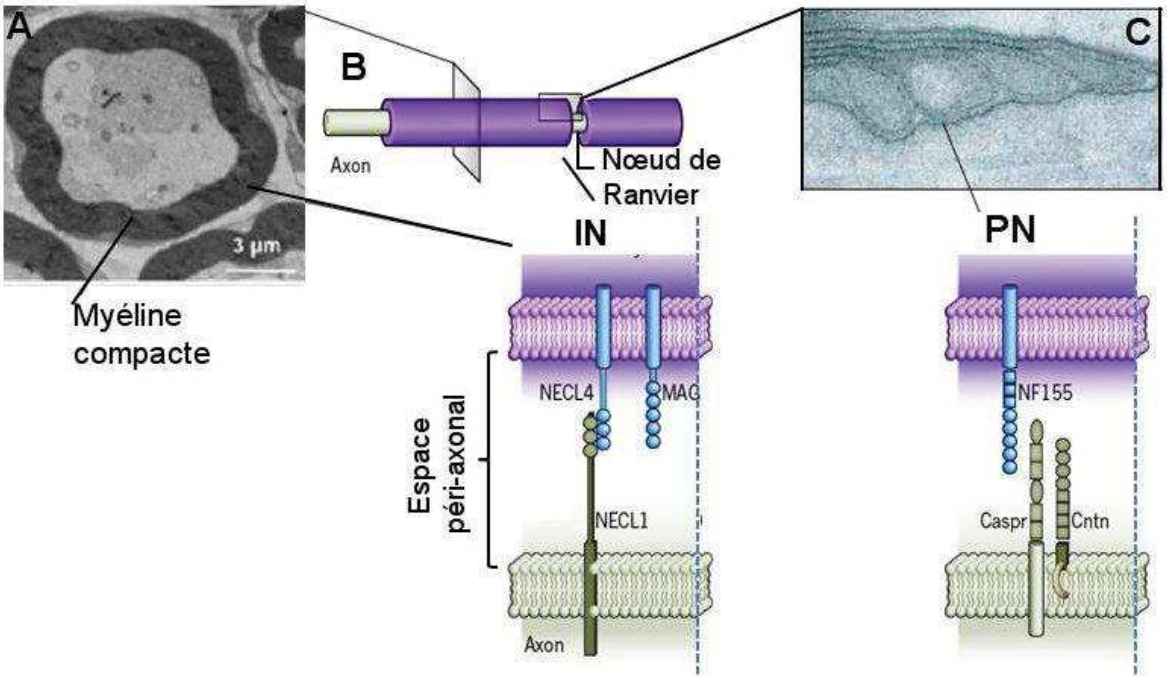

Figure 3: Organisation ultrastructurelle de la myéline non compacte dans le SNP. A *Photo en microscopie électronique, d'une coupe transversale d'une fibre myélinisée (photo tiree de Gonzalez et al.,.2015)* ***B*** *schéma d'un axone myélinisée avec deux gaines de myéline adjacentes séparées par le nœud de Ranvier.* ***C*** *Photo en microscopie électronique, en coupe transversale au niveau de la région paranodale.* ***En bas****, schéma des complexes protéiques impliqués dans les jonctions axono-gliales au niveau des internoeuds et de la région paranodale.*
MAG, myelin associated protein; Necl, nectine-like protein; NF155, Neurofascine 155; Caspr, Contactin-associated protein; Cntn, Contactine. Adapté de Nave 2010.

La formation de cette jonction axo-gliale semble être requis pour maintenir la séparation spatiale entre les canaux sodiques et potassiques au nœud de Ranvier. En effet, les souris où le gène de la Caspr a été invalidé, ne peuvent pas former de jonctions paranodales. Cela implique une mauvaise localisation des canaux potassiques et une sévère diminution de la vitesse de conduction nerveuse ((**11**) Bhat et al., 2001). Les boucles paranodales sont donc importantes pour la formation correcte du nœud de Ranvier et pour une bonne conduction de l'influx nerveux.

La région ad-axonale correspond à la région cytoplasmique collée à l'axone (Figure 2). Les protéines MAG (myelin associated protein) et Necl («nectin-like») sont deux constituants majeurs de cette région (Figure3). Les souris où le gène codant pour MAG a été invalidé, présente au niveau périphérique une atrophie des axones myélinisés et cela entraine la formation de tomacula paranodal et une dégénérescence axonale ((**12**) Yin et al., 1998). L'absence de signe inflammatoire ou d'hypomyélinisation suggère que MAG joue un rôle dans la maturation et la viabilité de l'axone.

Le noyau, le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi se trouvent dans le cytoplasme refoulé au niveau du dernier enroulement de la CS, zone la plus éloigné de l'axone, nommée région ab-axonale (Figure 2). Ainsi la majorité des protéines et lipides qui composent la myéline compacte y sont synthétisés. Les nouveaux composants sont ensuite transportés de la région périnucléaire jusqu'aux différents domaines de la CSm.

Ce transport se fait notamment radialement, via les incisures de Schmidt-Lanterman . Ces incisures sont des structures coniques cytoplasmiques (régions dans lesquelles les faces cytoplasmiques des membranes gliales ne sont pas adhérentes) qui persistent lors de l'enroulement de la cellule gliale autour de l'axone. Cela crée une voie cytoplasmique de diffusion qui suit un enroulement hélicoïdal et connecte les différentes régions cytoplasmiques de la cellule de Schwann (Figure 4).

Des jonctions notamment, adhérentes y sont formées, au niveau des couches lipidiques supérieures de la gaine de myéline. Elles sont mises en évidence par la protéine E-Cadhérine leur constituant majeur. La déstabilisation des jonctions adhérentes «matures»

empêche la formation et la maintenance des incisures et cela aboutit à une hypomyélinisation radiale ((**13**) Perrin-Tricaud et al 2007).

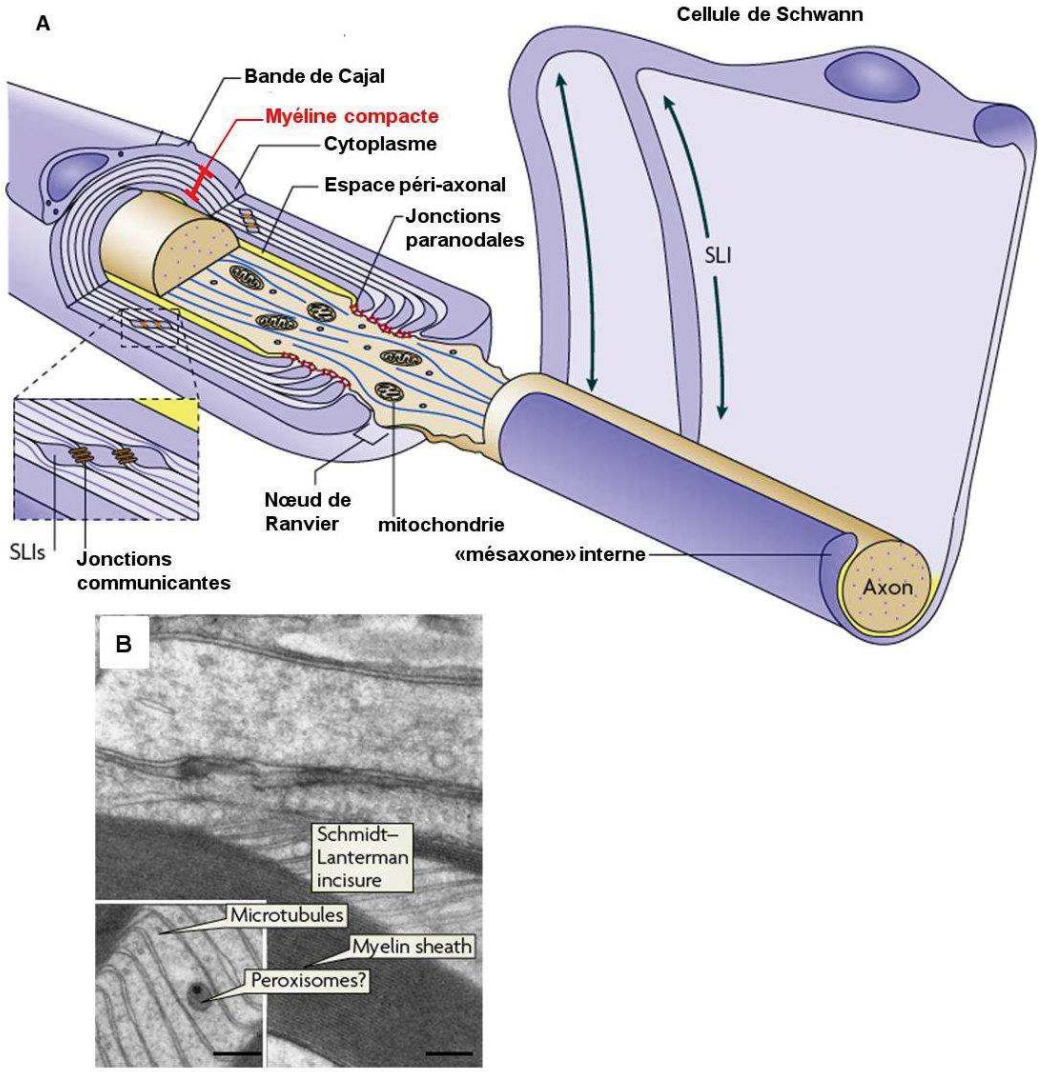

Figure 4: Incisure de Schmidt-Lanterman (SLI). A *Schéma d'un axone myélinisé avec deux CS adjacentes dont une (à droite) est déroulée. En mauve foncé sont représentées les zones cytoplasmiques de la CS. En déroulant, la CS on constate, plus particulièrement, que la myéline compacte du système périphérique est interrompue par des incisures de Schmidt-lanterman (SLI). Ces structures correspondent à l'accolement des faces cytoplasmiques de la membrane plasmique de ces cellules. Cela crée des canaux entre le soma de la CS et la zone péri-axonale.* ***B*** *La figure montre une photo de microscopie électronique d'incisures. On distingue a l'intérieur de ces structures des microtubules et des organelles tel que des peroxysomes (échelle: 500 nm). Figure adaptée de Nave (2010).*

Quant au transport longitudinal, il se fait via un sous-domaine ab-axonal constitué de canaux cytoplasmiques, riches en microtubules, appelés bandes de Cajal (Figure 5). Ce deuxième sous-domaine est constitué de l'apposition entre la surface ab-axonale de la myéline compacte et la membrane plasmique de la CS. Ainsi le cytoplasme de la région ab-axonale est confiné aux bandes de Cajal. Aux zones d'adhésion, sont concentré des complexes

protéiques composés de L-Périaxine, Dystroglycan-related protein 2 (DRP2) et d'un récepteur glial, la Dystroglycane ((**14**) Sherman et al., 2001). L'invalidation de la Périaxine déstabilise la gaine de myéline ce qui conduit à l'apparition progressive d'une neuropathie démyélinisante ((**15**) Gillespie et al., 2000).

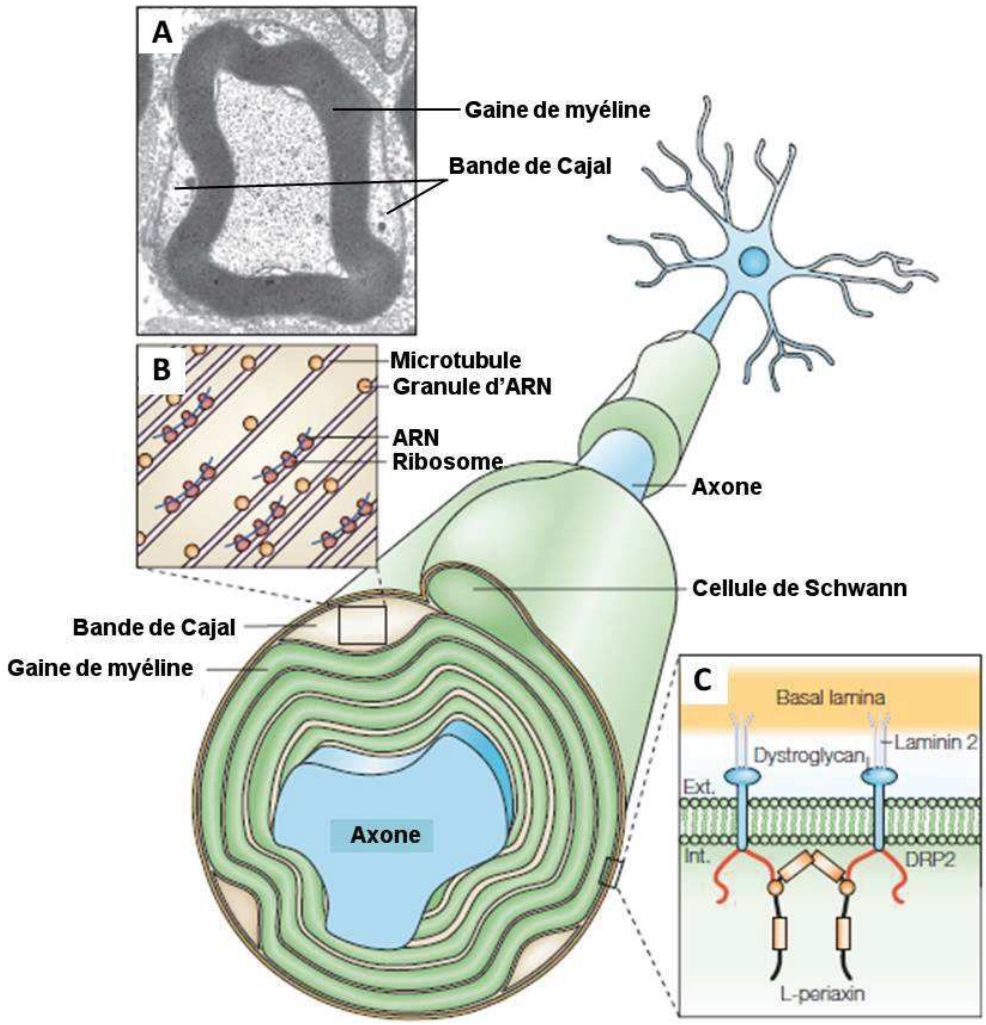

***Figure 5: Bandes de Cajal d'une cellule de Schwann**. **A** Section transverse du nerf quadriceps en microscopie électronique montrant en gris foncé la gaine de myéline les canaux cytoplasmiques qui l'entourent. **B** Microtubules se trouvant dans les bandes de Cajal et participant au transport à travers la gaine de myéline. **C** Schéma du complexe protéique Périaxine –DRP2-Dystroglycane responsables de la bonne mise en place des bandes de Cajal. Figure adaptée de Poliak et Peles (2003)*

Chez l'homme, une forme de CMT, CMT de type 4F, est due à des mutations récessives du gène *Prx* codant pour la Périaxine ((**16**) Guibot et al., 2001).

Exprimées à la membrane ab-axonale de la CSm: les intégrines et dystroglycanes sont deux récepteurs majeurs de la lame basale. Sorte de tube qui entoure la CSm, la lame basale est une caractéristique de la myéline périphérique. Elle favorise le développement de la CSm et

stabilise l'interaction axo-gliale. Son constituant essentiel, la Laminine-2 se lie au Dystroglycane. Des mutations du gène *LAMA2*, codant pour la chaîne α2 de la Laminine-2, sont responsables de formes classiques de dystrophie musculaire congénitale (CMD) associées à une démyélinisation des nerfs périphériques moteurs chez l'homme ((**17**) Di muzio et al., 2003).

Les microvillosités des CS sont des projections latérales du domaine ab-axonal qui recouvrent le nœud de Ranvier entre deux CS adjacentes. Ces structures sont enrichies en filaments d'actine, protéines ERM (erzine, radixine ,moésine), protéines EBP50 (erzin binding protein 50) et Gliomédine (Figure 6).

En effet, de nombreuses molécules présentent dans cette structure (ERM proteins, Gliomedin) jouent un rôle essentiel dans la mise en place et l'intégrité du nœud de Ranvier. La Gliomédine, notamment interagit avec les protéines de l'axolemme nodal, NrCAm et NF186. Via cette interaction la Gliomédine intervient dans la formation du nœud ((**18**) Eshed et al. 2005).

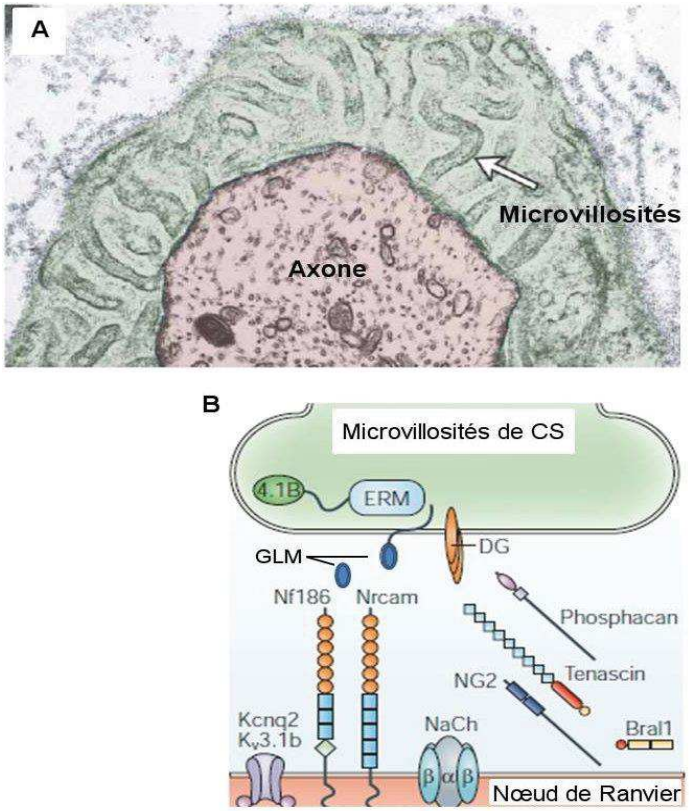

Figure 6: Structure et jonction axono-gliale des microvillosites gliale. A *Photographie en microscopie électronique au niveau d'un nœud de Ranvier du SNP. Les microvillosités de CS (flèche) contactent le nœud de Ranvier.* ***B*** *Schéma de la composition moléculaire au nœud de Ranvier du SNP. La membrane plasmique du nœud est enrichie en canaux sodique voltage dépendant, canaux potassique (NaCh) , Neurofascine186 (Nf 186), et la protéine «cell-adhesion molecules (CAMs) of the immunoglobulin superfamily» (Nrcam). Les microvillosités expriment les ERM, la dystroglycane (DG) et la glyomédine (GLM). Dans l'espace internodal on retrouve plusieurs protéines de la matrice extracellulaire (Tenscin, phosphoacan, NG2). Figure adaptée de Poliak et peles, (2003) et de Sachfer et Rasband, (2006).*

1.3 La relation axone-cellule de Schwann

Les bases moléculaires de la relation axone-cellule de Schwann ont été partiellement élucidées. Il a été a montré que seul les axones de gros calibres (> à 1 µm) sont myélinisés et que ceux-ci expriment une protéine transmembranaire, la Neuréguline 1 de type III (NRG 1) pour stimuler leur myélinisation ((**19**) Nave, Salzer, 2006). Plus l'axone exprime de Neuréguline, plus épaisse sera sa gaine isolante ((**20**) Michailov et al, 2004). Les cellules de Schwann myélinisantes (CSm) expriment des récepteurs à la Neuréguline, les récepteurs *erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2/3* (erbB 2/3), indispensables pour l'élaboration normale de la gaine de myéline ((**21**) Chen et al., 2006;). L'activation de ces récepteurs provoque la différentiation des CS immatures en CS myélinisantes, puis stimule la production de myéline ((**19**) Nave, Salzer, 2006). Plusieurs messagers secondaires (calcium, phosphoinositide-3 kinase (PI3K), les «Mitogen activated» kinases (MAPK) notamment) sont activés en aval des récepteurs erbB2/3. Plus précisément, la voie de signalisation de la PI3K et de la protéine kinase B (aussi nommée AKT) est la voie prédominante pour la production de myéline ((**5**) Taveggia et al, 2005) dans les CS. Cependant si cette voie contrôle le diamètre de la myéline elle ne contrôle pas son élongation.

1.4 Polarité cellulaire et polarisation de la cellule de Schwann

Dans la CSm, la compartimentation du cytoplasme dans de multiples régions atteste de sa haute différenciation et la distribution précise des protéines dans ces compartiments suggère une forte polarisation. Le terme de polarisation cellulaire se réfère à la propriété de certaines cellules d'être organisées selon un axe déterminé par deux pôles. Ce processus assure une

organisation asymétrique des domaines cellulaires et participe ainsi à la différentiation et à la fonction des cellules. Cela implique divers aménagements au niveau de la cellule comme l'établissement de jonctions cellulaires, un transport vésiculaire spécifique et une composition membranaire lipidique diversifiée ((**22**) Mellman et Nelson, 2008).

Trois complexes protéiques, conservés au cours de l'évolution, contrôlent ce processus. Chez les mammifères, ces complexes qui interagissent pour établir la polarité cellulaire sont: aPKC/Par3/Par6 (ou complexe Par3), Pals1/Mupp1/Crb3 (ou complexe Crb3) et Dlg1/Lgl/Scrib (ou complexe Scrib) (Figure 7). Bien qu'exprimés dans divers types cellulaires, leurs fonctions ont été étudiées le plus amplement dans la cellule épithéliale. Dans ce modèle, le complexe comprenant Dlg1est localisé dans le domaine basolatéral alors que les deux autres complexes sont situés dans la région apicale. Au cours de la polarisation de la cellule épithéliale, le complexe Par3 stimule la formation du domaine apical en stimulant le complexe Pals1et inhibant l'activité du complexe Dlg1. Ce dernier empêche l'expansion excessive du domaine apical en inhibant à son tour l'activité du complexe contenant aPKC ((**22**) Mellman et Nelson, 2008).

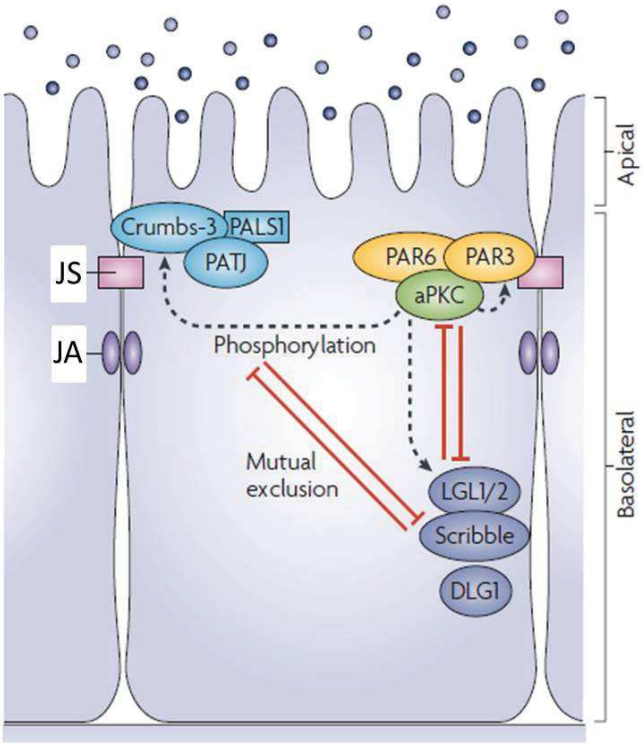

Figure 7:Organisation des complexes qui régulent la polarité cellulaire dans la cellule épithéliale. *Les complexes PAR3 (jaune-vert) et Crb3 (bleu claire) sont localises au niveau des jonctions serrées alors que le complexe Scrib (mauve) a une localisation basolatérale. Plusieurs interactions se produisent entre ces divers complexes et sont responsables de leur correcte localisation. JS, Jonctions serrées, JA, Jonctions adhérentes Figure adaptée de Sandra Iden et John G. Collard (2008).*

Lors de mon arrivée dans le groupe du Dr. N. Tricaud, son équipe venait de mettre en évidence la polarisation de type épithélial de la CSm.

Tout d'abord, ils avaient décrit l'expression et la distribution de la plupart des composants des trois complexes, régulant la polarisation, dans la CS puis observés la localisation d'autres marqueurs de polarité épithéliale comme les marqueurs vésiculaires (Sec8, Syntaxine4, Annexine2), les phosphoinositides phosphates (PIP2, PIP3) et les enzymes qui les modifient (PTEN, PI3K). Leurs données montrent une polarisation radiale de la CSm avec deux domaines principaux: un domaine similaire au domaine épithélial apical qui comprend la myéline compacte, les incisures de Schmitt-Lanterman et les membranes ad-axonales (Par3, aPKC, Pals1, Crb3, Annexin2, PIP2 et PTEN) et un deuxième similaire au domaine basolatéral qui comprend les membranes en contact avec la lame basale (Lgl1, Scrib, Dlg1, Sec8, Syntaxin4, PIP3 and PI3K) (figure 8) ((**23**) Ozçelik M et al, 2010).

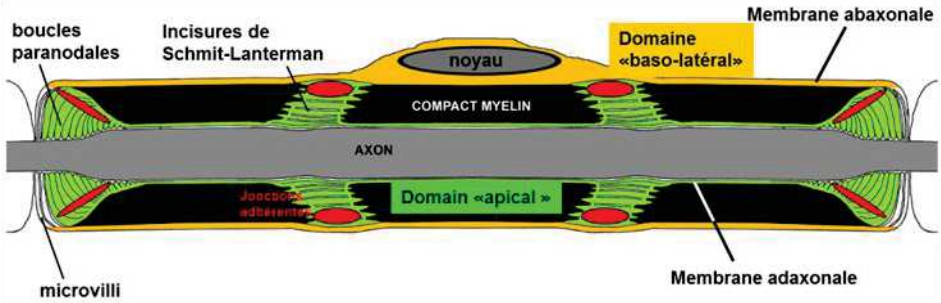

Figure 8: Vue longitudinale d'une fibre myélinisante. *L'axone est montré en gris et la myéline compacte en noir. Les domaines colorés correspondent aux régions cytoplasmiques de la cellule de Schwann. Le domaine « baso-latéral » est en orange, le domaine « apical » en vert et les jonctions adhérentes sont colorés en rouge*

1.5 Originalité de mon travail

Mon travail a consisté à étudier le rôle fonctionnel de certaines protéines de la polarité (Dlg1 et Crb3) lors de la myélinisation.

Pour ce faire, nous avons utilisé un modèle de myélinisation *in vitro*: la mise en culture de ganglions de la racine dorsale prélevés à partir d'embryons âgé de 13,5 jours permet la co-culture de neurones et de CS. L'adjonction d'acide ascorbique induit ensuite la myélinisation

des neurones par les cellules gliales. Ce système est utilisé pour étudier les mécanismes moléculaires précoces de la myélinisation. De plus, utilisant des vecteurs viraux (Rétrovirus) capables d'infecter spécifiquement les cellules qui prolifèrent dans ce type de cultures mixtes, à savoir les CS, nous pouvons introduire des protéines mutées ou des petits ARN interférents (pARNi) et modifier ainsi la biologie de la cellule de Schwann. L'approche interférentielle permet de dégrader un ARNm cible à l'aide de *short hairpin RNA* (ARNsh) ce qui aboutit à l'inhibition de l'expression de la protéine cible. Cette technique permet notamment de modifier les CS avant que le processus de myélinisation, proprement dit ait débuté et de ce fait d'étudier les phases précoces de ce phénomène.

Nous avons aussi utilisé une nouvelle approche mise au point dans notre laboratoire qui facilite l'étude *in vivo* des mécanismes moléculaires de la myélinisation. Cette méthode est aussi basée sur l'utilisation des vecteurs viraux, afin d'introduire des facteurs exogènes (des protéines mutées ou des ARNsh), spécifiquement dans la cellule de Schwann. Les facteurs exogènes sont couplés à des protéines fluorescentes (GFP, DsRed2) ce qui permet de détecter les cellules infectées. Ces dernières peuvent aussi être détectées et analysées par microscopie électronique. Pour ce faire la protéine fluorescente est remplacée par par une enzyme, la *placental alkaline phosphatase* (PLAP) dans notre construction virale. L'activité de cet enzyme, préservée après une fixation forte, induit la formation de précipités détectable en microscopie électronique. Pratiquement, des virus sont injectés dans le nerf sciatique murin. L'injection peut se faire précocement (3-4 jours après la naissance), ce qui permet d'étudier la mise en place de la gaine de myéline, ou plus tardivement (4 à 8 semaine après la naissance) pour étudier sa maintenance ou sa détérioration. De plus, en variant les différents types de virus, nous obtenons une spécificité maximum. En effet, l'infection de nouveau-nés à l'aide d'un lentivirus, sous le contrôle d'un promoteur CMV, permet d'infecter majoritairement les CS et non les neurones. Pour l'infection des animaux adultes, l'adénovirus est le vecteur le plus adapté pour cibler les cellules de Schwann ((**23**) Ozçelik M et al, 2010). Récemment des adéno-associé virus (AAV) ont été aussi utilisés ((**24**) Gonzalez et al, 2015). Selon le sérotype choisi et le site d'injection, les AAV ont un tropisme pour

différents types cellulaires. Il est possible en injectant un AAV9 directement dans le nerf périphérique de la souris de cibler à 90% les CS, alors que l'injection du même sérotype dans la moelle épinière de nouveau-nés permet de cibler les neurones.

Finalement, les nerfs sont prélevés, fixés puis les fibres myélinisées sont individualisées sur une lame de verre. Les cellules infectées sont visualisées grâce à l'expression des marqueurs fluorescents et les préparations sont immunomarquées pour visualiser les diverses protéines d'intérêts.

En utilisant ces techniques j'ai participé dans l'équipe du Dr. Tricaud à la démonstration que l'effacement in *vivo* de l'expression de Pals1 durant la myélinisation diminue significativement l'épaisseur et la longueur de la gaine de myéline des cellules de Schwann infectées. De plus, quand Pals 1 est manquant, les marqueurs vésiculaires (Sec8, Syntaxine4) sont mal localisés et les protéines de la myéline MAG et PMP22 sont moins abondantes à la surface des cellules épithéliales en culture. Ceci suggère un rôle de Pals1 dans l'adressage et la livraison des protéines de la myéline dans les cellules de Schwann, ce qui empêcherait la mise en place normale de la gaine de myéline ((**23**) Ozçelik M et al, 2010).

Ces premiers résultats nous ont conforté dans l'idée que le processus de polarisation est capital pour la formation d'une gaine de myéline fonctionnelle (de géométrie adéquate) et montré la puissance des techniques développées au sein du laboratoire.

2.1 Mes travaux

- Disk Large 1(Dlg1)

Je me suis ensuite intéressé à la protéine *Disc large homolog 1* (Dlg1).

Chez la Drosophile, le gène *disc large (dlg)* a été décrit pour la première fois en 1991. Sa mutation perturbe la polarisation apico-basale et la formation des jonctions septées au niveau des disques imaginaux de la Drosophile ((**25**) Woods et al., 1991).

Cinq homologues (*disc large homologue1 à 5*) ont été identifiés chez les mammifères et *dlg1* a le plus d'homologie avec *dlg.* Aussi nommée Synapse Associated Protein 97 (SAP97),

Dlg1 est une protéine associée à la membrane plasmique et exprimée dans la plupart des cellules humaine ((**26**) Müller et al., 1995). Elle fait partie de la grande famille de protéines d'échaffaudage, «Membrane-associated guanylate kinases»(MAGUKs) et comprend plusieurs domaines protéiques (3 domaines PDZ, un domaine SH3, un Hook domaine, un domaine guanylate kinase(GUK) inactif et un domaine L27 en N-terminal). De ce fait, de nombreux interacteurs ont été identifiés, impliquant Dlg1 dans de multiples fonctions. Notamment, il a été montré que Dlg1 interagit avec la *myotubularin-related protein 2* (MTMR2) ((**27**) A.Bolino et al., 2004). Or la mutation de cette protéine est la cause de la maladie de Charcot-Marie-Tooth (CMT) de type 4B1. Cette neuropathie se traduit notamment par un excès de myéline sous forme d'accumulations focales dans les CSm des nerfs périphériques. C'est pourquoi Dlg1 fut mon premier choix parmi les divers gènes régulant la polarité cellulaire. Dans la CSm, cette protéine est exprimée et localisée dans la région ab-axonale, la région la plus externe des incisures et dans les boucles paranodales (Fig.E1 A)

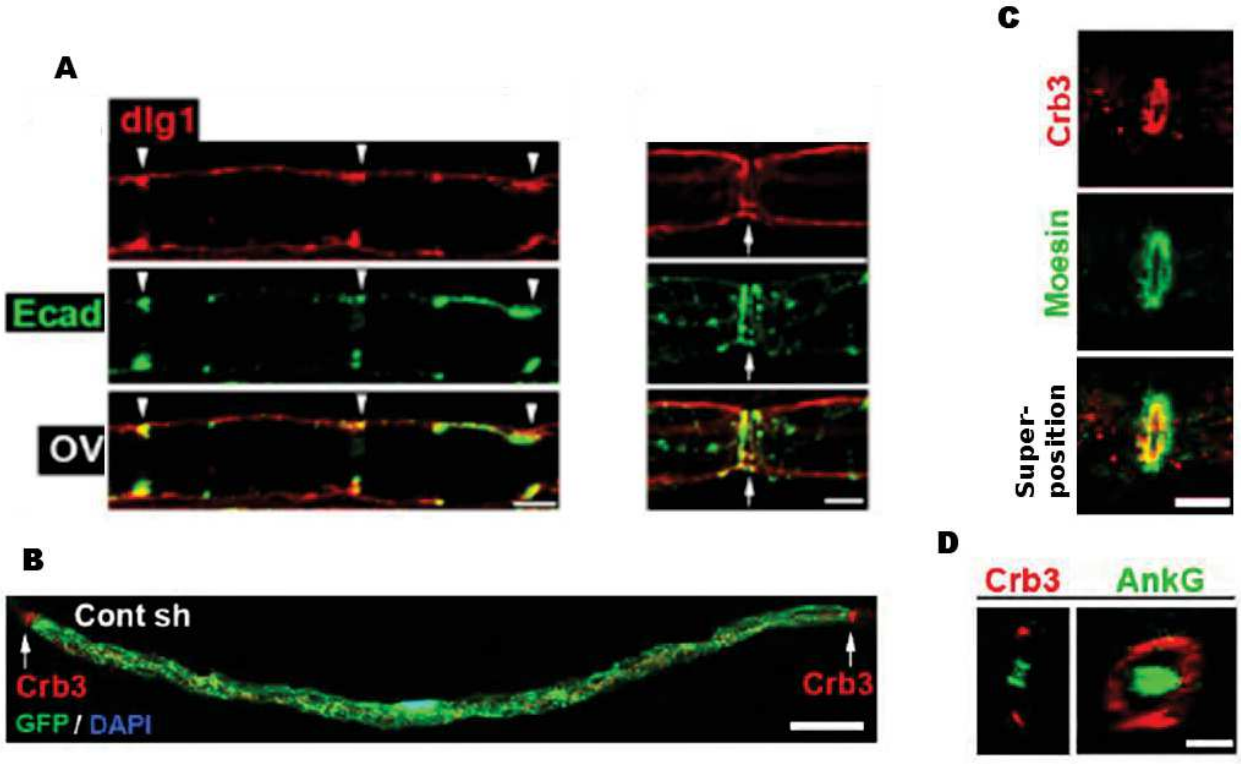

Figure E1 Localisation des protéines Crb3 et Dlg1 dans la cellule de Schwann myélinisante

(A) Immuno-marquage de Dlg1 (rouge) dans une fibre isolée de nerf sciatique de souris mature (âgée de 2 mois) montre sa distribution dans le domaine ab-axonal. La distribution de l'E-cadhérine (Ecad, vert) connue pour marquer les jonctions adhérentes de la limite externe des inscisures de Schmit-Lanterman et des boucles paranodales, a été prise comme référence. (Panneaux de droite) Dlg1 partiellement colocalise avec l'E-cadhérine au niveau de jonctions adhérentes des incisures deSchmit-lanterman (triangles blanc). (Panneaux de gauche) Au niveau paranodal, Dlg1semble être localisée principalement dans la région externe des boucle paranodales mais un marquage interne est aussi observé. Les flèches blanches indiquent le noeud de Ranvier. Barre d'échelle: 5µm (gauche) et 2.5µm (droite).

(B) Immuno-marquage de Crb3 (rouge) dans une cellule de Schwann myélinisante infectée par un virus contrôle (ARNsh contrôle, GFP (vert)). Crb3 se visualize comme une fine bande aux extrémités de la cellule, typique du marquage des microvillosités. Barre d'échelle: 100µm.

(C) Crb3 (rouge) colocalise avec la moésine (vert), un marqueur des microvillosités. Barre d'échelle: 5µm.

(D) Image de gauche, Crb3 (rouge) est exprimé dans les microvillosités qui entourent le nœud de Ranvier (AnKG,vert) imagé par un unique scan par microscopie confocale. Panneau de droite, Projection de multiples scans confocal qui montre que Crb3 (rouge) entoure le nœud de Ranvier (vert). Barre d'échelle: 5µm;

La stratégie *in vivo* décrite plus haut nous a donc permis d'introduire, à un stade précoce de la myélinisation (3 à 5 jours après la naissance), des ARNsh dirigés contre Dlg1 couplés à la protéine fluorescente GFP, spécifiquement dans les CS du nerf sciatique de souris. Trois semaines après l'infection virale, l'analyse des nerfs montre que les cellules de Schwann infectées contiennent significativement moins de Dlg1 en comparaison avec les cellules avoisinantes non-infectées. De plus, le taux d'autres protéines, comme la E-cadhérine, aussi exprimées dans la CS est inchangé (Fig E2 A). L'analyse des nerfs une fois matures, deux mois après l'injection, révèle une augmentation de l'épaisseur de la myéline produite par les CSm dans lesquelles Dlg1 a été effacée par rapport à celle produite par des cellules infectées par des virus contrôles (Fig E2 B et C; 9.3±0.2 µm vs 7.1±0.3µm, $P=5.6x10^{-7}$). Cependant, la longueur moyenne est inchangée (Fig.2C, 347±11µm vs 363±19µm, P=0.49). En outre, l'effet constaté ne vient pas de l'axone mais de la CS elle-même, car sur un même axone, seules les cellules "sans" Dlg1 sont plus épaisses (Fig E2 D).

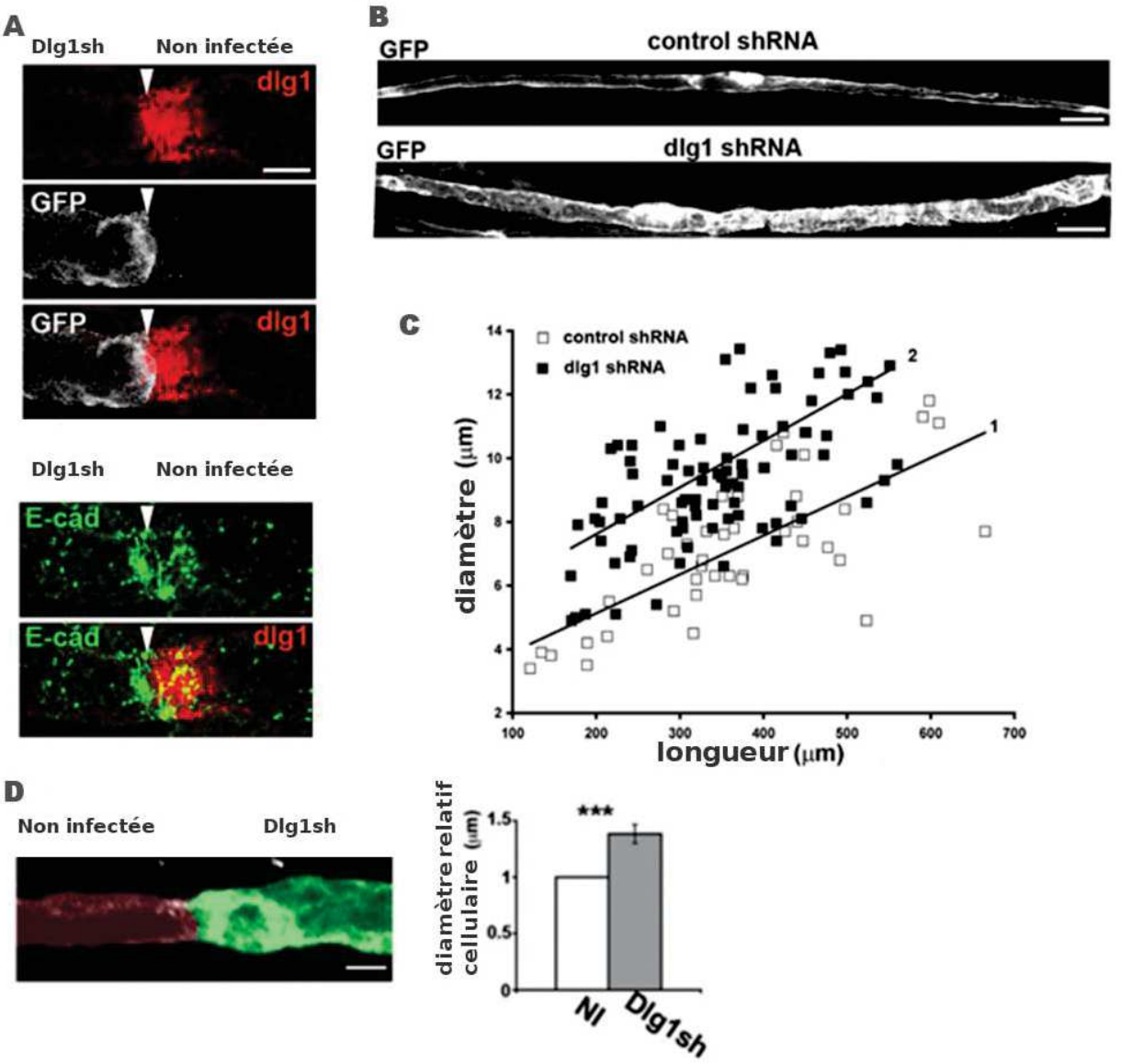

Figure E2 Effet de l'effaçage de dlg1 sur des cellules de Schwann in vivo.

(A) *Panneau du haut*: au noeud de Ranvier (triangle blanc), une cellule infectée avec des ARNsh dirigés contre Dlg1 (dlg1sh) exprime la GFP (blanc) et a un niveau d'expression réduit de Dlg1 comparé à une cellule non-infectée adjacente. Barre d'échelle: 5um. *Panneau du bas*: dans la cellule infectée avec des ARNsh contre Dlg1 (dlg1sh), seul Dlg1 (gauche) et non E-cadhérine (droite) a une expression réduite par rapport aux cellules non infectées (NI).
(B) Une cellule infectée avec des ARNsh dirigé contre Dlg1 (dlg1sh) (panneau du bas) ont un diamètre moyen plus grand que les cellules infectées avec des ARN contrôles (barre d'échelle: 20um).
(C) Graphique montrant la relation entre diamètre versus longueur des cellules de Schwann infectées. Les droites correspondent à la régression linéaire pour les valeurs obtenues avec les virus contrôles (1) et ceux avec les ARNsh dirigés contre Dlg1 (2) (n=87(Dlg1), 43 (contrôle). Des résultats similaires ont été obtenus avec deux différents ARNsh contre Dlg1.
(D) *A gauche*, image d'un noeud de Ranvier avec une cellule épaissie infectée avec un ARNsh contre Dlg1 (vert) et la cellule adjacente, infectée avec un ARNsh contrôle (NI,rouge). *A droite*, Graphique représentant la valeur du diamètre des cellules infectées avec un ARNsh contre Dlg1 et un ARNsh contrôle, tout deux normalisé par la valeur des ARNsh contrôle (±SEM; n=5 nodes; P= 0.037). Test statistique utilisé : Test de Student bilatéral. Significativité ; *** = P<0.001,

Par microscopie électronique, nous avons analysé la structure des gaines de myéline produites par les CS infectées avec des ARNsh dirigés contre Dlg1. Pour ce faire, le marqueur fluorescent a été remplacé par la *placental alkaline phosphatase* (PLAP) (Fig. E3 A). La structure de la myéline infectée, plus précisément de la myéline compacte est normale (Fig E3 C et D). La seule différence avec la myéline contrôle réside dans le fait que celle-ci est plus épaisse (Fig E3 A). En effet, le *g-ratio*, le rapport entre le diamètre axonal divisé par le diamètre total de la fibre, est significativement réduit sans que le diamètre moyen de l'axone varie (10.7±0.4um vs 11±0.2um, P=0.5). Cela montre que les cellules où l'expression de Dlg1 est diminuée, forment une gaine de myéline plus épaisse en augmentant le nombre de fois où elles enroulent leur membrane autour de l'axone.

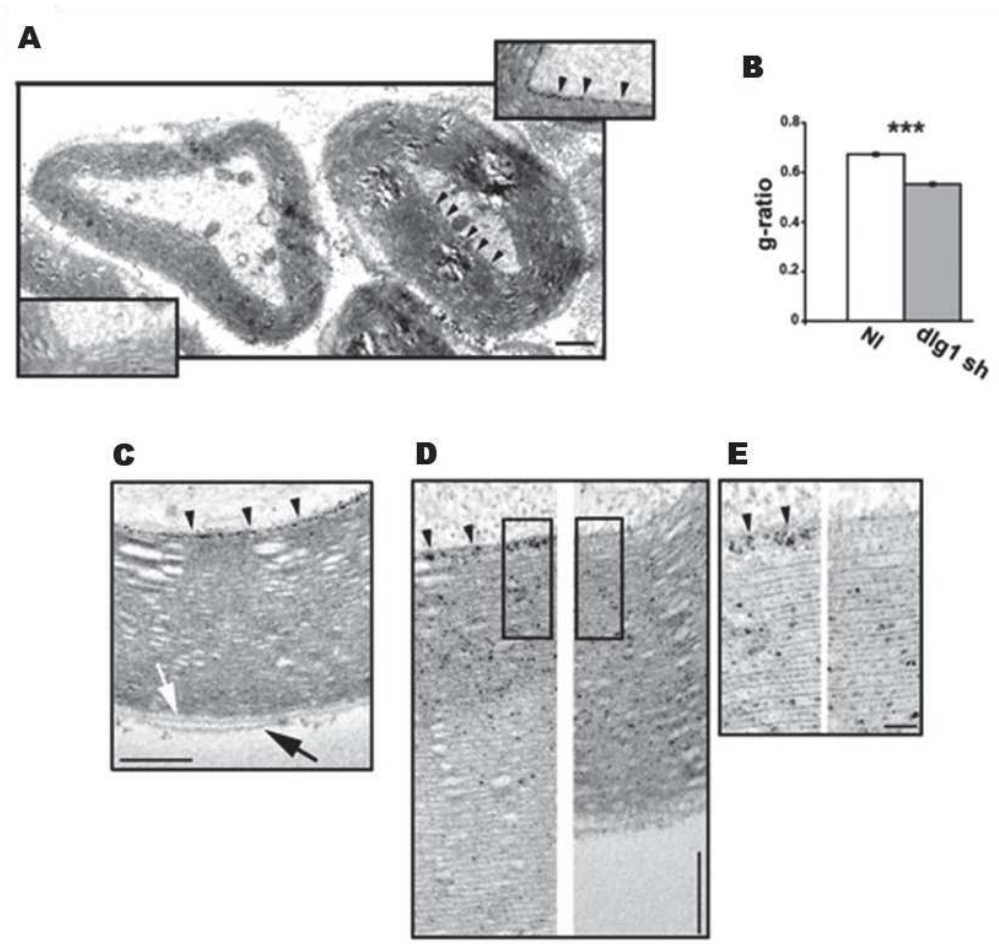

Figure E3 Effet de «l'effaçage» de Dlg1sur la structure de la myéline compacte.

(A) Image d'une cellule de Schwann infectée avec un ARNsh contre Dlg1 et marquée grâce a PLAP**.** Le marquage est visible à l'interface entre la myéline et le neurone (flèches). Les encarts montrent plus précisément le marquage, à gauche, d'une cellule infectée et l'absence de marquage , à droite, dans une cellule non infectée. Barre d'échelle: 1um.
(B) Quantification du g-ratio moyen de cellules infectées (dlg1sh) et non-infectées (NI) (± SEM; n= 111 (dlg1), 172 (NI); P= $3.95x10^{-34}$)
(C) Analyse de la région ab-axonale d'une CSm infectée (dlg1sh). La structure de la myéline compacte est régulière (flèche blanche) et la lame basale est présente (flèche noire). Barre d'échelle: 200nm.
(D) Image de la région ad-axonale d'une cellule de CSm infectée (à gauche) et non-infectée (à droite). Barre d'échelle: 200nm.
(E) Agrandissement de la photo précédente: Barre d'échelle 40nm.
Test statistique utilisé : Test de Student bilatéral. Significativité ; *** = P<0.001,

D'autre part, nous avons aussi testé la surexpression de Dlg1 dans les CS du nerf sciatique murin. Pour ce faire, nous avons surexprimé Dlg1 fusionné avec la GFP ou la GFP seule. Deux mois après l'injection, les nerfs sont analysés. Les cellules de Schwann dans lesquelles nous avons surexprimés seulement la GFP sont majoritairement devenues des cellules myélinisantes tandis que celles surexprimant Dlg1 sont non-myélinisantes. Cela suggère que la surexpression de Dlg1 perturbe la myélinisation alors que son effacement tend à activer ce processus. Ainsi, tous nos résultats indiquent que, *in vivo*, Dlg1 est un inhibiteur de la myélinisation.

Comme rappelé auparavant, au niveau moléculaire, la myélinisation est stimulée par la protéine transmembranaire axonale, Neuréguline-1 de type III. Cette dernière active les récepteurs ErbB2/3 de la CS, et cela active la voie de signalisation PI3K-AKT. Pour comprendre la fonction de Dlg1 dans la myélinisation, nous avons testé si Dlg1 pouvait interférer avec l'activation d'AKT. Pour ce faire, nous avons effacé Dlg1, *in vitro*, dans des cultures de CS (Fig E4 A) mais aussi *in vivo* (Fig E4 B). Dans ces deux conditions expérimentales, cela augmente de manière significative l'activation d'AKT. De plus, la diminution de l'expression de Dlg1, potentialise l'activation d'AKT suite à une stimulation à la Neuréguline-1 (Fig E4 C). Cela montre que, dans la CS, Dlg1 inhibe l'activation d'AKT induite par la neuréguline-1.

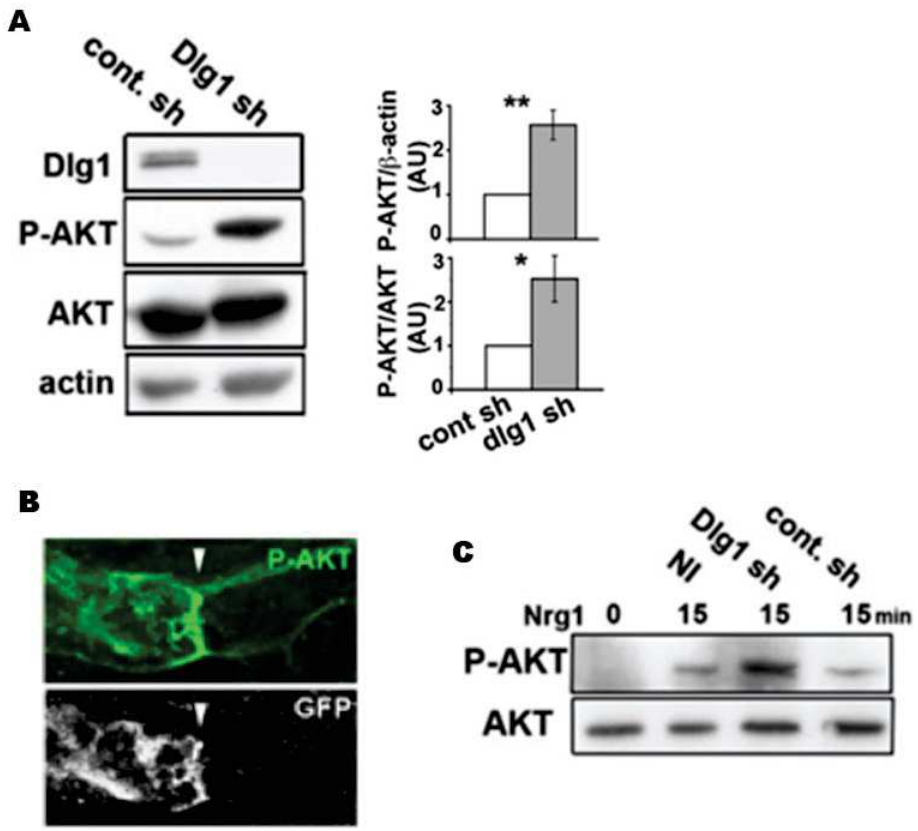

Figure E4 Inhibition de l'activation d'AKT par dlg1

(A) Analyse par Western blot de l'expression d'AKT phosphorylé (P-AKT) dans des cultures de cellules de Schwann de rat infectées avec des ARNsh contrôles ou des ARNsh dirigés contre Dlg1 (dlg1sh). Les cellules dans lesquelles Dlg1 est diminué exprime plus d'AKT phosphorylé.
Le graphe de droite correspond à la quantification des blots: Il indique la quantité de P-AKt normalisé par la quantité d'AKT ou d'actine respectivement (±SEM; n=3; P= 0.0093 (vs actine), 0.044 (vs AKT)).
(B) Au niveau d'un nœud de Ranvier (triangle blanc) une cellule infectée avec des virus dirigés contre Dlg1 (dlg1sh) exprime plus de P-AKT que la cellule adjacente non-infectée.
(C) Les cellules de Schwann en culture stimulées à la neuréguline-1 durant 15 minutes, dans lesquelles l'expression de Dlg1 est diminuée, génèrent plus de P-AKT que les cellules non-infectées (NI). AKT est utilisé comme témoin de charge.
Test statistique utilisé : Test de Student bilatéral. Significativité ; * = P<0.05, ** = P<0.01

De plus, il a été démontré que Dlg1 en interagissant directement avec la *phosphatase with sequence homology to tensin* (PTEN) ((**28**) Adey N. B. et al., 2000), (**29**) Contreras-Paredes A et al., 2008) est un inhibiteur de l'activation d'AKT.

Dans les CS, PTEN co-immunoprécipite avec Dlg1 tant *in vitro* qu'*in vivo*, à partir de lysats de nerf sciatique murin (Fig E5 A et B). De plus, la diminution de Dlg1 dans des cultures *in vitro* réduit la quantité de PTEN dans les cellules tandis que l'expérience inverse,

la surexpression de Dlg1, aboutit au résultat inverse (Fig E5 C). Cela suggère que Dlg1 contrôle la quantité de PTEN dans la CS. Nous avons aussi observé que la stimulation à la Neuréguline-1 augmente rapidement le taux de Dlg1 et PTEN dans les cellules (Fig E5 D), augmentant par la même occasion la formation de complexes Dlg1-PTEN (Fig E5 E).

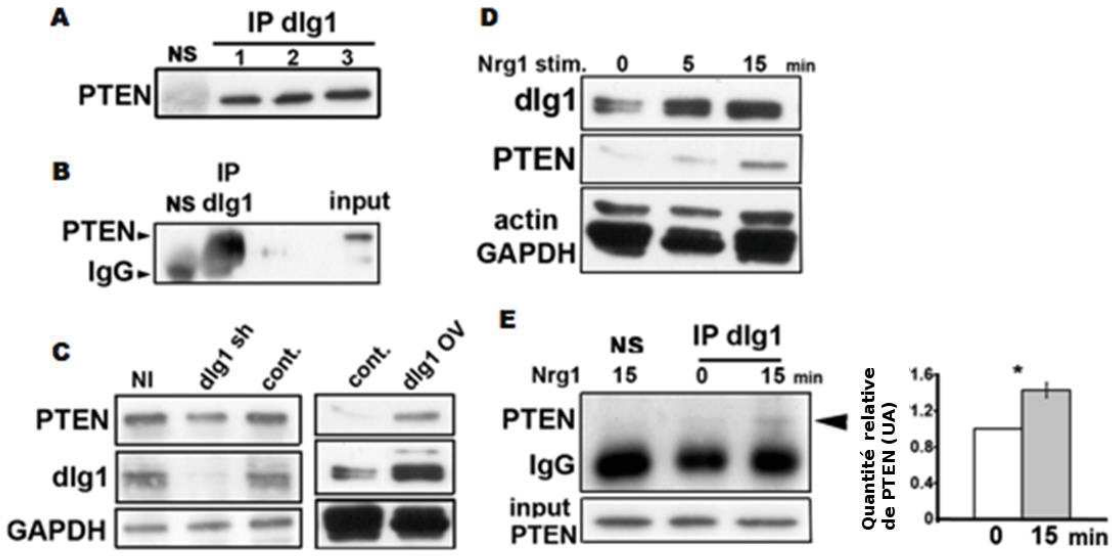

Figure E5 Interaction entre Dlg1 et PTEN

(A)-(B) PTEN co-immunoprécipite avec Dlg1 (IP dlg1) mais non avec un sérum non-immun (NS) dans des cellules de Schwann RT4 en culture **(A)** et dans des nerfs sciatiques de rats,âgés de 20 jours (**B**).
(C) *Panneau de gauche*: la quantité de PTEN diminue dans des cellules où Dlg1 est diminué (dlg1 sh) et (*panneau de droite*) est augmentée dans des cellules où dlg1 est surexprimée (dlg1 OV).
(D) La stiulation avec la Neuréguline-1 (Nrg1 stim) de CS de rat en culture augmente la concentration cellulaire de Dlg1 et PTEN après 5 et 15 minute de stimulation respectivement.
(E) Les cellule de Schwann de rat sont stimulées avec la Neuréguline-1 pendant15 minute ou non, avant une extraction de protéines et une immunoprécipittion de Dlg1(IPdlg1). Plus de PTEN sont co-immunoprécipité avec Dlg1 lorsque les cellules sont stimulées.
Le graphique représente la quantité relative de PTEN co-immunoprécipité à partir de cellules stimulées ou non (±SEM; n=3; P = 0.034). PTEN n'est pas détectée quand du sérum non immunogène est utilisé.
Test statistique utilisé : Test de Student bilatéral. Significativité ; * = P<0.05,

L'augmentation rapide du taux de Dlg1 et PTEN suite à une stimulation à la Neuréguline-1 (Fig E5 D) et le fait que cela ne peut être bloqué par l'ajout de cycloheximide, un inhibiteur de la traduction des ARNm (Fig E6 A), suggère que l'action de la Neuréguline-1 empêche la dégradation de Dlg1, PTEN. En effet le blocage du protéasome, dans les CS, augmente la quantité de Dlg1 et PTEN (Fig E6 C) mais aussi d'AKT (données non montrées)., cela indique que ces protéines sont dégradées par cette voie. En condition «non-stimulé», toutes

ces protéines sont ubiquitinilées et le blocage du protéasome, augmente leur ubiquitinilation (Fig E6 D). Quand les cellules, dans lesquelles le protéasome est bloqué, sont stimulées avec la Neuréguline-1, la quantité de Dlg1 et PTEN ubiquitinilé est moindre (Fig E6 D) alors que celle d'AKT ubiquitinilée est inchangée (données non montrée). Cela indique que la Neuréguline-1 empêche spécifiquement l'ubiquitinilation de Dlg1 et PTEN et par conséquent leur dégradation. Au final cela explique l'augmentation de la formation du complexe Dlg1-PTEN suite à la stimulation à la Neuréguline-1.

Nous avons ensuite cherché la voie de signalisation qui, activée par la Neuréguline-1, prévient la dégradation de Dlg1 et PTEN. Pour ce faire, plusieurs voies de signalisation ont été testées : La voie PI3K-AKT, et celle impliquant les Mitogen-activated protein kinases (MAPK), toutes deux connues pour être activées par la Neuréguline-1 dans les SC mais aussi la voie dépendante de la protéine kinase A (PKA) impliqué dans le contrôle de la myélinisation. L'inhibition des voies PI3K-AKT et MAPK n'impacte pas l'augmentation de la formation du complexe Dlg1-PTEN suite à une stimulation à la Neuréguline-1 (Fig E6 B). Seule l'inhibition des récepteurs ErbB2/3 ou de la PKA empêche l'augmentation de la formation de ce complexe (Fig E6 A, E6 B). Cela indique que la Neuréguline-1 stabilise le complexe Dlg1-PTEN via l'activation des récepteur ErbB2/3 et l'action de voie de signalisation impliquant la protéine kinase A (PKA).

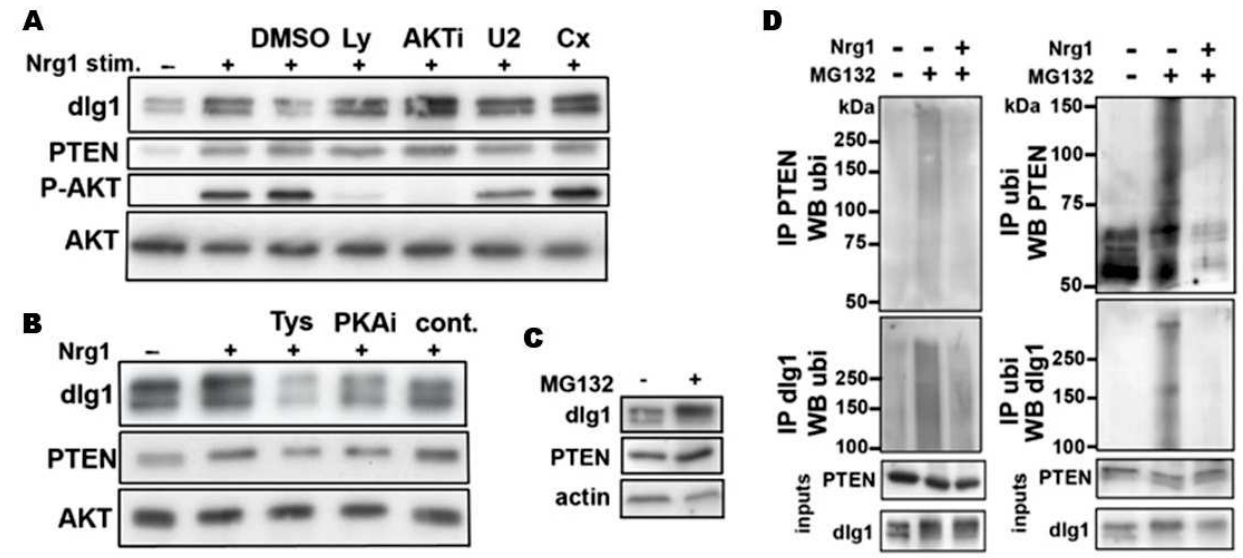

Figure E6 voie de signalisation impliquée dans l'augmentation du complexe dlg1-PTEN induite par la neuréguline-1

(A)-(B) Des culture de cellules de Schwann sont traitées ou non avec la neuréguline-1 (20nM, durant 15 minutes) et un contrôle (DMSO 1%) ou (**A)** des inhibiteurs de la PI3Kinase (Ly; Ly294002; 20 μM), de AKT (AKTi; AKT 1/2 inhibitor; 10 μM), de la MAPK inase (U2; U0126; 20 μM), de la traduction (cycloheximide, Cx; 10 μg/ml),ou **(B)** des récepteurs ErbB2 (Tys, tyrsphostin AG825, 1mM), de la PKA (PKAi, PKA 6-22 amide, 500nM), de la kinase p38 (cont., SB203580, 20μM). Puis l'expression de DLG1, PTEN, AKT et P-AKT est analysé par western blot. Les blots montrés sont représentatifs de 3 expériences indépendantes. L'expression de Dlg1 et PTEN augmente après la stimulation à la Neuréguline-1. L'inhibition de la PI3K et d'AKT, empêche l'activation d'AKT (P-AKT) mais non l'augmentation de Dlg1 et PTEN. Les inhibiteurs des récepteurs ErBb2 et de PKA bloquent fortement ou partiellement l'augmentation de Dlg1 et PTEN.
(C) L'activité protéosomale est inhibée dans des CS en culture en utilisant du MG132 (10uM durant 18h). Sur le blot, nous observons une augmentation de dlg1 et PTEN. Les blots montrés sont représentatifs de 2 expériences indépendantes.
(D) Des cellules de Schwann en cultures sont traitée avec du MG132 avec et sans neuréguline-1 durant 18 heures. La quantité de dlg1 et PTEN ubiquitinilé sont détecé par immunoprécipitation de l'une ou l'autre protéine puis immunobloté avec un anticorps anti-ubiquitine (panneau de gauche) ou inversement, en immunoprécipitant les protéines ubiquitinilées et en immunoblottant Dlg1 ou PTEN (panneau de droite).

Lors du développement du nerf sciatique de la souris, c'est la stimulation axonale via la Neuréguline-1 de type III qui stimule la myélinisation. Ce phénomène est finement régulé car environ 2 semaines après la naissance, l'épaisseur de la myéline commence à tendre vers son optimum. Expérimentalement, l'accumulation de myéline peut être illustrée par le taux d'expression de la protéine P0 (Fig E7 A) et l'action de la Neuréguline-1 est mise en évidence par l'activation de la voie de signalisation d'AKT, plus précisément en mesurant le taux de phosphorylation d'AKT (Fig E7 A). La quantité de Dlg1 et PTEN augmente aussi durant les deux premières semaines de vie chez la souris (Fig E7 A) cela confirme nos données *in vitro* et semble indiquer que la Neuréguline-1 stabilise Dlg1 et PTEN durant la myélinisation *in vivo*. En effet, la quantité de Dlg1 et PTEN polyubiquitinilé baisse au court du processus myélinisation (Fig E7 B) et les souris mutantes surexprimant la Neuréguline-1ont plus de Dlg1dans leur nerf sciatique que les souris contrôles (Fig E7 C et D).

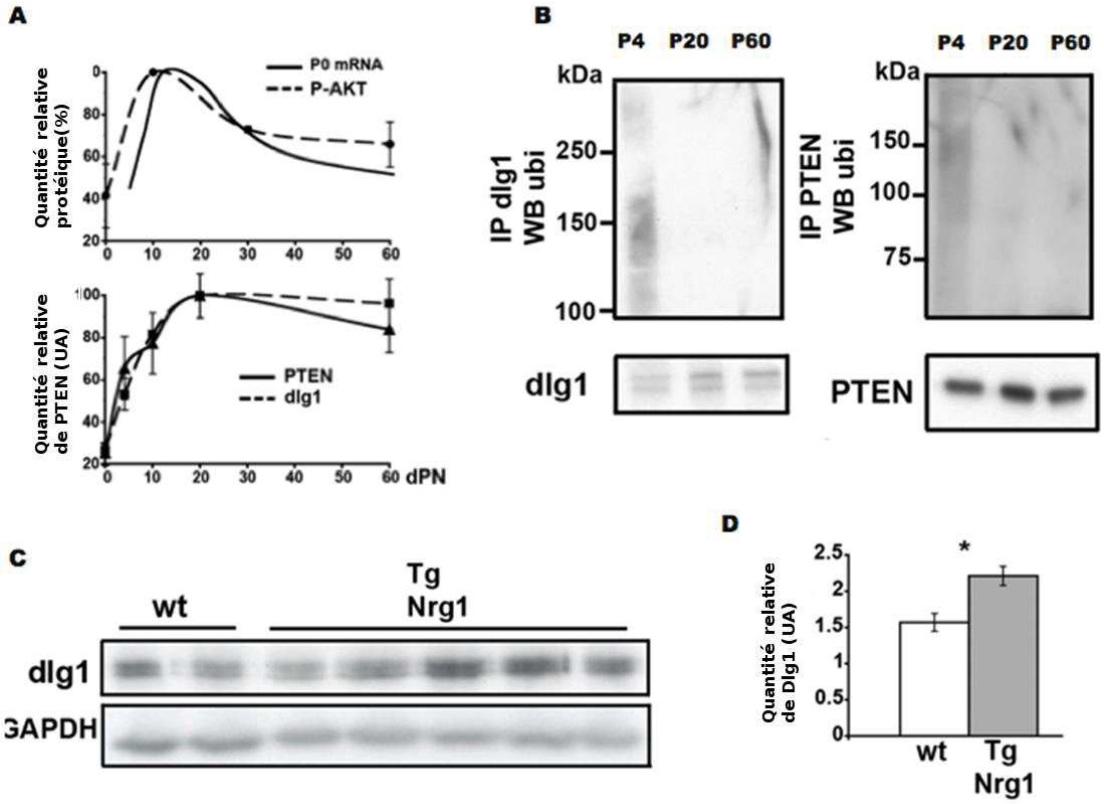

Figure E7 Effet de la Neuréguline-1 sur l'expression de Dlg1 et PTEN au cours de la myélinisation in vivo dans le nerf sciatique

(A) Quantité relative de Dlg1, PTEN et P-AKT est analysé durant la myélinisation (±SEM;n= 3 ou plus). Les données concernant la quantité d'ARNm de la protéine zéro (P0) provident d'un travail antérieur (cf. N. Stahl, J. Harry, B. Popko, Brain Res. Mol. Brain Res. 8, 1990). L'expression maximale est prise comme référence. Les courbes représentent l'extrapolation des courbes de régressions.
(B) Les nerfs ont été collectés 4 jours (P4), 20 jours (P20) ou 60 (P60) jours après la naissance puis les protéines ont été solubilisés. La quantité de Dlg1 et PTEN ubiquitinilé ont été détectées par immunoprécipitation respective de ces deux protéines et détecté à l'aide d'un anticorps anti-ubiquitine. Les blots présentés sont représentatifs de 2 expériences indépendantes.
(C) Les protéines de nerfs sciatique de souris sauvage (WT) ou transgéniques surexprimant la Neuréguline-1 de type 3 (Tg Nrg1) recueillis 60 jours après la naissance ont été solubilisés. La quantité de Dlg1et de GAPDH ont été évaluées pour chaque souris par western blot.
(D) Quantification des blots; la quantité de Dlg1 est normalisée par GAPDH. Les barres d'erreur montrent la SEM, P=0.033.
Test statistique utilisé : Test de Student bilatéral. Significativité ; * = P<0.05,

Bien que le processus de myélinisation se déroule sur plusieurs mois, le degré de myélinisation et l'activation d'AKT fléchissent environ deux semaines après la naissance (Fig E7 A). Cette inhibition de la myélinisation intervient quand la quantité de Dlg1 et PTEN atteint un pic (Fig E7 A) ce qui renforce le rôle présumé de Dlg1 dans la limitation de la myélinisation. Pour vérifier le rôle de PTEN, nous l'avons effacée, *in vivo* dans les CS du nerf sciatique de souris. Comme attendu, la réduction de l'expression de PTEN est corrélée avec

une augmentation du taux de P-AKT dans les cellules infectées (Fig E8 A). De plus, en comparant les cellules de Schwann de longueurs similaires, nous observons que les cellules infectées avec un ARNsh dirigé contre PTEN élaborent une gaine de myéline plus épaisse que les cellules contrôles (Fig E8 C) (7.6±0.3µm vs 6.1±0.3µm; longueur<405µm; P=0.003). Ainsi tout comme l'inhibition de Dlg1, l'inhibition *in vivo* de PTEN induit une sur-myélinisation. Cela indique que ces deux facteurs coopèrent pour inhiber la myélinisation.

Nous avons aussi testé si, *in vivo*, AKT, la cible de Dlg1 et PTEN, est nécessaire à la myélinisation des cellules de Schwann. Trois isoformes d'AKT ont été isolé ((**30**) Hanada et al., 2004) chez les mammifères. Parmi elles, deux (AKT1 et 2) sont exprimées de façon ubiquitaire. C'est pourquoi, nous avons exprimé des ARNsh contre AKT1 et AKT2 dans les cellules de Schwann myélinisante *in vivo*. L'effacement de ces deux isoformes produit une gaine de myéline plus courte (Fig E8 D) et des signes de démyélinisation (Fig E8 B) montrant de ce fait leur importance dans le processus de myélinisation et la maintenance de la gaine de myéline. Seule, les cellules dans lesquelles l'isoforme AKT2 a été effacé produit des gaines de myéline de diamètre réduit par rapport à des cellules contrôles de même longueur (Fig E8 D). Cela suggère qu'AKT2 est impliqué dans la mise en place correcte et la maintenance de la myéline alors qu'AKT1 est essentiellement requis pour sa maintenance.

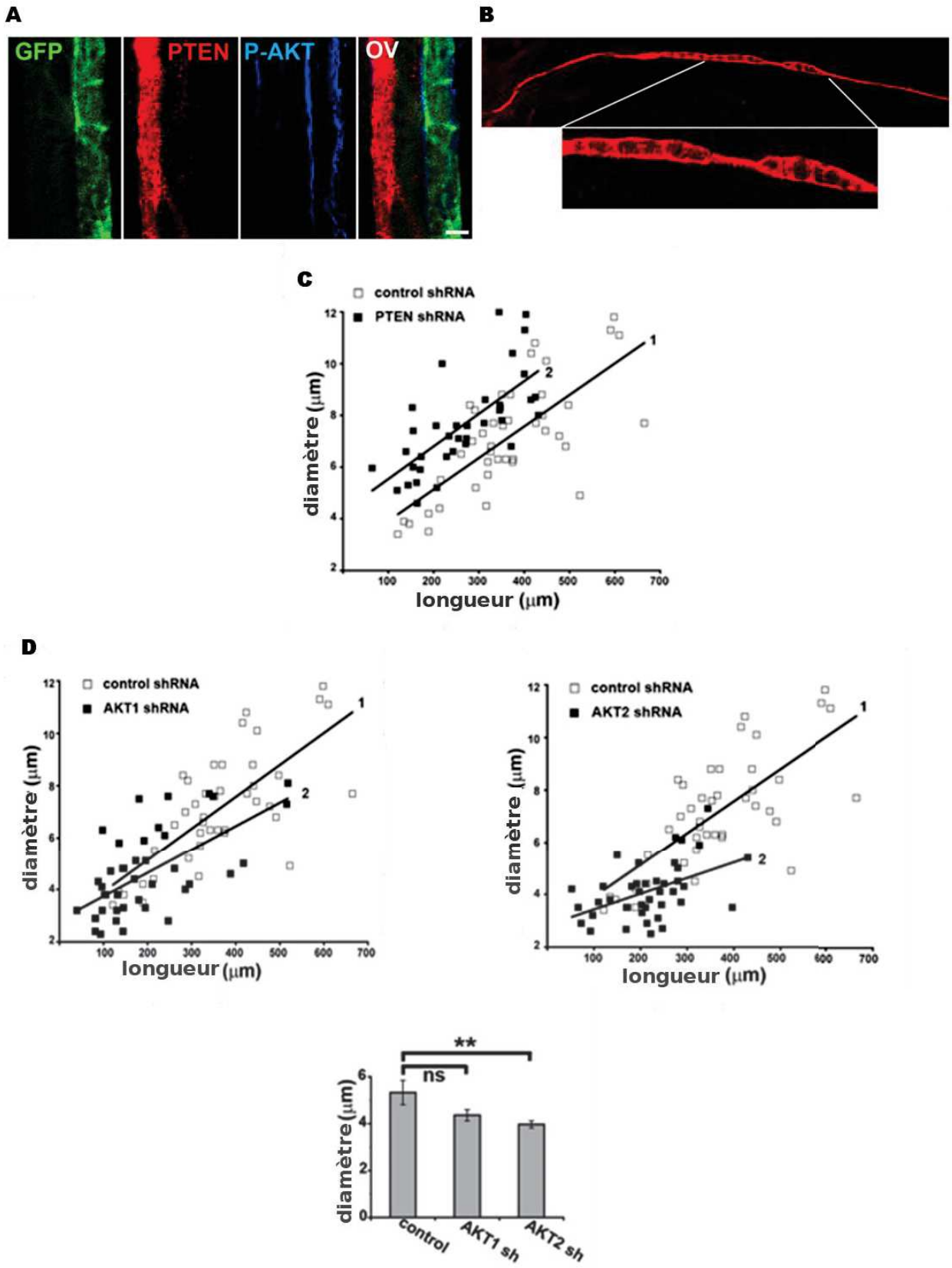

Figure E8 Effet de l'effacement *in vivo* de PTEN et d'AKT sur la cellule de Schwann

(**A**) Image d'une partie de segment de myéline de deux segments parallèles. La cellule de droite, infectée par un virus contenant un ARNsh contre PTEN exprime la GFP (vert) et très peu PTEN

(rouge) en comparaison avec le second segment d'une cellule non infectée. Cependant, l'expression de P-AKT (bleu) est augmentée dans la cellule infectée.OV = superposition.
(B) Image représentative d'une cellule de Schwann démyélinisante qui exprime un ARNsh contre AKT1 couplé à la Dsred. La structure en forme de corde à l'endroit où la myéline compacte disparaît et la structure en billes dans les régions où la myéline se détache sont caractéristiques de fibres démyélinisantes.
(C) Graphique mettant en relation le diamètre et la longeur de cellules de Schwann infectées avec un virus contenant un PTENsh (carré noir) ou un virus contrôle (carré blanc). Les droites représentent la régression linéaire des valeurs des contrôles (1) et des cellules contenant des ARN sh contre PTEN (2). n=37 (PTEN), 42 (contrôle).
(D) Graphique mettant en relation le diamètre et la longeur de cellules de Schwann infectées avec un virus contenant un AKT1sh(gauche) ou AKT2sh (droite) (carré noir) ou un virus contrôle (carré blanc). Les droites représentent la régression linéaire des valeurs des contrôles (1) et des cellules contenant des ARN sh contre AKT1 ou AKT2 (2).
Graphe en bas: Diamètre moyen des cellules de tailles similaire (≤ 300µm) (±SEM; n=33 (AKT1), 37 (AKT2, 12 (control); P=0.063 (AKT1), 0.0011 (AKT2)).
Test statistique utilisé : Test de Student bilatéral. Significativité ; ** = P<0.01, ns= non signficatif P>0.05.,

Nos résultats indiquent qu'un mécanisme moléculaire amorcé par la Neuréguline-1 et impliquant Dlg1 et PTEN régule le taux de myélinisation pour prévenir une sur-myélinisation suite à la stimulation par la Neuréguline-1 (Fig E9 B). Il s'agirait d'un mécanisme de « freinage » de la myélinisation. Cependant, la myélinisation est aussi régulée par la quantité de Neuréguline-1 exprimée par l'axone ou par le nombre de récepteurs ErbB2/3 disponible à la surface de la CS. Pour tester l'importance physiologique de Dlg1 dans le "freinage" de la myélinisation, nous avons effacé Dlg1 dans les CSm, 20 jours après la naissance, moment où le taux de myélinisation stagne. Trois semaines plus tard, nous observons que les CSm dans lesquelles Dlg1 a été effacé produisent une gaine de myéline significativement plus épaisse que les cellules contrôles (8.5±0.3µm vs 5.3±0.2µm; $P=1x10^{-11}$) (Fig.9A). Cela montre que le mécanisme stimulant la myélinisation de la cellule de Schwann est toujours actif même quand le taux de myélinisation baisse. Le frein engendré par Dlg1 est par conséquent le principal mécanisme qui stoppe la myélinisation à cette période. Quand la sur-myélinisation perdure plus longtemps (si les nerfs sont prélevés 6 semaines après l'injection), les cellules de Schwann démyélinisent et seulement les plus petites CSm subsistent (résultats non montrés). Cela suggère que la myéline devient instable quand la gaine est trop épaisse.

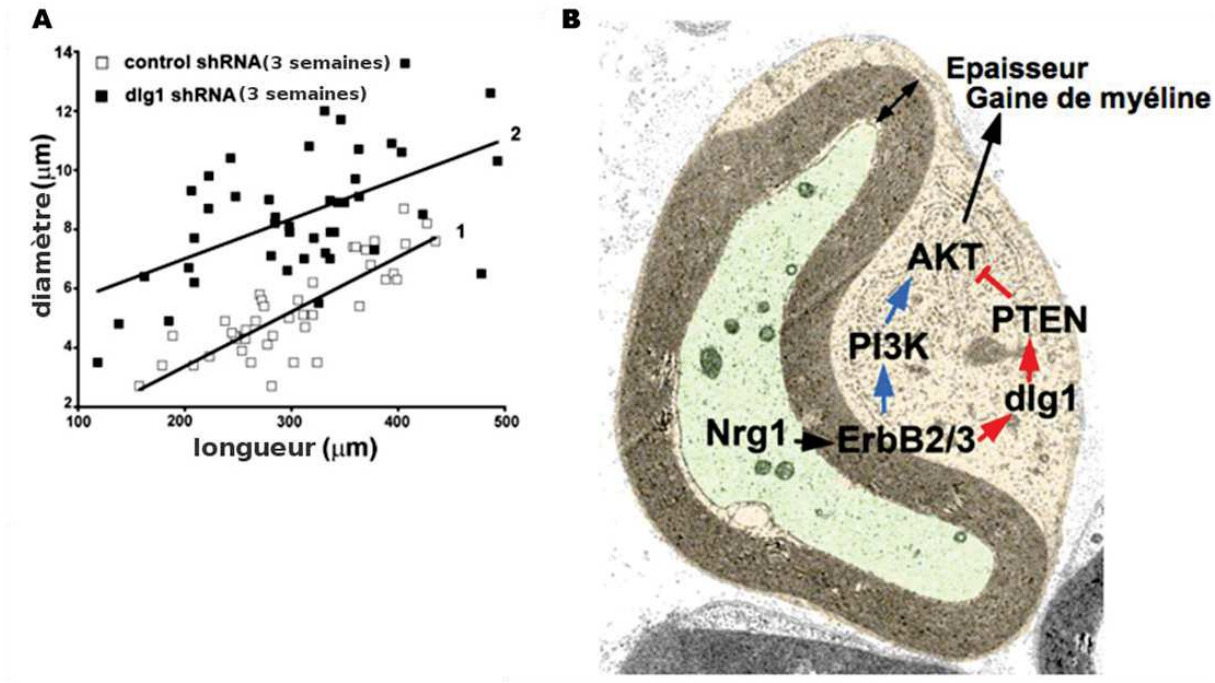

Figure E9 Effet de l'effaçage de Dlg1 dans la période où la myélinisation stagne

(A) Des adénovirus exprimant des ARNsh contre Dlg1ou des ARNsh contrôles ont été infectés une fois que le taux de myélinisation diminue (20 jours après la naissance). Le graphique met en relation le diamètre et la longueur de cellules de Schwann infectées avec un virus contenant un dlg1sh (carré noir) ou un virus contrôle (carré blanc) 3 semaines après l'injection. Les droites représentent la régression linéaire des valeurs des contrôles (1) et des cellules contenant des ARN sh contre Dlg1 (2). n=43 (dlg1sh), 41 (contrôle).
(B) Schéma du mécanisme moléculaire impliqué dans l'optimisation de l'épaisseur de la gaine de myéline. La Neurégulin-1de type III (Nrg1) exprimée par l'axone (vert) stimule les récepteurs ErbB2/3 de la cellule de Schwann (orange). L'activation de ces récepteurs stimule la voie de signalisation de PI3K et AKT (flèches bleues) ce qui stimule la myélinisation et augmente l'épaisseur de la myéline. En outre la stimulation à la Neuréguline 1 stabilise Dlg1 et ainsi plus de Dlg1 peut interagir avec PTEN (flèches rouges). Dlg1 stabilise à son tour PTEN et plus de PTEN est susceptible d'inhiber l'activation d'AKT et de ce fait tempérer la myélinisation.

Comme rappelé précédemment, Dlg1 interagit avec la protéine MTMR2 qui est mutée dans la pathologie CMT4B1. Cette maladie est caractérisée par une production anormale de myéline et un dépôt hétérogène de celle-ci. Cela rend la myéline instable et aboutit à de la démyélinisation ((**31**) Bolis et al., 2005). Nos résultats montrent que dans certaines fibres l'inhibition de l'expression de Dlg1 conduit à une sur-myélinisation aberrante (FigE10 A), similaires à celles observées dans la maladie CMT4B1. Cela suggère soit que le taux, soit que la distribution ou la fonction de Dlg1 est altéré dans les CS des mutants MTMR2. Or le taux d'expression de Dlg1 est seulement très faiblement réduit dans les nerfs du modèle murin de la CMT4B1((**27**) Bolino et al., 2004) et aucun changement de distribution de cette

protéine n'a été observé. Enfin pour tester si la maladie perturbe la fonction de Dlg1, nous avons effacé cette protéine dans les cellules de Schwann de souris mutantes MTMR2. Il est intéressant de noter que le diamètre des fibres nerveuses dans lesquelles Dlg1 a été effacé n'est pas différent des fibres contrôles (diamètre: 6.4±0.µm vs 7.1±0.3µm, P=0.14) (Fig E10 B). Cela montre que dans les cellules mutantes, Dlg1 n'est plus capable d'inhiber la myélinisation. Nous suggérons donc que dans ce cas, le frein dû à l'action de Dlg1 est manquant. Cela engendre une myélinisation excessive, des défauts dans la déposition de la myéline et finalement cela explique la démyélinisation.

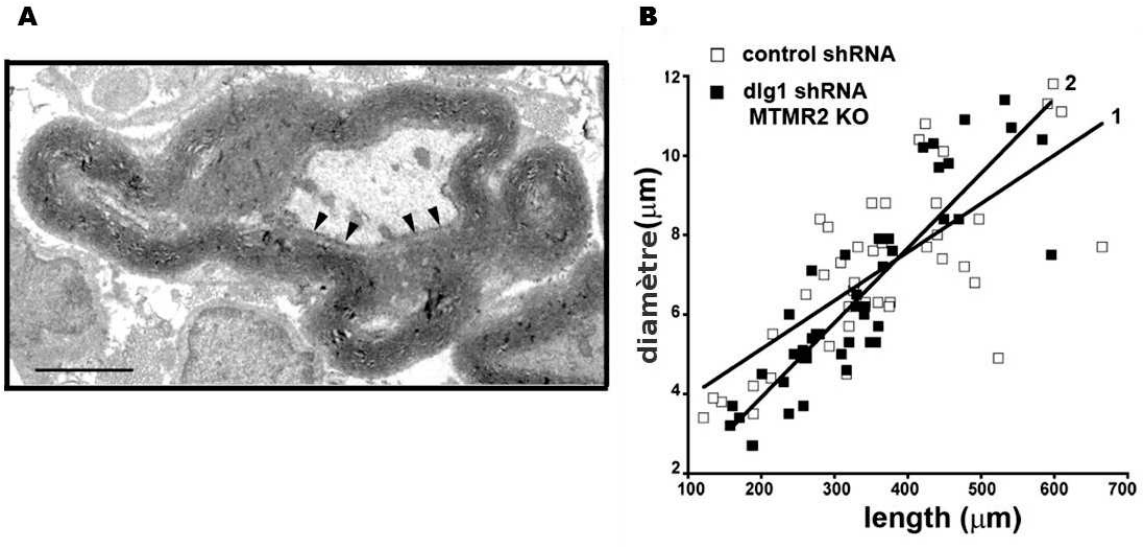

Figure E10 Effet de l'effaçage de Dlg1 chez les souris mutantes MTMR2

(A) Image par microscopie électronique d'une cellule de Schwann myélinisante exprimant des ARNsh dirigés contre Dlg1 couplés à la PLAP (flèches). Cela aboutit à une myélinisation excessive aberrante. Barre d'échelle: 2µm.
(B) Des lentivirus exprimant des ARNsh contre dlg1 ou des ARNsh contrôles ont été injectés dans des nouveau-nés de mutants MTMR2. Le graphique met en relation le diamètre et la longueur de cellules de Schwann infectées avec un virus contenant un Dlg1sh (carré noir) ou un virus contrôle (carré blanc) 20 jours après la naissance. Les droites représentent la régression linéaire des valeurs des contrôles (1) et des cellules contenant des ARN sh contre Dlg1 (2). n=45 (Dlg1sh), 42 (contrôle).

Ainsi, notre travail sur Dlg1 met en lumière un mécanisme qui permet de contrôler l'épaisseur de la gaine de myéline pour assurer une myélinisation optimale. La quantité de Neuréguline-1 exprimée par l'axone stimule deux mécanismes antagonistes (Fig. E9 B):

D’une part, cela stimule la myélinisation via l’activation d’AKT. D’autre part, cela stabilise Dlg1 qui à son tour stabilise PTEN pour finalement inhiber AKT.

-Crumb 3 (Crb3)

Dans un deuxième temps, je me suis penché sur le rôle de Crb3. Chez la Drosophile, le gène *crb* a été décrit pour la première fois en 1990. Sa mutation perturbe la polarisation épithéliale et cause une massive mort cellulaire au niveau de l’epidermal primordium ((**32**) Tepass et al., 1990). Trois homologues (Crb1 à 3) ont été identifiés chez les mammifères. Crb1 et 2 sont exprimés au niveau de la rétine et du cerveau alors que Crb3 l’est dans tous les épithélia. Crb3 est une protéine transmembranaire avec une partie extracellulaire très courte et un domaine cytoplasmique qui contient un domaine de liaison aux protéines ERMs, un domaine PDZ et un domaine SH3. Au niveau de la cellule épithéliale, Crb3 est impliqué dans la formation des jonctions serrées ((**33**) Fogg et al., 2005) et dans la ciliogenèse ((**34**) Fan et al., 2004).

Dans la CS, cette protéine est exprimée dans les microvillosités (Fig E1 B et D). Cette localisation singulière rend Crb3 très intéressante car cela peut suggérer une fonction importante dans la formation du nœud de Ranvier.

Nous avons alors introduit, *in vivo*, à un stade précoce de la myélinisation des ARNsh dirigés contre Crb3 co-exprimé avec la protéine fluorescente dsRed2 dans le nerf sciatique de souriceaux nouveau-nés. Deux mois après l'infection virale, l'analyse des nerfs montre que les CS infectées, contiennent effectivement moins de Crb3 en comparaison avec les cellules non infectées (Fig E11 A). En outre, les cellules contenant moins de Crb3 forment une gaine de myéline beaucoup plus longues que les cellules contrôles (Fig E11 B et D; 616,2±36,5 µm vs 363,2±19,8 µm, $P=8,1x10^{-7}$) sans impact sur le diamètre de la fibre nerveuse (Fig E11 D, 7,8±0,3 µm vs 7,1±0.3 µm, P=0.12). Sur un même axone cela se traduit, par un allongement de la myéline formée, uniquement par les cellules dans lesquelles l’expression de Crb3 est diminuée. Les cellules adjacentes sont de longueur conventionnelle comme l'illustre la figure montrant deux cellules adjacentes (Fig E11 E).

Nous avons aussi analysé l'effet de la diminution de Crb3 sur l'ultrastructure de la myéline par microscopie électronique (données non montrées). Aucune modification dans la structure de la myéline ou des microvillosités n'est observée. Le g-ratio (diamètre de l'axone / diamètre totale de la fibre) ne varie pas, ce qui confirme qu' *in vivo* l'épaisseur de la gaine de myéline n'est pas touchée par la «perte» de Crb3. De plus, les marqueurs des microvillosités et du nœud de Ranvier sont bien exprimés et correctement localisés (Fig. E11 F) donc ses deux structures ne sont également pas perturbées par la «perte» de Crb3. Ainsi Crb3 ne semble pas être impliqué, comme supposé initialement, dans la mise en place et la structuration du nœud de Ranvier. Mais Crb3 a un rôle dans la régulation de la longueur de la gaine de myéline.

Cet allongement des CSm peut s'expliquer par le fait que la «perte» de Crb3 influence la longueur de la CS avant le processus de myélinisation proprement dit. Nous avons testé cette hypothèse en utilisant notre modèle de myélinisation *in vitro*. Nous avons inhibé l'expression de Crb3 dans des co-cultures de neurones et de CS, sans induire la myélinisation. Cela nous a permis d'évaluer la longueur des CS pré-myélinisantes. Nous n'avons pas observé de différence de taille entre les cellules avec ou sans Crb3 (Fig E12 A et C). Cela indique que l'augmentation de taille de la gaine de myéline n'est pas due à une cause au stade pré-myélinisant. Ainsi comme la diminution de Crb3, d'une part, n'augmente pas la longueur des CS pré-myélinisantes et d'autre part, cela augmente la longueur de la gaine de myéline sans modifier son épaisseur ou l'organisation du nœud de Ranvier, nous en déduisons que Crb3 est un inhibiteur spécifique de l'élongation de la gaine de myéline au cours de la myélinisation.

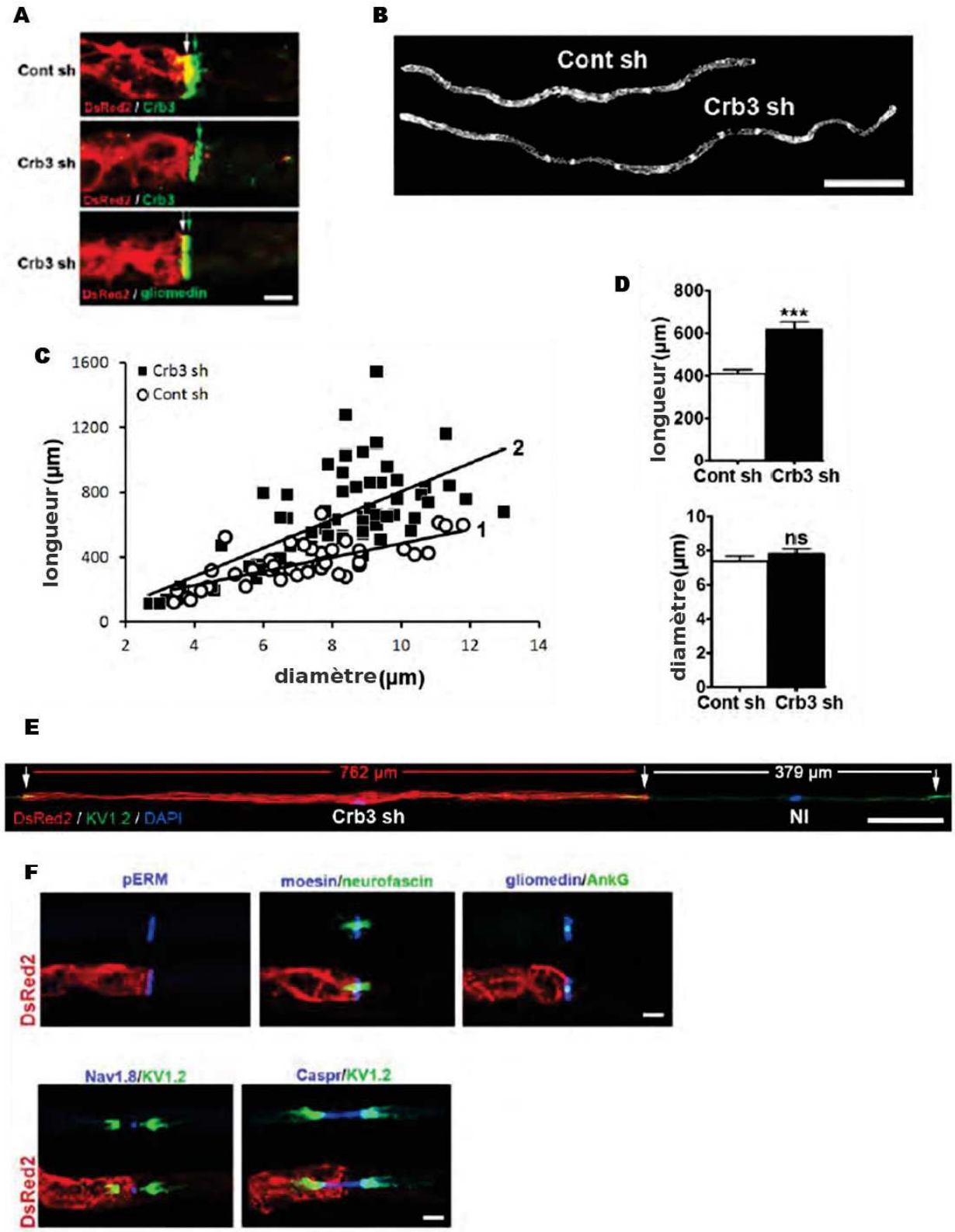

Figure E11 Effet de l'effaçage de Crb3 sur des cellules de Schwann in vivo.

(A) l'expression de Crb3 est réduit dans les cellules de Schwann infectées avec un virus contenant un ARNsh contre Crb3. Au niveau du nœud de Ranvier, l'immunomarquage de Crb3 marque les

microvillosités de deux cellules adjacentes. Panneau du haut: Dans une cellule infectée avec un virus contrôle (DsRed2, rouge), le marquage de Crb3 (vert) se superpose partiellement avec le DsRed2 cytoplasmique (jaune). Le marquage de Crb3 jaune se situe dans les microvillosités de la cellule infectée (flèche blanche) alors que le marquage qui ne se superpose pas (vert) se situe dans les microvillosités de la cellule non infectée (flèche verte). Panneau du milieu: Dans une cellule infectée avec un ARNsh contre Crb3, le marquage de Crb3 (vert) ne se superpose pas avec le marquage cytoplasmique en rouge. Cela montre que Crb3 est absent des microvillosités infectées. Tandis que le marquage Crb3 est toujours présent dans la cellule non infectée. (flèche verte). Panneau du bas: Dans la cellule infectée, le marquage de la Gliomédine (vert), un marqueur des microvillosités est bien présent et se superpose au marquage cytoplasmique (jaune): Cela monte bien que les microvillosités sont toujours en place (flèche blanche).Barre d'échelle: 5µm.
(B) Image représentative de deux gaine de myéline infectée en début de myélinisation, l'une avec un ARNsh contre Crb3 (Crb3sh), l'autre avec un virus contrôle (contsh).
(C) Le graphique met en relation le diamètre et la longueur de cellules de Schwann infectées avec un virus contenant un Crb3sh (carré noir) ou un virus contrôle (rond blanc) illustrés en **C**. Les droites représentent la régression linéaire des valeurs des contrôles (1) et des cellules contenant des ARN sh contre Crb3 (2). n=65(Crb3sh), 42 (contrôle).
(D) Longueur (gauche) et diamètre (droite) moyen des cellules de Schwann décrites en **D.** Les cellules des lesquelles Crb3 est effacer sont significativement plus longues alors que leur diamètres n'est pas modifié.
(E) Une cellule de Schwann infectée avec un virus contenant un ARNsh contre Crb3 (Crb3sh, Dsred2) est plus longue que la cellule suivante, non infectée (NI) sur le même axone. La région nodale est visualisée par immunomarquage de Kv1.2 (vert) et le noyau et marqué en DAPI. Barre d'échelle: 100um.
(F) Tous les panneaux se focalisent sur des nœuds de Ranvier entre une cellule de Schwann infectée avec un virus contenant un ARNsh dirigé contre Crb3 (DsRed2, rouge) et la cellule adjacente non-infectée.
Ces nœuds sont marqués à l'aide de différentes protéines des microvillosités, pERM, Moésine,et Gliomédine (bleu), de divers marqueurs nodaux, Neurofascine (vert), Ankirine G (Ank, vert) et Nav1.8 (Bleu) anisi qu'un marqueurs juxtaparanodal, KV1.2 (vert) ,et un marqueur paranodal, Caspr (bleu). La même image mais sans le marquage Dsred2 a été mis en dessus de l'image d'origine pour permettre une meilleure visualisation des différents marqueurs dans la cellule infectée ou non. Tous les marqueurs sont présents et localisé comme indiqué dans la littérature: Leur distribution apparaît symétrique entre la cellule infectée et sa voisine non infectée: Cela suggère que l'effacement de Crb3 n'affecte pas l'expression et la distribution des différents marqueurs des microvillosités et du nœud de Ranvier: Barre d'échelle: 5 µm.
Test statistique utilisé : Test de Student bilatéral. Significativité ; ***P<0.001, ns= non significatif P>0.05.

D'autres expériences *in vitro*, non publiées, dans lesquelles l'expression de Crb3 a été inhibée après induction de la myélinisation, mettent en évidence le rôle de Crb3 dans l'élongation de la gaine de myéline. En effet, dans ces conditions de culture "statiques", aucune différence de taille a été constaté entre les segments de myéline produit par les cellules infectées par rapport aux cellules contrôles (Fig E12 B et C, données non publiées). Cela indique que l'inhibition de Crb3, en soi, ne suffit pas à allonger la gaine de myéline, mais suggère que Crb3 est impliqué dans la régulation du processus d'élongation de la gaine de myéline.

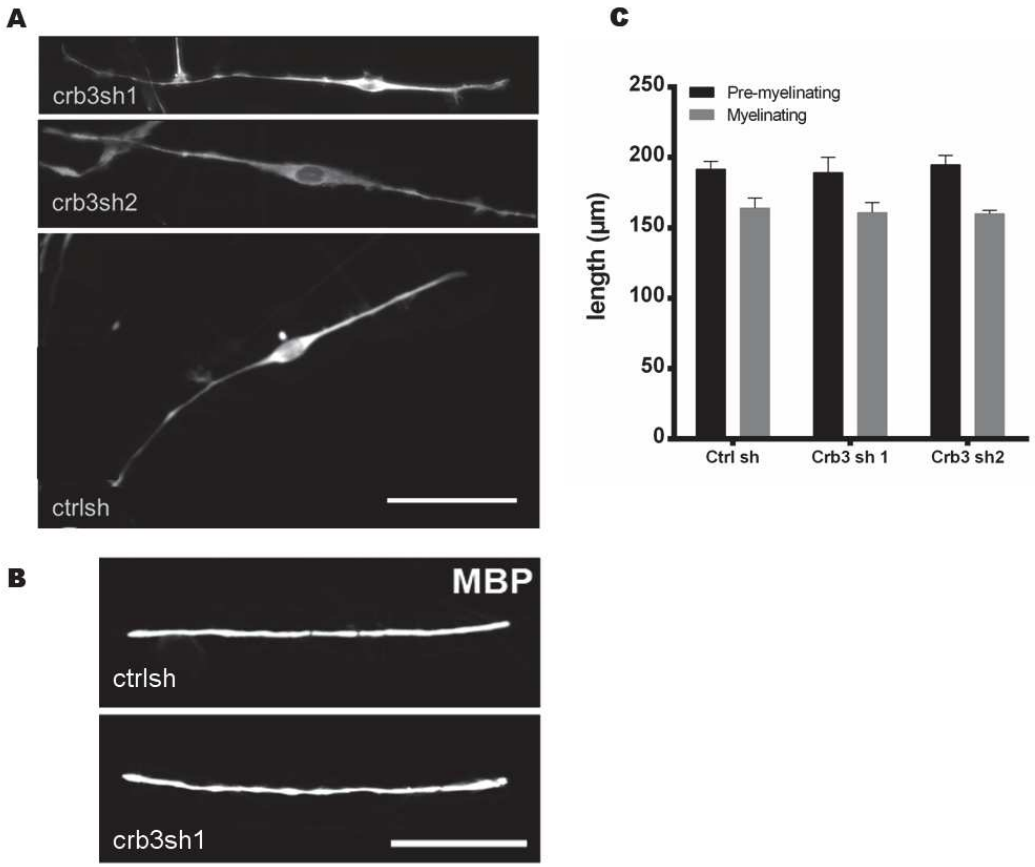

Figure E12 Effet de «l'effaçage» de Crb3 sur des cellules de Schwann in vitro.

(A) (B) Les cellules de Schwann et les neurones sont mises en culture à partir de ganglions de la racine dorsale d'embryons de souris. Les cellules de Schwann sont infectées par des rétrovirus contenant un ARNsh contre crb3 ou un virus contrôle.
La myélinisation n'a pas été induite en **(A)-**pour observé la taille des cellules prémyélinisantes. Dans ce cas, l'effaçage de Crb3 n'augmente pas la longue des cellules comme l'illustre l'image présentée. Barre d'échelle:50µm. En **(B)** nous avons induit la myélinisation et constatons que l''effaçage de Crb3 n'affecte pas la taille du manchon de myéline marqué pour la protéine *myelin basic protein* (MPB), ainsi formé. Barre d'échelle:50µm. Deux ARN sh différents contre Crb3 ont des effets identiques.
(C) Graphique représentant la longueur moyenne des cellules prémyélinisantes et des gaines de myéline des expériences présentées en **A** et **B**.
(± SD, 3 expériences indépendantes avec 3 co-cultures pour chaque expérience, P>0.05).
Test statistique utilisé : Test de Student bilatéral. Significativité ; P>0.05 non significatif

Au cours du développement, le processus d'élongation se produit lors de la croissance d'un individu. Le corps grandit, les membres s'allongent ce qui occasionne une élongation axonale. De plus, il a été montré que la distance internodale est fortement corrélée avec l'élongation des nerfs et des membres ((**35**)Thomas PK et al., 1949) et que la longueur définitive n'est pas le résultat d'un processus uniquement passif ((**36**)Jacobs, 1998).

Chez la souris, la phase principale de croissance se déroule durant le premier mois de vie, plus précisément à partir de la deuxième semaine. Par conséquent, nous avons analysé, l'effet de l'inhibition de l'expression de Crb3 à différents temps au cours de la myélinisation, 15, 30 et 60 jours après la naissance. Nous constatons grâce à l'analyse des nerfs 15 jours après la naissance (15 jours post-natal) une augmentation significative de la distance inter-nodale pour les CSm dans lesquelles Crb3 a été effacé (188 vs 217µm) (Fig E13 A). 30 jours après la naissance, la distance internodale a plus que doublé dans les cellules où Crb3 a été effacé, avec un taux de croissance 2.5 fois plus important par rapport aux cellules contrôles (15.1 vs 6.0 µm/jours). A 60 jours, la différence de longueur des gaines de myéline produites par les cellules infectées par des ARNsh dirigé contre Crb3 ou des virus contrôles est encore plus grande. Mais il est intéressant de constater qu'à partir de 30 jours les taux de croissance diminuent de façon quasi similaire (Fig E13 A). Ces données suggèrent que l'effacement de Crb3 augmente l'élongation de la myéline en « boostant » le taux de croissance sans modifier la période principale d'élongation située entre 15 et 30 jours après la naissance, chez la souris.
Nos résultats montrent donc que Crb3 est un inhibiteur spécifique de l'allongement de la gaine de myéline lorsque celle-ci est en phase d'élongation.

Des données, obtenues chez la Drosophile, montrent que la protéine Crumbs, homologue de Crb3, peut activer la voie de signalisation Hippo ((**37**) L Chen et al. 2010). Brièvement, cette voie correspond à une cascade de kinase qui aboutit à la phosphorylation du co-facteur de transcription *Yes associated protein* (YAP) ((**38**) Yu, F.X. & Guan, K.L, 2013). Cette modification empêche YAP de pénétrer dans le noyau et donc la transcription de ses gènes cibles. YAP est notamment impliqué dans la régulation de la croissance tissulaire. Dans notre contexte, cela fait de YAP un candidat idéal comme cible de la voie de régulation initiée par Crb3. Tout comme Crb3, YAP est exprimé dans la CS. Par immunochimie, nous observons une localisation majoritairement nucléaire (Fig E13 B). Par western blot, nous

avons analysé, l'expression de YAP et de sa forme cytoplasmique inactive, YAP phosphorylé (P-YAP) durant la myélinisation. Nous avons observé que tandis que le niveau total de YAP reste constant entre 15 et 60 jours après la naissance, celui de P-YAP augmente fortement durant les 30 premiers jours après la naissance (Fig E13 C), période durant laquelle l'action de Crb3 est la plus significative. De plus, l'expression de YAP dans le noyau des CSm décroît constamment entre 15 et 60 jours après la naissance (FigE13 D). Cela suggère que Crb3 contrôle la quantité de YAP actif dans le noyau durant la myélinisation. Pour étayer cela, nous avons mesuré la quantité de YAP dans le noyau de cellules dans lesquelles l'expression de Crb3 a été inhibée. Nous avons observé qu'un défaut de Crb3 favorise la localisation nucléaire de YAP (Fig E13 E).

Ces expériences suggèrent une régulation négative de l'activité de YAP par Crb3. De plus, la localisation (nucléaire ou non) de YAP coïncide et son retrait du noyau peut expliquer la décroissance du taux de myélinisation lorsque la distance internodale finale est atteinte.

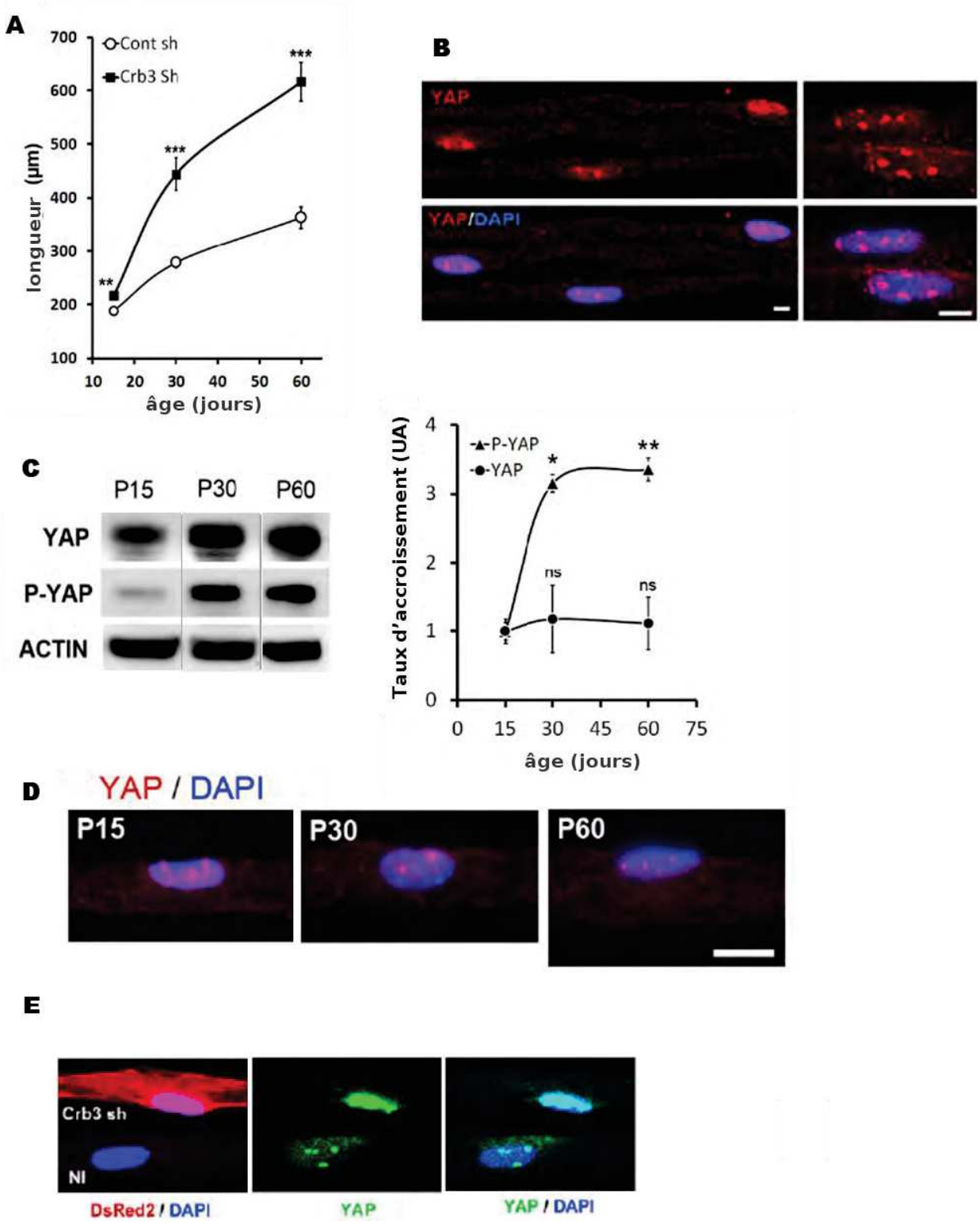

Figure E13 Régulation de l'extension de la gaine de myéline durant la myélinisation

(A)-La distance internodale moyenne de cellules de Schwann infectés avec un virus contenant un ARNsh contre Crb3 (carré noir) ou un virus contrôle (rond blanc) a été mesuré a différents temps soit 15, 30 et 60 jours après la naissance. Les cellules infectées avec un ARNsh contre Crb3 sont à tous les âges significativement plus longues que les cellules infectées avec un virus contrôle. L'analyse statistique compare les cellules infectées avec un ARNsh contre Crb3 et les cellules contrôles à chaque temps.

(B) Immunomarquage de YAP qui montre son expression nucléaire (DAPI, bleu) de cellule de Schwann myélinisante de souris âgée de 15 jours.
(C) (Gauche) Western blot représentatif de l'expression de YAP et P-YAP dans le nerf sciatique murin 15, 30 et 60 jours apès la naissance. (Droite) Quantification des blots de l'expression de YAP et P-YAP 15, 30 et 60 jours apès la naissance (n= 3, 4 et 4 respectivement). Les niveaux d'expression de YAP et P-YAP ont été d'abord normalisés avec le témoin de charge, l'actine puis l'augmentation d'expression de chaque réplicats, aux différents temps, a été exprimée relativement au niveau mesuré 15 jours après la naissance.
(D) Immunomarquage représentatif de YAP (red) dans le noyau de cellules de Schwann myélinisantes durant la myélinisation à 15, 30 et 60 jours après la naissance. Les noyaux sont marqués en DAPI (bleu).
(E) Immunomarquage représentatif de YAP (vert) dans le noyau d'une cellule de Schwann myélinisante infectée avec un ARNsh dirigé contre Crb3 (DsRed2, rouge) en comparaison avec une cellule non infectée. Les noyaux sont marqués en DAPI (bleu). Yap est plus exprimée dans les cellules infectées.
Test statistique utilisé : Test de Student bilatéral. Significativité ; ***P<0.001, **P<0.01, *P<0.05 et ns=non significatif P>0.05.

C'est pourquoi, nous avons recherché si YAP pouvait contrôler la transcription de gènes important dans le processus de myélinisation. YAP est un cofacteur de transcription qui régule l'expression de gènes en se liant à divers facteurs de transcription, notamment les facteurs TEAD ((**39**) Zhao B. et al., 2008). Nous avons testé si YAP contrôle l'activité de divers promoteurs de gènes important dans la myélinisation: le promoteur du gène "*Myelin protein zero*" (MPZ ou P0) qui code pour la protéine la plus abondante de la myéline du système nerveux périphérique et celui du « early growth factor response 2 » (ERG2) qui code pour un facteur de transcription essentiel pour la myélinisation de la CS. Des cellules HEK293 ont été transfectées pour exprimer la luciférase sous le contrôle des promoteurs *Mpz* ou *Erg2.* Certaines ont aussi été transfectées avec des vecteurs exprimant, ou la GFP (comme control), ou YAP, ou YAP et divers isoformes de TEAD. L'impact de ces facteurs sur l'expression de la luciférase a été mesuré. YAP seul est capable de stimuler le promoteur *Erg2* mais non le promoteur *Mpz* (Fig. E14 A). Cependant, quand YAP est co-exprimé avec TEAD1, le promoteur Mpz est stimulé et l'activité d'Egr2 est encore augmentée. L'expression de YAP avec un autre membre de la famille TEAD, TEAD4, stimule aussi de promoteur Erg2 et non Mpz (Fig. E14 A). Cela montre que YAP peut réguler les gènes impliqués dans la myélinisation en agissant avec divers isoformes de TEAD.

Les résultats obtenus sur le rôle de Crb3 dans le processus de myélinisation, amène à formuler l'hypothèse suivante (Fig. E14 B):

Lors de l'élongation des nerfs, Crb3 régule de manière négative l'accroissement de longueur de la myéline. Plus précisément, Crb3 tempère l'activité de YAP en activant, très vraisemblablement, la voie HIPPO qui phosphoryle YAP et le séquestre dans le cytoplasme (l'accumulation de P-YAP coïncide avec la diminution de la localisation nucléaire de YAP durant la période où l'extension de la myéline décroît). Cela empêche YAP de réguler via TEAD l'expression des gènes de la myéline et cela explique la décroissance du taux de myélinisation.

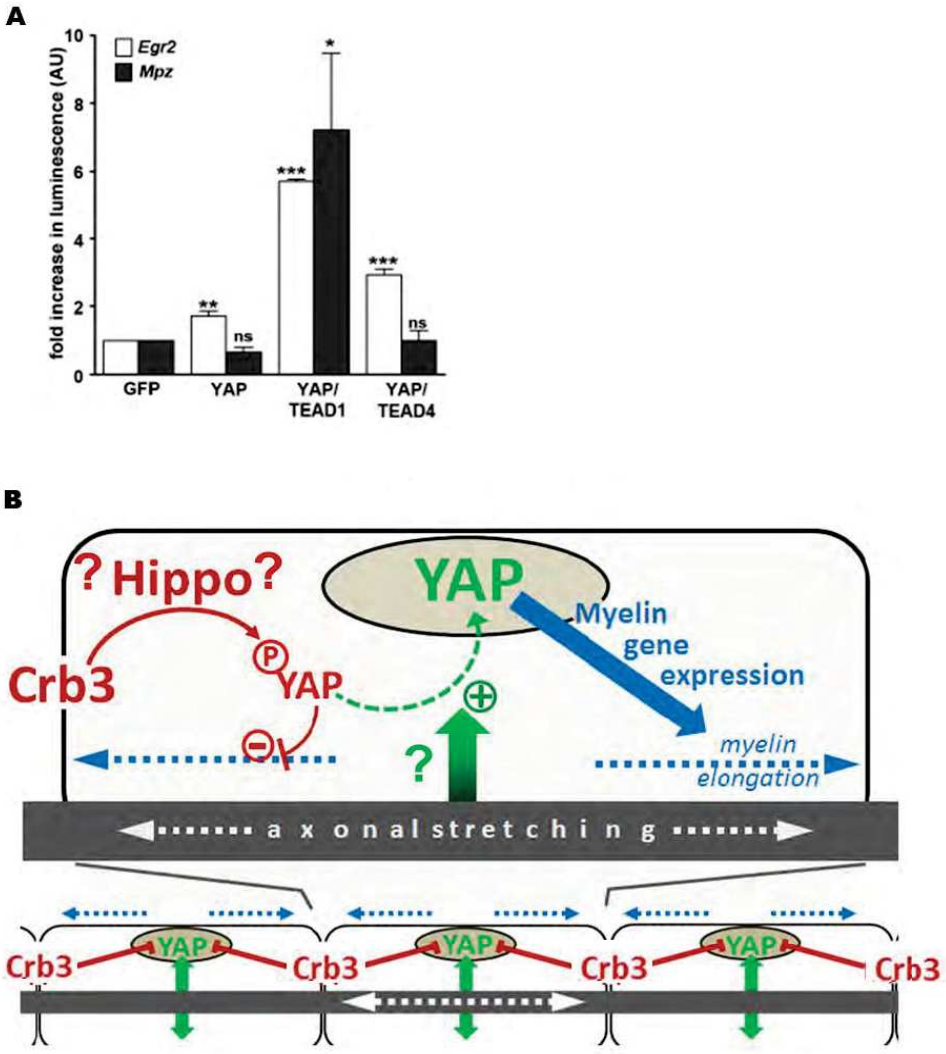

Figure E14 Modèle de l'implication de YAP dans la régulation de la myéline

(A) Des cellules HEK 293T ont été transfectées avec des plasmides exprimant le promoteur Mpz ou Erg2 contrôlant l'expression de la luciférase : Dans les deux cas, ces plasmides ont été cotransfecté avec des plasmides exprimant la GFP, YAP seul ou YAP et une isofrome de TEAD. Le taux d'expression de la lucioférase est normalisé avec le taux des cellules transfectée uniquement avec la GFP (± SEM, 3 expériences indépendantes ont été réalisées en triplicats). L'analyse statistique compare chaque transfection avec celle faite avec la GFP pour chaque promoteur testé.
Test statistique utilisé : Test de Student bilatéral. Significativité ; ***P<0.001, **P<0.01, *P<0.05 et ns=non significatif P>0.05.
(B) Une cellule de Schwann est soumise un stimulus provenant de l'élongation de l'axone (flèche verte). Cela favorise la translocation de YAP dans le noyau (flèche pointillée verte). YAP peut ainsi favoriser l'expression des gènes de la myéline (flèche bleue) et de se faite alimenter l'élongation de la gaine isolante (flèche pointillée bleue). La translocation de YAP au niveau du noyau est négativement régulée par l'action de Crb3. Cette dernière favorise la phosphorylation de YAP, la séquestrant dans le cytosol. La voie de signalisation activée par Crb3 pourrait être la voie Hippo (flèche rouge).

Pour des raisons physiques, la conduction axonale optimale le long d'une fibre nerveuse est obtenue quand la géométrie de sa gaine isolante est finement régulée. Mon travail met en lumière comment la cellule gliale génère la quantité correcte de myéline en fonction de l'axone isolé. Le travail sur Dlg1 identifie un premier frein qui stoppe progressivement la myélinisation, celui sur Crb3, un deuxième qui limite l'extension de la myéline lors de la phase d'élongation de cette dernière.

Mon travail sur Dlg1 a mis en évidence que cette protéine inhibe la myélinisation en régulant négativement une voie de signalisation importante pour la production de myéline, la voie PI3K-AKT. Dlg1 empêche la dégradation de PTEN qui réprime l'activation d'AKT.

Depuis la parution de ce travail, divers articles ont confirmé et affiné le mécanisme proposé ci-dessus. Une publication récente apporte des précisions sur le fonctionnent de Dlg1 par l'analyse de nerfs d'une lignée de souris transgénique (souris «floxDlg1-P0Cre») dont le gène *dlg1* a été invalidé dans les CS à un stade précoce (E13,5) ((**40**) Noseda et al., 2013). Un ou deux jours après leur naissance, les nerfs des souris mutantes ont un nombre de fibres myélinisées identiques aux souris contrôles. A ce stade de la myélinisation, dans un contexte plus physiologique, l'absence de Dlg1 semble ne pas poser de problème. L'analyse des nerfs des souris «floxDlg1-P0Cre» 10, 20, et 45 jours après la naissance révèle l'hyper-myélinisation de ces axones comme le suggère mon travail. Toutefois, une fois la myéline

pleinement mature, l'épaisseur de leur gaine ne diffère pas de celle des souris contrôles. Cela suggère que le rôle de Dlg1 n'est pas primordial dans la maintenance de la myéline, et qu'au court de la myélinisation, son effet peut être modulé. Cependant ces auteurs ne peuvent pas exclure que l'effet observé soit induit par leur modèle d'étude. En effet, le modèle de souris transgéniques, peut induire des mécanismes de compensations moléculaires. Ces mécanismes permettent à la cellule de remplacer une molécule ou voie de signalisation par une autre et elles sont courantes dans le cas d'une invalidation génique, surtout si l'invalidation intervient dans le développement embryonnaire. Sur ce point précis, notre technique d'inactivation aigue à l'aide de virus, au moment même de la myélinisation, est un avantage. Elle limite les compensations moléculaires ou du moins ces dernières n'affectent pas le processus étudier car elles nécessitent du temps pour ce mettre en place. Comme le montre mon travail, l'hyper-myélinisation et l'instabilité des gaines de myéline matures induites par l'effacement de Dlg1, une fois que le taux de myélinisation diminue, le frein engendré par Dlg1 est aussi important pour les phases plus tardives de ce processus. Cela ne remet pas en cause la possible et même probable régulation de Dlg1 au court de la myélinisation et in fine, toutes ces expériences mettent en lumière l'importance de Dlg1dans la myélinisation.

Dans mon travail, je me suis intéressé aux voies de signalisation qui régulent et stabilisent Dlg1 (et par conséquent PTEN) en empêchant sa dégradation dans la cellule. Récemment, il a été montré qu'à partir de 20 jours après la naissance, la kinésine13b régule négativement Dlg1 en interagissant avec la MAP kinase p38 qui phosphoryle et donc favorise l'ubiquitination de Dlg1 ((**41**) Noséda et al., 2016). Cela complète nos résultats in vitro qui indiquent que seul l'activation des récepteurs ErbB2/3 et la PKA sont impliqués dans ce phénomène.

L'implication de PTEN a été confirmé par la production de souris transgénique dans lesquelles PTEN a été supprimé dans les CS ((**42**) Goebbel et al., 2012). Dans les nerfs de ces souris, la voie PI3K-AKT est activée et l'une de ses cibles est le complexe de kinase mTOR. Et, tout comme nous l'avons montré, la diminution de PTEN active la PI3K ce qui

favorise la myélinisation. De plus, l'activité de mTOR est elle-même régulée par une boucle de rétro-contrôle négative en lien avec Dlg1. En effet, la protéine DDIT4 est surexprimée suite à l'invalidation de Dlg1 dans les CS((**40**) Noséda et al., 2013). Or l'inactivation de la protéine DDIT4 stimule l'activité du complexe mTor1 et par conséquent la myélinisation ((**40**) Noséda et al., 2013). Les auteurs de cette étude émettent l'hypothèse que l'activation du complexe mTOR induit l'expression de DDIT4, comme cela se produit en cas d'hypoxie ((**43**) Schwartzer et al., 2005). Ainsi le mécanisme proposé est que quand l'activité de Dlg1 diminue, celle de mTOR est augmentée mais celle-ci s'auto-régule en induisant l'expression de DDIT4 qui inhibe mTOR. Cela montre à quel point le processus de myélinisation est finement régulé et contrôlé.

Un temps controversé ((**44**) Flores et al., 2008), le rôle d'AKT comme la cible principale de l'activation de la PI3K lors de la myélinisation, comme nous le suggérions, a bien été démontré ((**45**) Domenech et al., 2016). Cette étude met en évidence la spécificité de l'expression des différentes isoformes d'AKT. Notamment, l'isoforme 1 (AKT1) qui est exprimée par les neurones et les CS alors qu' AKT2 est exprimée majoritairement par la CS. De plus, l'analyse de nerfs de trois lignées de souris transgénique dans lesquelles les isoformes d'AKT ont été respectivement invalidées n'a pas montré d'impact significatif sur la myélinisation ((**45**) Domenech et al., 2016). Ce travail apporte un début d'explication sur la différence fonctionnelle observée, dans mon travail, lors de l'effacement d'AKT1 et 2 respectivement. En effet, n'ayant pas strictement la même localisation cellulaire, il est logique que leurs délétions dans les neurones et les CS ne produisent pas les mêmes effets dans le travail présenté par Domenech et collaborateurs. Mes résultats montrent bien que seul AKT2, isoforme majoritairement gliale, impacte la déposition de la myéline.

Accessoirement, les souris dans lesquelles les auteurs ont invalidés les différentes isoformes d'AKT mettent en évidence les systèmes de compensation (dans ce cas précis, induit par les isoformes non supprimées) dans les modèles de souris transgénique comme évoqués ci-dessus.

Initialement, la fonction de Dlg1 lors de la myélinisation est liée à son interaction avec la protéine MTMR2, protéine mutée dans la maladie de Charcot de type 4B1. Cette pathologie est caractérisée, en particulier au niveau des régions paranodales, par des accumulations anormales de myéline. Dlg1 fait partie avec MTMR2 d'un complexe protéique qui régule l'homéostasie membranaire durant la myélinisation. En effet l'interaction Dlg1-MTMR2 contrôle négativement la quantité de membrane produite ((**46**) Bolis et al., 2009) ce qui est cohérent avec un rôle de frein à la myélinisation. Ainsi Dlg1 peut réguler la myélinisation de diverses manières. Néanmoins, quel que soit le mécanisme précis, la fonction de Dlg1 est primordiale. En effet, l'effacement de Dlg1 dans les CS de nerfs de souris dont le gène MTMR2 a été invalidé n'engendre pas de sur-myélinisation comme chez les contrôles. Cela indique que chez les mutants la voie d'inhibition impliquant Dlg1 n'est plus active. Ces résultats suggèrent que la défaillance du mécanisme inhibant la myélinisation est la cause de la sur-myélinisation suivie de démyélinisation qui caractérise la CMT de type 4B.

La deuxième partie de mon travail a mis en évidence le rôle de Crb3 dans le contrôle de la croissance longitudinale de la gaine de myéline. Durant l'élongation de la myéline, Crb3 régule de manière négative l'accroissement de longueur de cette gaine isolante en inhibant l'activité du cofacteur de transcription YAP. Plus précisément, Crb3 induit la phosphorylation de YAP ce qui le séquestre dans le cytoplasme. Cela empêche YAP de réguler, via TEAD, l'expression des gènes de la myéline et explique une partie de la décroissance du taux de myélinisation.

Des expériences réalisées après mon départ du laboratoire ont confirmé et affiné le modèle d'action de Crb3 via YAP, rappelé ci-dessus.

Des expériences d'étirement artificiel des nerfs ont confirmé le rôle inhibiteur de Crb3 lors de l'extension de la myéline ((**47**) Fernando et al., 2016). D'un point de vue moléculaire, Crb3 pourrait réguler YAP en activant la voie de signalisation Hippo. Les composants de cette voie de signalisation (Merlin, Willin et diverses kinases) sont exprimés dans le nerf sciatique de la

souris et l'invalidation de la Willin, connecteur supposé entre CRb3 et cette voie de signalisation, a aussi un impact sur la croissance longitudinale des CS infectées.

La localisation de Crb3 au niveau des microvillosités est idéale pour «capter» des signaux provenant de la cellule adjacente ou de la région nodale. Malgré son court domaine extracellulaire, Crb3 pourrait notamment interagir avec la matrice extracellulaire ((**48**) Thompson et al., 2013) ou utiliser son domaine transmembranaire ou intracellulaire pour interagir avec d'autres protéines de la CSm qui seraient les senseurs de signaux extracellulaires. Cependant pour l'instant, aucun partenaire n'a été mis en évidence dans la CSm.

D'autres expériences obtenues après mon départ ont montré l'implication de YAP dans la régulation de la longueur de la gaine de myéline ((**47**) Fernando et al., 2016). En effet, son effacement précoce, *in vivo,* induit la production d'une gaine de myéline notamment plus courte comparées aux cellules contrôles. De plus, l'étirement artificiel du nerf sciatique de souris a permis de montrer que l'allongement axonal est corrélé avec une augmentation de YAP dans le noyau des CSm et que les cellules dans lesquelles YAP est effacé, sont incapables d'augmenter significativement leur longueur. Cela montre que l'allongement axonal (dû à l'allongement des nerfs, lors de la croissance) provoque l'élongation de la myéline via l'expression de la forme active non phosphorylée de YAP.

Enfin, d'autres expériences, réalisées après mon départ, ont aussi mis en lumière comment YAP peut stimuler la myélinisation. Premièrement, YAP peut réguler l'expression des gènes de la myéline. La sur-expression d'une forme constitutivement active de YAP dans des cultures de CS différenciées de rat stimule (positivement ou négativement) l'expression de protéine de la myéline (KROX20, MAG ou MPZ) mais aussi de protéines non constitutives de la myéline, impliquées dans ce processus (Rab11, Laminin γ1). Mon travail montre que YAP peut induire l'expression des protéines de la myéline en activant leur transcription et que cette régulation se fait notamment avec les facteurs de transcription TEAD. Des études ultérieures seront toutefois nécessaires pour comprendre totalement le rôle de YAP dans la transcription de ces gènes.

Deuxièmement, YAP peut interagir avec la voie de signalisation NRG1-PI3K-AKT. En présence de NRG1, la sur-expression d'une forme constitutivement active de YAP stimule fortement l'activité AKT et l'analyse de nerfs sciatiques, surexprimant la NRG1, montre une expression augmentée des deux formes, active et inactive, de YAP. Comment cette interaction se produit reste à élucider mais cela est cohérent avec l'observation que l'activité de YAP est également stimulée par des composants axonaux durant le développement (NRG1, élongation axonale).

Un point intéressant décrit par de ce travail est la dissociation entre la croissance longitudinale et la croissance radiale de la myéline.
Il est intéressant de constater que l'effacement de Crb3 et l'élongation artificielle axonale ((**47**) Fernando et al., 2016) augmente la longueur de la gaine de myéline mais n'impacte pas son épaisseur alors que la sur-expression de la NRG1 ((**20**) Michailov et al., 2004) et l'effacement de Dlg1 qui vont activer la voie de signalisation NRG1-PI3K-AKT dans la CS augmente uniquement l'épaisseur de la myéline. Or comme mentionné plus haut, la surexpression de la NRG1 axonale augmente également l'expression de YAP et cela affecte très peu la distance internodale. Cela s'explique par la présence de Crb3, exprimé durant la myélinisation qui peut de ce fait inactiver YAP. Ainsi la sur-expression de la NRG1 augmente l'expression de YAP mais affecte peu la croissante longitudinale de la myéline (elle est proche de la normale) alors que cela stimule la voie de signalisation PI3K-AKT et augmente la croissance radiale. Cela suggère que la dissociation entre la croissance longitudinale et radiale résulte de l'inhibition de YAP via Crb3.

2.2 Bilan et perspectives

Mes travaux menés dans le groupe du Docteur Tricaud ont conforté l'idée initiale qui faisait des protéines de la polarité cellulaire des acteurs centraux pour réguler le phénomène complexe de la myélinisation. En effet, l'invalidation de Pals1, Dlg1 et Crb3 aboutissent à

faire varier la géométrie de la myéline. Connaître les facteurs qui influent sur cette géométrie n'a évidemment pas qu'un intérêt fondamental. En effet de nombreuses neuropathies sont liées ou aboutissent à une altération de la longueur ou du diamètre de la gaine de myéline. Inverser ces processus, à l'aide d'outils viraux, semble une voie thérapeutique intéressante à explorer pour traiter ces maladies. Or pour l'heure, nous arrivons à corriger des défauts mais uniquement à l'échelle de quelques centaines de cellules par site d'injection. Pour obtenir un impact fonctionnel et envisager une thérapie, il faudrait augmenter de manière drastique le nombre de cellules infectées.

Actuellement, je travaille à l'institut Pasteur de Paris où je continue de développer et utiliser des vecteurs viraux mais avec des impacts fonctionnels. Mon groupe travaille sur la neurogenèse adulte et ses conséquences fonctionnelles. Nous utilisons le bulbe olfactif comme modèle. En effet, chez la souris adulte, la neurogenèse prend notamment place dans cette zone du cerveau, impliquée dans le traitement de l'information olfactive. En bref, les neurones sont produits, au cœur du cerveau, dans la zone sous-ventriculaire, région éloignée du bulbe puis les futurs nouveaux neurones migrent jusqu'au bulbe ou ils se différencient en neurones matures. Or 50% des cellules produites meurent après avoir atteints leur cible ((**50**) Rochefort et al., 2002). Le destin des nouveaux neurones dépend de leur activité et de leur degré de sollicitation ((**51**) Petreanu et al., 2002). Cette grande sélectivité des neurones produits peut expliquer l'échec des greffes de précurseurs neuronaux au-delà du court terme. Or la greffe cellulaire est une des pistes thérapeutiques pour soigner des patients atteints de maladies neurodégénératives telle que la maladie de Parkinson. L'utilisation de techniques d'opto- et chémo-génétique, nous permet de cibler spécifiquement les nouveaux neurones et de réguler l'activité de ces derniers. Ces techniques nous permettrons peut-être à l'avenir de contrôler le destin des neurones nouvellement générés et ainsi assurer leur survie dans des contextes pathologiques.

3 Références

1 Waxman, S.G. (1997). Axon-glia *interactions: building a smart nerve fiber*. Curr Biol 7,R406-410.
2 Tomassy, G.S., et al. *Distinct profiles of myelin distribution along single axons of pyramidal neurons in the neocortex*. Science 344, 319-324 (2014).
3 Suter U, Scherer SS*. Disease mechansisms in inherited neuropathies*. Nature Rev Neurosci 2003 ; 4 : 714-26
4 Jessen KR, Mirsky R (2005*) The origin and development of glial cells in peripheral nerves*. Nat Rev Neuroci 6:671-682.
5 Taveggia C, Zanazzi G, Petrylak A et al. *Neuregulin-1 type III determines the ensheathment fate of axons.* Neuron 2005 ; 47 : 681-94.
6 Gatto C L, et al. Local ERM activation and dynamic growth cones at *Schwann cell tips implicated in efficient formation of nodes of Ranvier.* The Journal of Cell Biology, Volume 162, Number 3, August 4, 2003 489–498
7 Bosio A, et al. *Composition and Biophysical Properties of Myelin Lipid Define the Neurological Defects in Galactocerebroside-and Sulfatide-Deficient Mice.* J.Neurochem 70, 308-315 (1998).
8 Chrast R, et al. *Lipid metabolism in myelinating glial cells: lessons from human inherited disorders and mouse models*. J Lipid Res;52(3):419-34 (2011).
9 Giese K P, et al. *Mouse PO Gene Disruption Leads to Hypomyelination, Abnormal Expression of Recognition Molecules, and Degeneration of Myelin and Axons*. Cell, Vol. 71, 565-576, November 13, 1992.
10 Suter et al., *A leucine-to-proline mutation in the putative first transmembrane domain of the 22-kDa peripheral myelin protein in the trembler-J mouse*. PNAS. 1992 May 15;89(10):4382-6.
11 Bah et al., *Axon-Glia Interactions and the domain organization of myelinated axons requires Neurexin IV/Caspr/Paranodin.* Neuron, Vol. 30, 369–383, May, 2001,.
12 Yin et al., *Myelin-Associated Glycoprotein Is a Myelin Signal that Modulates the Caliber of Myelinated Axons.* J. Neurosci., March 15, 1998, *18*(6):1953–1962
13 Perrin-Tricaud C, Rutishauser U, Tricaud N P120 catenin is required for thickening of Schwann cell myelin. Mol Cell Neurosci 35:120 –129.(2007)
14 Sherman DL, Fabrizi C, Gillespie CS, Brophy PJ (2001) *Specific disruption of a schwann cell dystrophin-related protein complex in a demyelinating neuropathy*. Neuron 30:677– 687.
15 Gillespie et al., *Peripheral demyelination and neuropathic pain behavior in periaxin-deficient mice.* Neuron, Vol. 26, 523–531, May, 2000.
16. Guilbot, A., et al. *A mutation in periaxin is responsible for CMT4F, an autosomal recessive form of Charcot-Marie-Tooth disease*. Human molecular genetics 10, 415-421 (2001).
17 Di Muzio, A., et al. *Dysmyelinating sensory-motor neuropathy in merosin-deficient congenital muscular dystrophy*. Muscle & nerve 27, 500-506 (2003).
18 Eshed et al., (2005*) Gliomedin mediates Schwann cell-axon interaction and the molecular assembly of the nodes of Ranvier.* Neuron *2005 Jul 21;47(2):215-29*
19 Nave KA, SalzerJL. *Axonal regulation of myelination by neuregulin 1*. Cur Op Neurobiol 2006 ; 16 : 492-500.
20 Michailov, G.V., Sereda, M.W., Brinkmann, B.G., Fischer, T.M., Haug, B., Birchmeier, C.,Role, L., Lai, C., Schwab, M.H., and Nave, K.A. (2004). *Axonal neuregulin-1 regulates myelin sheath thickness*. Science 304 : 700-703.
21 Chen, S., Velardez, M.O., Warot, X., Yu, Z.X., Miller, S.J., Cros, D., and Corfas, G. (2006). *Neuregulin 1-erbB signaling is necessary for normal myelination and sensory function*. J Neurosci 26, 3079-3086.
22 Mellman I, Nelson WJ (2008) *Coordinated protein sorting, targeting and distribution in polarized cells*. Nat Rev Mol Cell Biol 9:833– 845.
23 Ozçelik M et al., *Pals1 is a major regulator of the epithelial-like polarization and the extension of the myelin sheath ine peripheral nerves*. J Neurosci 2010; 30 : 4120-31

24 Gonzalez et al., *In vivo time-lapse imaging of mitochondria in healthy and diseased peripheral myelin sheath.*. Mitochondrion. 2015 Jul;23:32-41
25 Woods D F et al., T*he discs-large tumor suppressor gene of Drosophila encodes a guanylate kinase homolog localized at septate junctions*. Cell. 1991 Aug 9;66(3):451-64.
26 Müller et al., *Molecular characterization and spatial distribution of SAP97, a novel presynaptic protein homologous to SAP90 and the Drosophila discs-large tumor suppressor protein*. J Neurosci.. 1995 Mar;15(3 Pt 2):2354-66
27 Bolino A, et al. *Disruption of Mtmr2 produces CMT4B1-like neuropathy with myelin out-folding and impaired spermatogenesis*. J Cell Biol 167:711–721. (2004).
28 Adey N. B. et al., *Threonine Phosphorylation of the MMAC1/PTEN PDZ Binding Domain Both Inhibits and Stimulates PDZ Binding*, Cancer Res. 60, 35 (2000).
29 Contreras-Paredes A, De la Cruz-Hernández E, Martínez-Ramírez I et al. *E6 variants of human papillomavirus 18 differentially modulate the protein kinase B/phosphatidylinositol 3-kinase (akt/PI3K) signaling pathway*. Virology 2009 ; 383 : 78-85.
30 M. Hanada, et al., Structure, *regulation and function of PKB/AKT—a major therapeutic target*, Biochim. Biophys. Acta 1697, 3 (2004).
31 Bolis A et al., *Loss of Mtmr2 Phosphatase in Schwann Cells But Not in Motor Neurons Causes Charcot-Marie-Tooth Type 4B1 Neuropathy with Myelin Outfoldings* J. Neurosci. 25, 8567 (2005).
32 Tepass et al., *Crumbs encodes an EGF-like protein expressed on apical membranes of Drosophila epithelial cells and required for organization of epithelia.* Cell. 1990 Jun 1;61(5):787-99.
33 Fogg et al.,Multiple regions of Crumbs3 are required for tight junction formation in MCF10A cells. 2005 J. Cell Sci.1;118(Pt 13):2859-69.
34 Fan S et al., *Polarity proteins control ciliogenesis via kinesin motor interactions.* Curr Biol. 2004 Aug 24;14(16):1451-61.
35 Thomas, P.K. & Young, J.Z. *Internode lengths in the nerves of fishes*. Journal of anatomy 83, 336-350, pl (1949).
36 Jacobs *On internodal lengnth*. J Anat, 157:153 (1988).
37 Chen L et al*., The apical-basal cell polarity determinant Crumbs regulates Hippo signaling in Drosophila* PNAS . 2010 September 7; 107(36): 15810–15815.
38 Yu, F.X. & Guan, K.L. *The Hippo pathway: regulators and regulations*. Genes & development 27, 355-371 (2013).
39 Zhao, B., et al. *TEAD mediates YAP-dependent gene induction and growth control*. Genes & development 22, 1962-1971 (2008).
40 Noséda R et al., *DDIT4/REDD1/RTP801 is a novel negative regulator of Schwann cell myelination.* J Neurosci. 2013 Sep 18;33(38):15295-305.
41 Noséda et al., *Kif13b Regulates PNS and CNS Myelination through the Dlg1 Scaffold*. PloS Biol. 2016 Apr 12;14(4):e1002440.
42 Goebbels et al., *Genetic disruption of Pten in a novel mouse model of tomaculous neuropathy*. EMBO mol Med. 2012 Jun;4(6):486-99.
43 Schwarzer R et al., REDD1 integrates hypoxia-mediated survival signaling downstream of phosphatidylinositol 3-kinase. Oncogene (2005) 24:1138 –1149.
44 Flores AI et al, *Constitutively active Akt induces enhanced myelination in the CNS*. J Neurosci (2008) 28:7174–7183.
45 DomènechEstévez E et al., *Akt Regulates Axon Wrapping and Myelin Sheath Thickness in the PNS*. J Neurosci. 2016 Apr 20;36(16):4506-21
46 Bolis A et al., *Dlg1, Sec8, and Mtmr2 regulate membrane homeostasis in Schwann cell myelination*. J Neurosci. 2009 Jul 8;29(27):8858-70.
47 Fernando RN et al, *Optimal myelin elongation relies on YAP activation by axonal growth and inhibition by Crb3/Hippo pathway*. Nat Commun. 2016 Jul 20;7:12186.
48 Thompson et al., *Sticking together the Crumbs—an unexpected function for an old friend*. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 14, 307–314 (2013).
49 Basu S et al., *Akt phosphorylates the Yes-associated protein, YAP, to induce interaction with 4-3-3 and attenuation of p73-mediated apoptosis*. Mol. Cell 11, 11–23 (2003).

50 Rochefort et al., Enriched odor exposure increase the number ofnewborn neurons in the adult olfactory bulb and improve memory. J Neurosci, 22(7): 2679-89.
51 Petreanu et al., Maturation and death of adult born olfactory bulb granule neurons: role of olfaction. J Neurosci, 22, 6106-6113 (2002).

4.Publications

CA1-dependent network properties without a compensatory reorganization of memory circuits.

The nature of the observed MRI changes and hence the pathophysiological mechanisms during TGA are still unclear. Neurons in the CA1 sector of the hippocampal cornu ammonis are characterized by a selective vulnerability to metabolic and oxidative stress induced by hypoxemia, β-amyloid neurotoxicity, and ischemia that is mediated by cellular glutamate overload and subsequent calcium influx (*24*). Several pathogenic mechanisms have been suggested, such as migraine-related mechanisms, cortical spreading depression, ischemia, venous flow abnormalities, and seizure activity that may lead to impairment of cellular diffusion with subsequent DWI changes (*13*). Focal MR spectroscopy of DWI/T2 lesions in patients with TGA revealed a lactate peak in TGA patients showing a hippocampal lesion (*17*). This suggests that anaerobic glycolysis as a cellular stress response of CA1 neurons is the metabolic correlate of the diffusion changes seen in TGA.

The understanding of the functional role of the hippocampus in the processing of memory in humans has been greatly advanced by studying the amnestic deficit of patients with lesions in the hippocampus (*25*, *26*). Partial or extended lesions to the hippocampus lead to a global amnestic syndrome covering various memory domains, including spatial memory (*25*, *27*, *28*). The functional role of CA1 neurons in spatial memory has been extensively studied in rodents. In primates and humans, however, the functional role is less clear, because there are only a limited number of studies, and results are often ambiguous (*29*). In rodent and primate models aimed at selective lesioning of CA1 neurons by using a transient ischemia or neurochemical lesioning, animals showed an impairment in the establishment of allocentric spatial representations, spatial navigation, and spatial relational learning, dependent on the paradigm used, although the overall impairment was frequently mild and the performance partly superior to that of controls (*29*–*31*). Focal hippocampal lesions in monkeys resulted in greater memory deficits than did surgical resection of the hippocampal formation (*32*).

Apart from the involvement of the hippocampus in spatial navigation, neuroimaging studies support the idea that a widespread hippocampal-neocortical network has a role in the processing of spatial navigation in humans. Recent neuroimaging findings using a virtual-reality task suggest a dissociation between the retrosplenial cortex and the hippocampus, inasmuch as the activation of the retrosplenial cortex correlated with the integration of egocentric spatial information with cues about self-motion (*33*, *34*). In contrast, hippocampal activity reflected the degree of learning in the navigational task given. Although these findings support the notion of a network processing of spatial memory tasks, the dynamics and interactions are not fully understood (*35*). Our results highlight the critical relay function of hippocampal CA1 neurons within this hippocampal-parietal network.

References and Notes

1. E. I. Moser, E. Kropff, M. B. Moser, *Annu. Rev. Neurosci.* **31**, 69 (2008).
2. J. O'Keefe, J. Dostrovsky, *Brain Res.* **34**, 171 (1971).
3. J. O'Keefe, L. Nadel, *The Hippocampus as a Cognitive Map* (Oxford Univ. Press, Oxford, 1978); available at www.cognitivemap.net/.
4. N. J. Broadbent, L. R. Squire, R. E. Clark, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 14515 (2004).
5. B. L. McNaughton *et al.*, *J. Exp. Biol.* **199**, 173 (1996).
6. R. G. Morris, P. Garrud, J. N. Rawlins, J. O'Keefe, *Nature* **297**, 681 (1982).
7. E. Moser, M. B. Moser, P. Andersen, *J. Neurosci.* **13**, 3916 (1993).
8. R. E. Clark, S. M. Zola, L. R. Squire, *J. Neurosci.* **20**, 8853 (2000).
9. A. L. Griffin, H. Eichenbaum, M. E. Hasselmo, *J. Neurosci.* **27**, 2416 (2007).
10. H. Eichenbaum, P. Dudchenko, E. Wood, M. Shapiro, H. Tanila, *Neuron* **23**, 209 (1999).
11. N. Burgess, E. A. Maguire, J. O'Keefe, *Neuron* **35**, 625 (2002).
12. J. R. Hodges, C. P. Warlow, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **53**, 834 (1990).
13. T. Bartsch, G. Deuschl, *Lancet Neurol.* **9**, 205 (2010).
14. O. Sedlaczek *et al.*, *Neurology* **62**, 2165 (2004).
15. H. Y. Lee *et al.*, *Neuroradiology* **49**, 481 (2007).
16. T. Bartsch *et al.*, *Brain* **129**, 2874 (2006).
17. T. Bartsch *et al.*, *Neurology* **70**, 1030 (2008).
18. A. Cianfoni *et al.*, *Arch. Neurol.* **62**, 1468 (2005).
19. T. Bartsch, K. Alfke, G. Deuschl, O. Jansen, *Ann. Neurol.* **62**, 475 (2007).
20. Because TGA patients showed a profound floor effect in the RAVLT, we did not compute correlations with these measures (table S2).
21. E. A. Maguire, *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B* **352**, 1475 (1997).
22. R. Schoenfeld, N. Moenich, F. J. Mueller, W. Lehmann, B. Leplow, *Behav. Brain Res.* **208**, 169 (2010).
23. Y. C. Weon, J. H. Kim, J. S. Lee, S. Y. Kim, *Am. J. Neuroradiol.* **29**, 1324 (2008).
24. X. Wang *et al.*, *BMC Neurosci.* **10**, 12 (2009).
25. S. Zola-Morgan, L. R. Squire, D. G. Amaral, *J. Neurosci.* **6**, 2950 (1986).
26. H. J. Spiers, E. A. Maguire, N. Burgess, *Neurocase* **7**, 357 (2001).
27. S. Abrahams, A. Pickering, C. E. Polkey, R. G. Morris, *Neuropsychologia* **35**, 11 (1997).
28. T. Hartley, E. A. Maguire, H. J. Spiers, N. Burgess, *Neuron* **37**, 877 (2003).
29. P. B. Lavenex, D. G. Amaral, P. Lavenex, *J. Neurosci.* **26**, 4546 (2006).
30. R. N. Auer, M. L. Jensen, I. Q. Whishaw, *J. Neurosci.* **9**, 1641 (1989).
31. I. Q. Whishaw, M. R. Rod, R. N. Auer, *Brain Res. Bull.* **34**, 283 (1994).
32. J. Bachevalier, M. Mishkin, *Neuropsychologia* **27**, 83 (1989).
33. T. Wolbers, C. Büchel, *J. Neurosci.* **25**, 3333 (2005).
34. R. A. Epstein, *Trends Cogn. Sci.* **12**, 388 (2008).
35. C. M. Bird, N. Burgess, *Nat. Rev. Neurosci.* **9**, 182 (2008).

36. We thank O. Jansen for helpful input and support and R. Rosenträger for technical assistance. This study has been supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft [to T.B., grant SFB 654 (TP A14); to J.M.K., grant KO 2067/1-2]; the Faculty of Medicine, University of Kiel, Germany (to T.B. and F.J.M.); and the Else Kröner-Fresenius-Stiftung (to F.J.M.). K.A. is currently affiliated with the Institute of Radiology and Neuroradiology, HELIOS Kliniken, Schwerin, Germany.

Supporting Online Material
www.sciencemag.org/cgi/content/full/328/5984/1412/DC1
Materials and Methods
SOM Text
Figs. S1 to S3
Tables S1 to S3
References

10 February 2010; accepted 22 April 2010
10.1126/science.1188160

Dlg1-PTEN Interaction Regulates Myelin Thickness to Prevent Damaging Peripheral Nerve Overmyelination

Laurent Cotter,[1]* Murat Özçelik,[1]*† Claire Jacob,[1] Jorge A. Pereira,[1] Veronica Locher,[1] Reto Baumann,[1] João B. Relvas,[1,2] Ueli Suter,[1] Nicolas Tricaud[1]‡

The thickness of the myelin sheath that insulates axons is fitted for optimal nerve conduction velocity. Here, we show that, in Schwann cells, mammalian disks large homolog 1 (Dlg1) interacts with PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10) to inhibit axonal stimulation of myelination. This mechanism limits myelin sheath thickness and prevents overmyelination in mouse sciatic nerves. Removing this brake results also in myelin outfoldings and demyelination, characteristics of some peripheral neuropathies. Indeed, the Dlg1 brake is no longer functional in a mouse model of Charcot-Marie-Tooth disease. Therefore, negative regulation of myelination appears to be essential for optimization of nerve conduction velocity and myelin maintenance.

The thickness of the myelin sheath is an essential parameter governing nerve conduction velocity (NCV) (*1*). This velocity falls from its optimum when myelin is too thick or too thin. Optimal conduction is obtained by adjusting the length and thickness of the myelin sheath to the axon diameter (*2*). To achieve this in peripheral nerves, myelinated axons express neuregulin-1 type III, which stimulates myelination by Schwann cells (SCs) (*3*, *4*). Myelination slows down after the first two postnatal weeks in mice as optimal thickness is approached (*5*), which suggests regulatory mechanisms that curb myelination.

We have previously characterized a mouse model of Charcot-Marie-Tooth disease 4B (CMT4B), a peripheral neuropathy caused by mutations in *MTMR2* (*6*). Schwann cell hypermyelination with focally folded myelin is the morphological disease hallmark (*7*), which indicates dysregulation of myelin production. MTMR2 interacts with mammalian disks large homolog

Downloaded from www.sciencemag.org on December 18, 2014

1 (Dlg1, also SAP-97) (*8*), a PDZ-containing membrane-associated guanylate kinase (MAGUK)–family protein involved in basic cellular events including cell polarization, protein trafficking, and tumorigenesis (*9*). Here, we describe Dlg1 function during SC myelin sheath formation.

[1]Institute of Cell Biology, Department of Biology, Eidgenössische Technische Hochschule (ETH) Zürich, CH-8093 Zürich, Switzerland. [2]Instituto de Biologia Molecular e Celular (IBMC), Universidade do Porto, Rua do Campo Alegre 823, 4150-180 Porto, Portugal.

*These authors contributed equally to this work.
†Present address: McKinsey & Company, Herrengasse 1-3, A-1010 Vienna, Austria.
‡To whom correspondence should be addressed. E-mail: nicolas.tricaud@cell.biol.ethz.ch

Dlg1 expression was silenced in SCs cocultured with DRG neurons (*10*) (fig. S1A). We confirmed that Dlg1-silenced SCs failed to myelinate (fig. S1B) (*11*). These cells also showed migration defects (fig. S1, C and D) and expressed less polarity protein Par3 (fig. S1E), which is required for cell migration (*12*) and myelination (*13*). Occasionally, silenced SCs overcame their migration defect and myelinated (fig. S1F). The resulting myelin segments were thicker than those of controls (fig. S1G), which indicated a role for Dlg1 in regulating myelin sheath thickness.

We then silenced Dlg1 expression efficiently in myelinating SCs in mouse sciatic nerves at early stages of myelination (3 to 4 days postnatal, dPN) by injecting lentiviral vectors expressing short hairpin RNAs (shRNAs) (fig. S2) (*10*, *14*). Two months after injection, we found a strikingly increased thickness of myelinating SCs silenced for Dlg1 compared with control cells (Fig. 1, A and B; 9.3 ± 0.2 μm versus 7.1 ± 0.3 μm, $P < 0.001$). Average cell lengths remained unaffected (Fig. 1B, 347 ± 11 μm versus 363 ± 19 μm, $P = 0.49$). The effects were SC autonomous, because Dlg1-silenced cells were thicker than neighboring cells on the same axon (Fig. 1C).

Coexpression of placental alkaline phosphatase (PLAP) allowed detection of infected SCs by electron microscopy (Fig. 1D). Compact myelin of Dlg1-silenced cells appeared structurally nor-

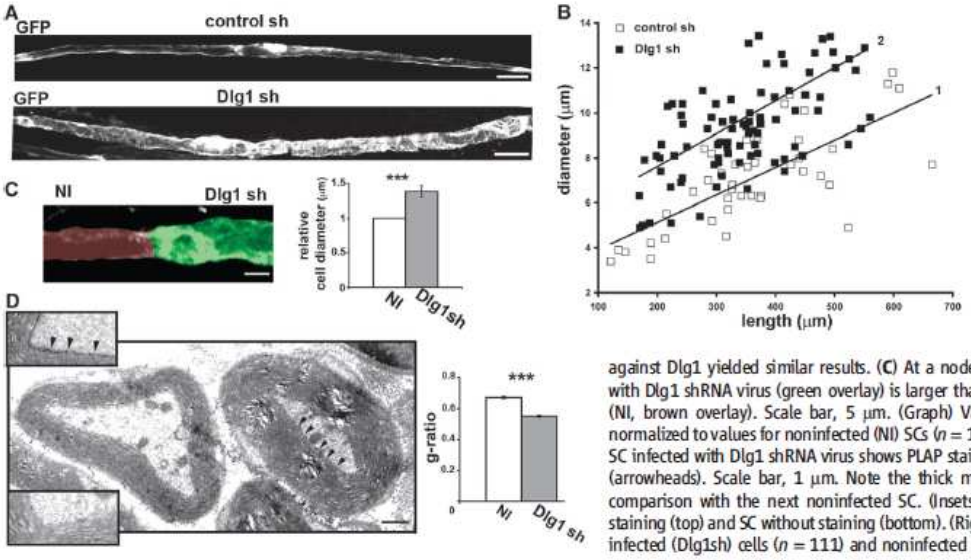

Fig. 1. Dlg1 silencing increases myelin sheath thickness. (**A**) SC infected with Dlg1 shRNA virus (bottom) shows a larger mean diameter than SC infected with control shRNA virus (top). Scale bars, 20 μm. (**B**) Diameters versus lengths of SCs infected with Dlg1 or control shRNAs viruses. Lines: Linear regressions for control (n = 43), slope line 1 and Dlg1 (n = 87), line 2 shRNAs. Two independent shRNAs against Dlg1 yielded similar results. (**C**) At a node of Ranvier, a SC infected with Dlg1 shRNA virus (green overlay) is larger than the next noninfected SC (NI, brown overlay). Scale bar, 5 μm. (Graph) Values for infected SCs are normalized to values for noninfected (NI) SCs (n = 13 nodes) (±SEM). (**D**) (Left) SC infected with Dlg1 shRNA virus shows PLAP staining at interface with axon (arrowheads). Scale bar, 1 μm. Note the thick myelin sheath of this SC in comparison with the next noninfected SC. (Insets) Details of SC with PLAP staining (top) and SC without staining (bottom). (Right) Mean g ratio (±SEM) of infected (Dlg1sh) cells (n = 111) and noninfected (NI) cells (n = 172).

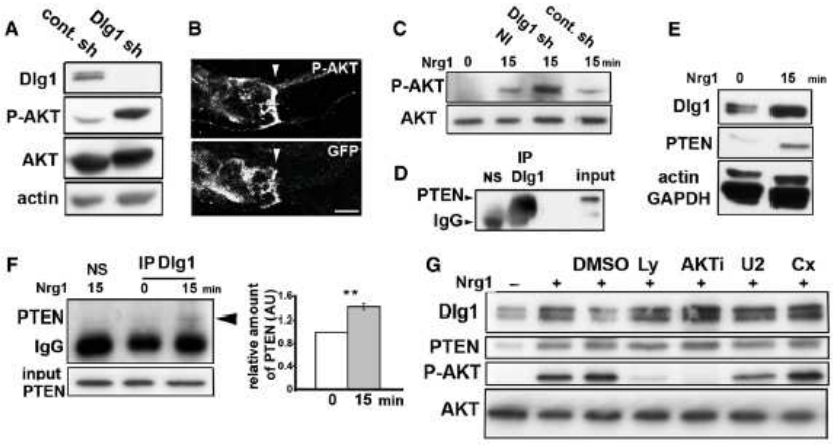

Fig. 2. Dlg1 inhibits AKT activation via interaction with PTEN. (**A**) Cultured SCs silenced for Dlg1 (Dlg1sh) have more phospho-AKT (P-AKT). For quantifications, see fig. S5A. (**B**) At a node of Ranvier (arrowhead), a myelinated SC infected with Dlg1 shRNA virus (GFP) has more P-AKT than the next noninfected SC. Scale bar, 5 μm. (**C**) Cultured Dlg1-silenced SCs (Dlg1sh) stimulated with neuregulin-1 (Nrg1) for 15 min generate more P-AKT than cells infected with control shRNA virus or noninfected cells (NI). Representative results of two independent experiments. (**D**) PTEN coimmunoprecipitates with Dlg1 (IP Dlg1) but not with nonimmune serum (NS) in rat sciatic nerves at 20 dPN. Representative results of two independent experiments. (**E**) Nrg1 stimulation of SCs increases Dlg1 and PTEN amounts after 15 min. Representative results of four independent experiments. (**F**) More PTEN coimmunoprecipitates with Dlg1 when SCs are stimulated with Nrg1. (Graph) Relative amount of coimmunoprecipitated PTEN in stimulated and nonstimulated SCs (±SEM; for four independent experiments). No PTEN is detected when nonimmune serum (NS) is used. (**G**) Cultured SCs, left untreated or treated with Nrg1 for 15 min, and vehicle dimethylsulfoxide (DMSO) or inhibitors of PI3K (Ly), AKT (AKTi), MAPK (U2), and mRNA translation (cycloheximide, Cx). Representative results of three experiments.

mal (fig. S3), except that myelin was thicker (Fig. 1D). Consequently, the *g* ratio (axon diameter/total fiber diameter) was significantly reduced (Fig. 1D), with no change in average axon diameters (10.7 ± 0.4 μm versus 11 ± 0.2 μm, $P = 0.5$).

We also overexpressed Dlg1 fused with green fluorescent protein (GFP) in SCs of mouse sciatic nerves. Two months after birth, the majority of GFP-Dlg1–positive cells were non–myelin-forming cells; most cells expressing GFP alone had myelinated (fig. S4), which suggested that Dlg1 overexpression prevented SC myelination.

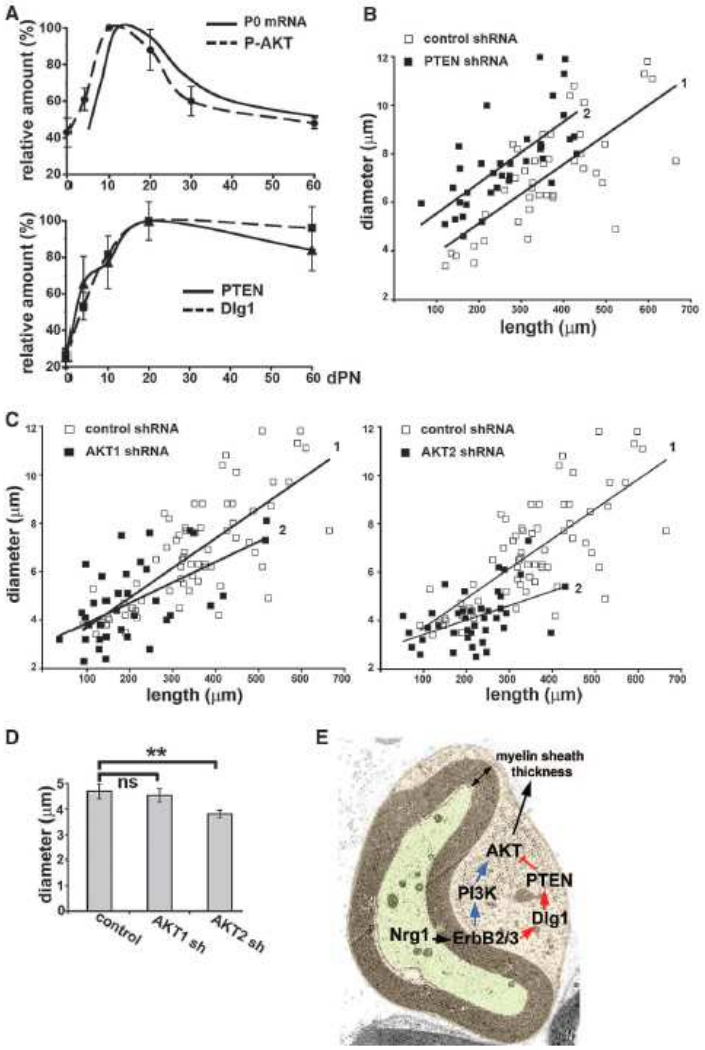

Fig. 3. PTEN, AKT1, and AKT2 participate in the regulation of myelin sheath thickness. (**A**) Relative amounts (±SEM) of Dlg1, PTEN, and phospho-AKT analyzed during myelination in mouse sciatic nerve for at least three mice. (For original data, see fig. S6.) P0 mRNA data are derived from (*5*). Maximal expressions used as reference. Lines: Extrapolated regression curves. (**B**) Diameters versus lengths of SCs infected with PTEN or control shRNAs viruses. Lines: Linear regressions for control ($n = 42$) line 1 and PTEN ($n = 37$) line 2 shRNAs. (**C**) Diameters versus lengths of SCs infected with Akt1, Akt2, or control shRNAs viruses. Lines: Linear regressions for values of control (line 1) and Akt1 or Akt2 (line 2) shRNAs. $n = 39$ (AKT1), 41 (AKT2), and 69 (control). (**D**) Mean cell diameter (±SEM), comparing silenced and nonsilenced SCs of the same length class (<300 μm) for $n = 31$ (AKT1), 34 (AKT2), and 22 (control). (**E**) Neuregulin-1 type III (Nrg1) on axons (green) stimulates erbB2 and erbB3 receptors in Schwann cells (brown). Receptor activation stimulates the PI3K-AKT pathway (blue arrows) promoting myelination. Neuregulin-1 stimulation also stabilizes Dlg1, which interacts with and stabilizes PTEN (red arrows). More PTEN is then available to inhibit AKT activation, which results in curbing of myelination.

Our data indicated that Dlg1 acts as an inhibitor of SC myelination. Myelination is stimulated by axonal neuregulin-1 type III activating erbB2 and erbB3 receptors and stimulating the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)–AKT pathway in SCs (*15*). Thus, we tested whether Dlg1 interferes with AKT activation. Indeed Dlg1 silencing induced a significant increase of AKT activation in cultured SCs (Fig. 2A and fig. S5A), as well as in myelinating SCs in vivo (Fig. 2B). Moreover, Dlg1 reduction potentiated AKT activation upon neuregulin-1 stimulation in cultured SCs (Fig. 2C), which demonstrated that Dlg1 inhibits neuregulin-driven AKT activation.

Dlg1 can interact directly with PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10) (*16*, *17*), an inhibitor of AKT activation (*18*). This interaction may stabilize PTEN (*19*), which results in less AKT activation (*17*). We could coimmunoprecipitate PTEN with Dlg1 from both cultured SCs (fig. S5B) and sciatic nerves (Fig. 2D). Moreover, Dlg1 silencing reduced PTEN levels, whereas Dlg1 overexpression increased them (fig. S5C), which indicated that Dlg1 regulates PTEN amounts in SCs. We also observed that neuregulin-1 stimulation rapidly increased Dlg1 and PTEN (Fig. 2E), which resulted in more Dlg1-PTEN complexes (Fig. 2F).

Although neuregulin-1 activates PI3K-AKT and mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways in SCs (*15*, *20*), inhibiting these pathways did not prevent the increase in Dlg1 and PTEN upon stimulation (Fig. 2G). This rapid increase was also not blocked by cycloheximide (Fig. 2G), which suggested that neuregulin-1 stimulation prevented Dlg1 and PTEN degradation. Indeed, blocking the SC proteasome increased Dlg1 and PTEN levels (fig. S5D). These proteins, and also AKT, were ubiquitinated in nonstimulated SCs and blocking the proteasome increased the amount of ubiquitinated proteins (fig. S5, E and F). Neuregulin-1 stimulation of these cells reduced the levels of ubiquitinated Dlg1 and PTEN (fig. S5E) but not of AKT (fig. S5F), which indicated that neuregulin-1 specifically prevents Dlg1 and PTEN ubiquitination and degradation, which leads to more Dlg1-PTEN complexes.

In mouse sciatic nerves, axonal neuregulin-1 type III stimulates myelination and the myelination rate [illustrated by the levels of myelin protein zero (P0) mRNA], and AKT activation (phospho-AKT levels) increases during the two first postnatal weeks (Fig. 3A and fig. S6). Dlg1 and PTEN levels also increased (Fig. 3A), whereas levels of polyubiquitinated Dlg1 and PTEN decreased (fig. S7), which suggests that neuregulin-1 stimulation also stabilizes Dlg1 and PTEN during myelination.

Although murine myelination continues for several months, the myelination rate and AKT activation decrease around 2 weeks after birth (Fig. 3A) (*5*). This inhibition of myelination correlates with the plateau reached by Dlg1 and PTEN expression (Fig. 3A), consistent with the proposed

inhibitory role of Dlg1 during myelination. To check the functional role of PTEN, we silenced its expression in SCs of sciatic nerves. As expected, reduction of PTEN expression correlated with an increase of phospho-AKT in infected cells (fig. S8). Myelinating SCs silenced for PTEN showed a thicker myelin sheath compared with control cells of similar length (Fig. 3B; 7.6 ± 0.3 μm versus 6.1 ± 0.3 μm; length < 405 μm; $P < 0.01$). We conclude that PTEN works in concert with Dlg1 as myelination inhibitor.

Transgenic expression of constitutively active AKT in SCs by using the proteolipid protein promoter has been reported not to affect myelination (*21*). However, low expression levels or compensatory mechanism may have overshadowed an effect. Thus, using our experimental setting, we tested whether AKT, a target of Dlg1 and PTEN, is required for SC myelination. Silencing of the more ubiquitously expressed isoforms Akt1 or Akt2 (*22*) (fig. S9) resulted in shorter myelin sheaths (Fig. 3C), which showed that these proteins are required for myelination and/or myelin sheath maintenance. Cells silenced for Akt2 had significantly reduced diameters compared with control cells of similar lengths, whereas Akt1-silenced cells did not (Fig. 3D), which suggests that Akt2 is also required for correct myelin sheath thickness.

Taken together, our data indicate that a molecular mechanism involving the critical functions of Dlg1 and PTEN prevents SC overmyelination when they are stimulated with neuregulin-1 (Fig. 3E). Myelination is also regulated, however, by the amount of neuregulin-1 expressed in axons (*3*, *4*) and the availability of erbB2 and erbB3 receptors on SCs (*23*, *24*). To test whether changes in these parameters are primarily responsible for curbing the myelination rate, we silenced Dlg1 in myelinating SCs at 20 dPN, after major myelination is stalling. Three weeks later, SCs silenced for Dlg1 had produced significantly larger myelin sheaths (Fig. 4A; 8.5 ± 0.3 μm versus 5.3 ± 0.2 μm; $P < 0.001$), which showed that mechanisms stimulating SC myelination were still active at the time myelination was curbed. Thus, the Dlg1 brake appears to be the main mechanism reducing myelination at this age. When overmyelination was allowed to proceed for longer (6 weeks after injection), demyelination features were abundant, and only the shortest myelinated cells remained (fig. S10). Thus, the cells with the most oversized myelin are unstable, consistent with observations in several peripheral neuropathies (*7*).

Dlg1 interacts with the CMT4B-disease protein MTMR2 (*8*). We found that some Dlg1-silenced cells displayed small outfoldings (Fig. 4B) that occasionally expanded in large focally folded myelin sheaths, reminiscent of structural defects in CMT4B (Fig. 4C). This suggested that Dlg1 function might be altered in MTMR2 mutant SCs. Therefore, we silenced Dlg1 in SCs of the sciatic nerve of MTMR2 mutant mice. Dlg1-silenced cells were morphologically equal to control cells (Fig. 4D, diameter: 6.4 ± 0.4 μm versus 6.7 ± 0.3 μm, $P = 0.47$), showing that Dlg1 was not inhibiting myelination in these cells. We propose that the myelination brake triggered by Dlg1 is missing in CMT4B-diseased SCs, which results in overmyelination, defects in myelin deposition, and, finally, demyelination.

Over 50 years ago, Rushton showed in a pivotal paper (*25*) that myelin sheath diameter is optimally sized toward a certain NCV. The myelination brake involving Dlg1 and PTEN appears to be essential for this optimization, in addition to axonal stimulation.

Perturbation of this basic regulatory mechanism provides a mechanistic basis for the etiology of hereditary peripheral neuropathies characterized by hypermyelination, and the control of enzymatic activities involved in this mechanism, PTEN and AKT, may serve as therapeutic strategies for these diseases.

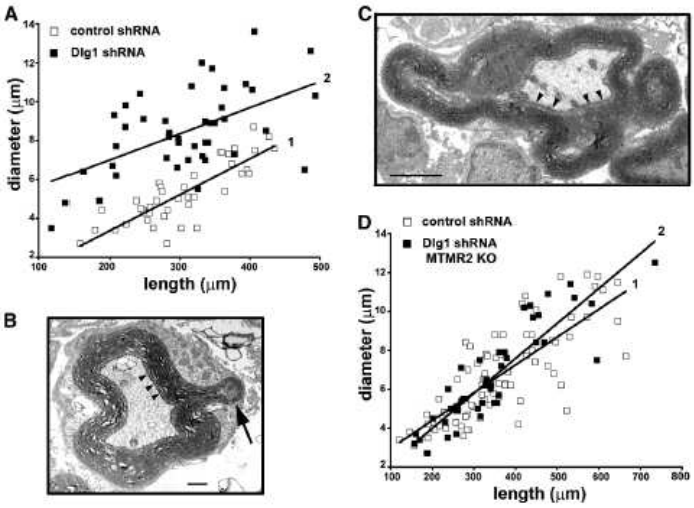

Fig. 4. Dlg1 is essential to curb myelination. **(A)** Dlg1 or control shRNAs adenoviruses were injected in mice after myelination slowdown (20 dPN). (Graph) Diameters versus lengths of infected SCs 3 weeks after injection. Lines: Linear regressions for values of control ($n = 41$) (line 1) and Dlg1 ($n = 43$) (line 2) shRNAs. **(B)** Hypermyelinated fiber expressing Dlg1 shRNA and PLAP (arrowheads) displays a typical outfolding (arrow). Scale bar, 800 nm. **(C)** Myelinating SC expressing Dlg1 shRNA and PLAP (arrowheads) show excessive and aberrant myelin deposition with large outfoldings. Scale bar, 2 μm. **(D)** Dlg1 or control shRNAs viruses were injected in sciatic nerves of MTMR2 mutant pups. (Graph) Diameters versus lengths of infected SCs. Lines: Linear regressions for values of control ($n = 80$) (line 1) and Dlg1 ($n = 45$) (line 2) shRNAs viruses.

References and Notes

1. S. G. Waxman, *Muscle Nerve* **3**, 141 (1980).
2. S. G. Waxman, *Curr. Biol.* **7**, R406 (1997).
3. G. V. Michailov *et al.*, *Science* **304**, 700 (2004).
4. C. Taveggia *et al.*, *Neuron* **47**, 681 (2005).
5. N. Stahl, J. Harry, B. Popko, *Brain Res. Mol. Brain Res.* **8**, 209 (1990).
6. S. Bonneick *et al.*, *Hum. Mol. Genet.* **14**, 3685 (2005).
7. U. Suter, S. S. Scherer, *Nat. Rev. Neurosci.* **4**, 714 (2003).
8. A. Bolis *et al.*, *J. Neurosci.* **25**, 8567 (2005).
9. T. Yamanaka, S. Ohno, *Front. Biosci.* **13**, 6693 (2008).
10. Materials and methods are available as supporting material on *Science* Online.
11. A. Bolis *et al.*, *J. Neurosci.* **29**, 8858 (2009).
12. D. M. Pegtel *et al.*, *Curr. Biol.* **17**, 1623 (2007).
13. J. R. Chan *et al.*, *Science* **314**, 832 (2006).
14. M. Özçelik *et al.*, *J. Neurosci.* **30**, 4120 (2010).
15. K. A. Nave, J. L. Salzer, *Curr. Opin. Neurobiol.* **16**, 492 (2006).
16. N. B. Adey *et al.*, *Cancer Res.* **60**, 35 (2000).
17. A. Contreras-Paredes, E. De la Cruz-Hernández, I. Martínez-Ramírez, A. Dueñas-González, M. Lizano, *Virology* **383**, 78 (2009).
18. L. Salmena, A. Carracedo, P. P. Pandolfi, *Cell* **133**, 403 (2008).
19. M. Valiente *et al.*, *J. Biol. Chem.* **280**, 28936 (2005).
20. T. Ogata, S. Yamamoto, K. Nakamura, S. Tanaka, *Mol. Neurobiol.* **33**, 51 (2006).
21. A. I. Flores *et al.*, *J. Neurosci.* **28**, 7174 (2008).
22. M. Hanada, J. Feng, B. A. Hemmings, *Biochim. Biophys. Acta* **1697**, 3 (2004).
23. A. N. Garratt, O. Voiculescu, P. Topilko, P. Charnay, C. Birchmeier, *J. Cell Biol.* **148**, 1035 (2000).
24. S. Chen *et al.*, *J. Neurosci.* **26**, 3079 (2006).
25. W. A. Rushton, *J. Physiol.* **115**, 101 (1951).

26. We thank J. Salzer for his help with cocultures, N. Mantei, C. Perrin-Tricaud for critically reading the manuscript, and the Light Microscopy Center and Electron Microscopy Center at ETH facilities of the ETHZ for technical help. Supported by the Swiss National Science Foundation (N.T. and U.S.), the National Centre of Competence in Research "Neural Plasticity and Repair," and ETH Zürich (ETH IIRA).

Supporting Online Material

www.sciencemag.org/cgi/content/full/science.1187735/DC1
Materials and Methods
Figs. S1 to S10
References

1 February 2010; accepted 7 April 2010
Published online 6 May 2010;
10.1126/science.1187735
Include this information when citing this paper.