Etude des mécanismes impliqués dans la mort oligodendrocytaire induite par la protéolipide-protéine mutée : rôle du stress du réticulum endoplasmique et identification des modulateurs à fort potentiel pour le traitement des pathologies dysmyélinisantes

Anne-Sophie Wilding

▶ **To cite this version:**

Anne-Sophie Wilding. Etude des mécanismes impliqués dans la mort oligodendrocytaire induite par la protéolipide-protéine mutée : rôle du stress du réticulum endoplasmique et identification des modulateurs à fort potentiel pour le traitement des pathologies dysmyélinisantes. Neurosciences. Université de Strasbourg, 2017. Français. NNT : 2017STRAJ073 . tel-01707470

HAL Id: tel-01707470
https://theses.hal.science/tel-01707470

Submitted on 12 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.

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

ÉCOLE DOCTORALE des Sciences de la Vie et de la Santé (ED 414)

INSERM UMR_S U1119 Biopathologie de la Myéline, Neuroprotection et Stratégies Thérapeutiques

THÈSE

présentée par :

Anne-Sophie WILDING

soutenue le : **28 septembre 2017**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Neurosciences

Etude des mécanismes impliqués dans la mort oligodendrocytaire induite par la protéolipide-protéine mutée: rôle du stress du réticulum endoplasmique et identification des modulateurs à fort potentiel pour le traitement des pathologies dysmyélinisantes

THÈSE dirigée par :

M. MENSAH-NYAGAN Ayikoé, Guy	Professeur, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Mme. AKWA Yvette	Docteur-HDR, Chargée de Recherche INSERM, Université Paris-Sud
M. CHARLIER Thierry	Professeur, Université de Rennes 1

AUTRE MEMBRE DU JURY :

Mme. MATHIS Chantal	Directeur de Recherche CNRS, Université de Strasbourg

---

INVITE :

Mme. KEMMEL Véronique	Docteur, Université de Strasbourg

Remerciements

En premier lieu je souhaiterais exprimer toute ma gratitude à mon directeur de thèse, le Professeur Ayikoé Guy Mensah-Nyagan, pour m'avoir accordé sa confiance en m'accueillant au sein de son unité et pour m'avoir confié la réalisation de ce projet. Je le remercie sincèrement pour sa disponibilité, son investissement et son soutien indéfectible pendant ces trois années de doctorat. Merci de m'avoir guidée et encouragée à donner le meilleur de moi-même.

Je tiens à adresser mes sincères remerciements au Professeur Thierry Charlier, au Docteur-HDR Yvette Awka et au Docteur Chantal Mathis, directeur de recherche au CNRS, pour avoir accepté de consacrer de leur précieux temps à l'évaluation de ce travail ainsi que de siéger dans le jury de ma thèse.

Ce travail n'aurait pas pu être mené à bien sans toutes les personnes qui m'ont aidée pendant l'élaboration de ma thèse, à commencer par l'ensemble de mes collègues de l'unité U1119.

Un grand merci au Docteur Véronique Kemmel pour toutes nos conversations scientifiques ainsi que vos nombreux et précieux conseils qui m'ont aidée à avancer et à mener à bien mes travaux de recherche. Merci d'avoir partagé votre expérience avec moi et de m'avoir épaulée dans les périodes de remise en question.

Je remercie le Docteur Laurence Meyer pour son implication dans les expériences *in vivo* et son aide en de nombreuses circonstances, notamment pendant les périodes de rédaction. Merci pour nos discussions qui m'ont aidé et remonté le moral dans les moments difficiles mais également pour tous les bons moments passés ensemble à rigoler de tout et de rien.

Je remercie également le Docteur Christine Patte-Mensah pour sa disponibilité, les nombreux conseils prodigués ainsi que pour sa bonne humeur communicative.

Merci aux Docteurs Béatrice Uring-Lambert et Susana Brun pour leur précieuse aide lors des expériences de cytométrie de flux ainsi que pour tous les conseils à la fois techniques et théoriques.

Je remercie chaleureusement mes collègues de bureau Célia Matta et Claudia de Tapia pour tous ces moments partagés ensemble, pour votre bonne humeur et votre aide au quotidien. Merci à Géraldine Leva pour son soutien moral durant ces trois années et particulièrement lors de la rédaction de nos thèses respectives.

Un grand merci à Jérémie Benyounes, toujours volontaire pour aider, motiver et remonter le moral des troupes. Plus qu'un collègue tu es devenu un de mes meilleurs amis lors de ces trois dernières années et ton soutien ainsi que ta bienveillance auront été un véritable moteur pour moi, merci « fraté » !

Merci enfin à Elvira Kostreba pour sa précieuse aide technique durant cette dernière année de thèse et pour sa sympathie qui apportait toujours une bonne ambiance dans le laboratoire.

Je souhaite exprimer mes sincères remerciements au Docteur Dominique Bagnard et à son équipe pour m'avoir accueillie lors de la réalisation des expériences d'Xcelligence. Je remercie notamment le Docteur Caroline Spenlé pour m'avoir formée à cette technique, merci pour ta grande disponibilité, tes nombreux conseils et ta gentillesse.

Merci à tous mes amis qui m'ont soutenue et épaulée dans les moments difficiles et avec qui j'ai construit des souvenirs inoubliables pendant ces trois années. Merci aux membres du CCK, Sasha, Marie et Sinan pour tous les supers moments partagés ensemble, tous les fous rires et toutes nos *private-jokes*. Une parenthèse particulière pour toi, Marie, dont le soutien sans faille ainsi que les milliers de conseils prodigués lors de nos innombrables kir-taverne (qui sont maintenant devenus kir-téléphone) ont été d'une aide inestimable pour moi, j'aimerais pouvoir te le rendre au centuple. Merci à Maxime et Seb pour toutes ces soirées passées à refaire le monde. Merci à Marion pour sa présence et son aide face aux difficultés ainsi que pour toutes les soirées pizza et émissions « culturelles » qui nous ont permis de relâcher la pression. Je remercie également mon amie de longue date, Amel, que je n'oublie pas malgré la distance. Merci à Julie d'avoir toujours été à mes côtés et d'avoir mis tellement de fun et de paillettes dans ma vie, « when life gives you lemon… grab tequila and salt ».

Un grand merci à ma moitié, Laurent, pour son soutien au quotidien. Merci d'avoir toujours cru en moi et de m'avoir réconfortée pendant les périodes de pression et ce malgré mes sautes d'humeur. Je te remercie pour tout le bonheur que tu m'apportes toi ainsi que nos deux monstres poilus Leia et Algernon.

Je remercie ma mamie, mes tatas Antoinette et Constance et adresse une pensée particulière pour mon pépé, ma mémé et mon parrain qui ne sont plus parmi nous aujourd'hui mais que j'espère avoir rendus fiers.

Enfin, je tiens à remercier ma mère pour avoir été présente, m'avoir écoutée et soutenue sans relâche durant ces 26 dernières années. Tu m'as souvent donné la confiance dont je manquais et tu as toujours trouvé les mots en toutes circonstances, merci d'avoir fait de moi celle que je suis aujourd'hui.

Sommaire

Liste des figures 6

Liste des tableaux 9

Abréviations 10

Résumé de la thèse 13

Abstract 19

1. Introduction 20

1.1 La myéline du SNC et ses pathologies 21

1.1.1 Architecture de la gaine de myéline 21

1.1.2 Nœuds de Ranvier 24

1.1.3 Biochimie 25

1.1.3.1 Lipides 26

1.1.3.1.1 Cholestérol 26

1.1.3.1.2 Phospholipides 27

1.1.3.1.3 Glycosphingolipides 28

1.1.3.2 Protéines de la myéline 29

1.1.3.2.1 Protéolipide-protéine (PLP) 30

1.1.3.2.2 Protéine basique de la myéline (MBP) 35

1.1.3.2.3 Glycoproteine associée à la myéline (MAG) 37

1.1.3.2.4 Myéline/oligodendrocyte protéine (MOG) 38

1.1.3.2.5 2′,3′-cyclic nucleotide 3′-phosphodiesterase (CNP) 38

1.1.4 Les oligodendrocytes 39

1.1.4.1 Développement 39

1.1.4.2 Migration 42
1.1.4.3 Maturation et myélinisation 43
1.1.5 Les pathologies de la myéline 45
1.1.5.1 Pathologies démyélinisantes 45
1.1.5.2 Pathologies dysmyélinisantes/hypomyélinisantes 47
1.1.5.3 Pathologies avec atteintes de la gaine de myéline 48
1.1.5.3.1 Pathologies psychiatriques 48
1.1.6.3.2 Pathologies neurodégénératives 49
1.2 La maladie de Pelizaeus-Merzbacher 50
1.2.1 Introduction 50
1.2.2 Incidence et prévalence dans la population 53
1.2.3 Formes cliniques et symptomatologie 54
1.2.4 Génétique 56
1.2.5 Diagnostique et traitement 60
1.2.6 Physiopathologie 64
1.2.6.1 Perte de fonction 65
1.2.6.1.1 Délétions 65
1.2.6.2 Gain de fonction 66
1.2.6.2.1 Duplications 66
1.2.6.2.2 Mutations ponctuelles 68
1.3 Le stress du réticulum endoplasmique 71
1.3.1 Le réticulum endoplasmique 71
1.3.2 La réponse UPR (unfolded protein response) 74
1.3.2.1 La voie PERK 77
1.3.2.2 La voie IRE1 77

1.3.2.3 La voie ATF6 78
1.3.3 Apoptose induite par le stress du RE 79
1.3.4 Stress du réticulum endoplasmique et pathologies 81
1.3.4.1 Stress du réticulum endoplasmique et maladies neurodégénératives 81
1.3.4.2 Stress du RE et pathologies de la myéline 83
1.3.4.3 Stress du réticulum endoplasmique et PMD 85
1.4 Molécules à potentiel thérapeutique 88
1.4.1 Les modulateurs du stress du RE 88
1.4.1.1 Chaperonne chimique : le 4-Phenylbutyrate (4-PBA) 88
1.4.1.2 La rapamycine 92
1.4.2 Neurostéroïdes et stéroïdes neuroactifs 94
1.4.2.1 Stéroïdes neuroactifs et myéline 96
1.4.2.2 Effets protecteurs des stéroïdes neuroactifs 98
1.5 Objectifs de la thèse 101
2. Matériels et méthodes 103
2.1. Culture cellulaire 104
2.1.1. Lignée 158N et 158JP 104
2.1.1.1. Entretien des cellules en culture 104
2.1.1.2 Congélation et décongélation des cellules 105
2.1.1.3 Comptage cellulaire 106
2.1.1.4 Substances pharmacologiques 106
2.2 Tests de viabilité cellulaire 108
2.2.1 Test de viabilité MTT 108
2.2.2 Test de viabilité des cellules au Bleu de Trypan 110
2.2.3 Xcelligence 111

2.3 RT-qPCR 112

2.3.1 Extraction pour RT-qPCR 112

2.3.2 Détermination de la quantité et de la qualité de l'ARN extrait 113

2.3.3 Transcription inverse 114

2.3.4 PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR) 115

2.4 Analyses protéiques 118

2.4.1 Extraction protéique 118

2.4.2 Mesure de la concentration en protéine 118

2.4.3 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE) 119

2.4.4 Western blot 120

2.4.4.1 Transfert semi-sec 120

2.4.4.2 Système de quantification « stain free » et immuno-detection 121

2.5 Cytométrie en flux 123

2.5.1 Marquage de l'Annexine-V et à l'iodure de propidium 124

2.5.2 Marquage de la Caspase-12 activée 124

2.5.3 Analyse par le cytomètre de flux 124

2.6 Analyses statistiques 125

3. Résultats 126

3.1 Effets de la mutation PLP sur la survie des OL 158JP 127

3.1.1 Diminution de la viabilité des OL 158JP par rapport aux OL contrôles 158N 127

3.1.2 La diminution de viabilité des OL 158JP est corrélée à l'activation des mécanismes d'apoptose 128

3.1.3 Mise en évidence d'un niveau basal élevé de stress du RE dans les OL 158JP 132

3.2 Effet protecteur du 4-PBA, inhibiteur du stress du RE, sur la mort olygodendrocytaire induite par la mutation PLP 140

3.3 Effets de la rapamycine sur la survie des OL 158JP 143

3.4 Effets des neurostéroïdes et stéroïdes neuroactifs sur la survie des OL 158JP 146

3.4.1 Effets de l'alloprégnanolone et de l'œstradiol 146

3.4.1.1 Effet de l'œstradiol sur la survie cellulaire des cellules 158N et 158JP 146

3.4.1.2 Effet de l'œstradiol sur le stress du RE 149

3.4.1.3 Effet de l'alloprégnanolone sur la survie des OL 158N et 158JP 150

3.4.1.4 Effet de l'alloprégnanolone sur le stress du RE 153

3.4.2 Effets des autres stéroïdes neuroactifs sur la survie des OL 158N et 158JP 153

4. Discussion 158

4.1 Conséquence de la mutation PLP sur la survie cellulaire et l'induction du stress du RE dans les cellules 158JP 160

4.2 Effet protecteur du 4-PBA sur la survie des OL 158JP 165

4.3 Inefficacité de la rapamycine dans la protection des OL 158JP contre la mort cellulaire 167

4.4 Absence d'effet des stéroïdes neuroactifs sur la survie des OL 158JP 168

5. Conclusion et perspectives 170

Références 174

Annexe : article soumis……...…….199

Liste des figures

Figure 1 : Organisation de la gaine de myéline. 22

Figure 2 : Organisation des lignes périodiques et intra-périodiques 23

Figure 3 : Abondance relative des protéines de la myéline déterminée par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse. 30

Figure 4 : Orientation de la PLP à la membrane de la myéline. 32

Figure 5 : Représentation schématique de l'organisation structurelle de la myéline compacte..... 34

Figure 6 : Représentation schématique des différents stades du lignage oligodendrocytaire. . 41

Figure 7 : Illustration schématique des 3 mécanismes de mutations impliqués dans la PMD. 57

Figure 8 : Illustration des relations entre phénotype et génotype dans la PMD. 60

Figure 9: Images pondérées en T2 d'un sujet sain âgé de 3ans (A) et d'un patient du même âge atteint de PMD (B). 62

Figure 10 : Illustration schématique de l'organisation du réticulum endoplasmique. 71

Figure 11: Représentation schématique de la voie de dégradation ERAD1. 73

Figure 12 : La chaperonne BiP est le régulateur central des voies de signalisation de l'UPR. 76

Figure 13 : Hypothèse physiopathologique des formes sévères et modérées de PMD. 87

Figure 14 : Le mécanisme d'action supposé du 4-PBA implique sa capacité à interagir comme une chaperonne avec les domaines hydrophobes des protéines mal conformées, ce qui permet de réduire leur agrégation et de diminuer la réponse UPR. 91

Figure 15: Le 4-PBA par son activité d'inhibiteur des histones désacétylases est susceptible d'agir sur le stress du RE en permettant la transcription de gènes pro-survie associés à la réponse adaptative de l'UPR. 92

Figure 16 : Illustration schématique des étapes de biosynthèse des neurostéroïdes. 95

Figure 17 : Différences de morphologie des cellules 158N et 158JP. 104

Figure 18 : Principe du test MTT. 109

Figure 19 : Principe de l'extraction ARN au NucleoZOL. 113

Figure 20 : Illustration de la baisse de viabilité et de l'augmentation de la mortalité dans les cultures d'OL 158JP comparées aux cultures d'OL contrôles 158N. 128

Figure 21: Evaluation qualitative de l'apoptose dans les cellules 158JP et 158N par cytométrie de flux. 130

Figure 22: Evaluation des niveaux endogènes des marqueurs de l'apoptose dans les cellules 158N et 158JP. 131

Figure 23 : Evaluation des niveaux endogènes de stress du RE dans les OL 158N et 158JP. 133

Figure 24: Evaluation quantitative (A) et quantitative (B) de l'expression de l'ARNm de XBP1s dans les cellules 158N et 158JP. 134

Figure 25 : Evaluation des niveaux endogènes de CHOP dans les OL 158N et 158JP. 136

Figure 26 : Effet dose-réponse de la tunicamycine sur les cellules 158N et 158 JP. 137

Figure 27: Effet de la tunicamycine sur la concentration des ARNm codant la protéine CHOP dans les cellules 158N et 158JP. 138

Figure 28: Evaluation qualitative (A) et quantitative (B) par cytométrie de flux de l'expression de la caspase-12 activée dans les OL 158N et 158JP. 139

Figure 29 : Effet d'un traitement au 4-PBA sur les marqueurs du stress du RE dans les cellules 158JP. 141

Figure 30 : Analyse par le test d'exclusion au bleu de trypan de l'effet du 4-PBA sur la survie des OL 158JP. 143

Figure 31: Effet d'un traitement au 4-PBA sur les marqueurs de l'apoptose dans les OL 158JP. 142

Figure 32 : Evaluation cinétique de l'effet dose-réponse de la rapamycine sur la viabilité des OL 158N (A, C) et 158JP (B, D). 144

Figure 33 : Analyse par le test d'exclusion au bleu de trypan de l'effet de la rapamycine sur la survie des OL 158JP. 145

Figure 34 : Evaluation cinétique de l'effet dose-réponse de l'œstradiol sur la viabilité des OL 158N (A, B) et 158JP (C, D). 147

Figure 35: Analyse par le test d'exclusion au bleu de trypan de l'effet de l'œstradiol sur la survie des OL 158N et 158JP. 148

Figure 36 : Illustration de l'impédance des cellules 158JP en absence (témoin) ou en présence de 10nM d'œstradiol. 148

Figure 37: Effet de l'œstradiol sur les marqueurs du stress du RE dans les cellules 158JP**.** . 149

Figure 38 : Evaluation cinétique de l'effet dose-réponse de l'alloprégnanolone sur la viabilité des OL 158N (A, B, C) et 158JP (D, E, F). 151

Figure 39 : Analyse par le test d'exclusion au bleu de trypan de l'effet de l'alloprégnanolone (500nM) sur la survie des OL 158N (A) et 158JP (B). 152

Figure 40 : Analyse de l'impédance des cellules 158JP en présence (témoin) ou en absence d'alloprégnanolone (Allo) à 500nM. 152

Figure 41: Analyse RT-qPCR de l'expression de CHOP dans les OL 158JP après 24h de traitement à l'alloprégnanolone (500nM). 153

Figure 42 : Evaluation cinétique de l'effet dose-réponse de la DHEA sur la viabilité des OL 158N (A, B, C) et 158JP (D, E, F). 154

Figure 43 : Evaluation cinétique de l'effet dose-réponse de la DHT sur la viabilité des OL 158N (A, B, C) et 158JP (D, E, F). 155

Figure 44: Etude cinétique et dose-réponse de l'effet de la progestérone sur la viabilité des OL 158N (A, B, C) et 158JP (D, E, F). 156

Figure 45: Etude dose-réponse d'un traitement à l'acétate d'ulipristal sur les cellules 158JP. 157

Figure 46: Schéma du cycle UPR selon Southwood et al. (2016). 164

Liste des tableaux

Tableau 1 : Historique de la découverte des liens entre la PMD, la découverte de la PLP et la localisation de son gène PLP1 sur le chromosome X. 52-53

Tableau 2 : Substances pharmacologiques utilisées. 107

Tableau 3 : Séquences des oligonucléotides. 116

Tableau 4 : Programme d'amplification des fragments d'ADN réalisé par l'iCycler. 117

Tableau 5 : Protocole de transfert des protéines du gel vers la membrane de PVDF en fonction du poids moléculaire de la protéine. 121

Tableau 6 : Liste des anticorps utilisés dans les analyses Western blot. 123

Abréviations

17β-HSD : 17β-hydroxystéroïde déshydrogenase

3α-HSOR : 3α-hydroxystéroïde déshydrogenase

3β-HSD : 3β-hydroxystéroïde déshydrogenase

4-PBA *: 4-Phenylbutyric Acid* (acide 4-phenyl-butyrique)

5α-R : 5α-réductase

ABR : *Auditory Brainstem Response* (réponse évoquée auditive du tronc cérébral)

ADNc : ADN complémentaire

AMPc : Adénosine Monophosphate Cyclique

ATF : Activating Transcription Factor (facteur activateur de la transcription)

Aβ : Amyloïde β

Bax : *Bcl-2 Associated X protein*

Bcl-2 : *B-Cell Lymphoma 2-like proteins*

BiP : *Binding immunoglobulin protein*

BSA : *Bovine Serum Albumine* (albumine sérique bovine)

Ca^{2}+ : Ions calcium

CHOP : *C/EBP-homologous protein*

CNP : *2',3'-Cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase*

DHEA : Déhydroépiandrostérone

DHT : Dihydrotestostérone

DMEM : *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

eIF2 : *Eukaryotic Initiation Factor 2*

ERAD : *Endoplasmic-Reticulum-Associated Protein Degradation* (dégradation des protéines associée au RE)

FITC : Isothiocyanate de fluorescéine

GalC : Galactosylceramide

HDAC : Histone Désacétylase

IP : Iodure de Propidium

iRE1 : *Inositol-Requiring Enzyme 1*

MAG : *Myelin-Associated Glycoprotein* (Glycoprotéine associée à la myéline)

MBP : *Myelin Basic Protein* (Protéine basique de la myéline)

Md : *Myelin Deficient*

MOG : *Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein* (Myéline/oligodendrocyte protéine)

Msd : *Myelin Synthesis Deficient*

NaV : Canaux sodiques voltages dépendants

OL : Oligodendrocyte(s)

OPC : Cellules progénitrices d'OL

P450c17 : Cytochrome P450c17

P450scc : *Cytochrome P450 side-chain-cleavage* (enzyme de clivage de la chaîne latérale du cholestérol)

PBS : Phosphate buffered saline

PE : Phycoérythrine

PERK : *Protein kinase RNA-like ER kinase*

PLP : Protéolipide-Protéine

PMD : *Pelizaeus-Merbacher Disease* (maladie de Pelizaeus-Merzbacher)

PVDF : Polyfluorure de Vinylidène

qPCR : *Quantitative Polymerase Chain Reaction* (réaction en chaîne par polymérase quantitative)

RE : Réticulum Endoplasmique

RIPA : *RadioImmunoprecipitation Assay Buffer* (tampon de radioimmunoprécipitation)

ROS : *Reactive Oxygen Species* (espèces réactives oxygénées)

RPM : Rotations Par Minute

Rsh : *Rumpshaker*

RT : *Reverse Transcription* (transcription inverse)

SDS : *Sodium Dodécyl Sulfate* (dodécylsulfate de sodium)

SDS-PAGE : *Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (dodécylsulfate de sodium - électrophorèse sur gel de polyacrylamide)

SEM : *Standard Error of the Mean* (erreur standard sur la moyenne)

SEP : Sclérose En Plaques

Sh : *Shaking Pup*

SN : Système Nerveux

SNC : Système Nerveux Central

SNP : Système Nerveux Périphérique

TBS : *Tris Buffered Saline* (tampon tris salin)

uORF : *Upstream Open Reading Frame* (cadre ouvert de lecture en amont)

UPR : *Unfolded Protein Response*

XBP1 : *X-box Binding Protein 1*

XBP1s : *X-box Binding Protein 1 spliced* (forme épissée de XBP1)

Résumé de la thèse

La protéolipide-protéine (PLP) est une protéine majeure de la myéline dans le système nerveux central (SNC). Les mutations du gène PLP (situé sur le chromosome X) sont responsables de pathologies dysmyélinisantes homologues récessives car ces mutations, qui modifient des acides aminés conservés entre les espèces, provoquent une mort accélérée des oligodendrocytes (OL) synthétisant la myéline dans le SNC. La pathologie humaine causée par les mutations du gène PLP est la maladie de Pelizaeus-Metzbacher (PMD) qui appartient à la famille des leucodystrophies. Les patients PMD souffrent d'une sévère hypomyélinisation se traduisant sur le plan clinique par une détérioration des fonctions motrices et cognitives. Il n'existe à ce jour aucun traitement efficace pour ce type de pathologies. Une des mutations du gène PLP impliquées dans la PMD chez l'humain est également retrouvée chez la souris jimpy qui développe un phénotype clinique très sévère. La souris jimpy (PLP-mutantes) caractérisée par une perte oligodendrocytaire importante représente un modèle animal pertinent pour l'étude préclinique de la PMD, des leucodystrophies ou des pathologies dysmyélinisantes. Toutefois, la durée de vie très courte des souris jimpy (30 jours), le mode de transmission de la pathologie liée au chromosome X ainsi que les règles éthiques sur l'expérimentation animale ne facilitent pas leur utilisation intensive pour décrypter les mécanismes cellulaires et moléculaires déterminant les relations de cause à effet entre les mutations PLP et la mort oligodendrocytaire. Etant donné que les relations mécanistiques entre l'expression anormale de PLP et la mort des OL ne sont pas bien élucidées, il s'avère difficile, voire impossible de développer des stratégies thérapeutiques ciblées permettant de lutter efficacement contre la mort oligodendrocytaire et la dysmyélinisation. Ainsi, dans le but de faciliter l'expérimentation visant le décryptage et l'élucidation des mécanismes physiopathologiques impliqués dans la PMD et les pathologies de la myéline, des travaux antérieurs ont permis d'immortaliser, à partir du SNC des souris jimpy et des souris normales (témoins), deux

lignées d'OL dénommées respectivement OL 158JP (souris jimpy) et OL 158N (souris normales). Ces deux lignées oligodendrocytaires possèdent des caractéristiques d'OL matures mais les OL 158JP présentent des anomalies cellulaires, notamment un adressage membranaire défectueux de la PLP, un déficit du cycle cellulaire évoqué par un dysfonctionnement de la signalisation AMPc dépendante et une activation des facteurs cellulaires oxydants.

Les objectifs de ce travail de thèse ont donc été d'utiliser les lignées cellulaires OL 158JP et 158N pour résoudre les questions suivantes:

(i) déterminer les relations entre la mutation PLP et l'accélération de la mort oligodendrocytaire;

(ii) identifier les mécanismes ou processus endogènes facilitateurs de mort cellulaire qui prédominent dans le milieu intracellulaire des OL 158JP comparés aux OL 158N;

(iii) vérifier si l'inhibition ciblée (par des agents pharmacologiques appropriés) des mécanismes endogènes inducteurs de mort oligodendrocytaire peut améliorer *in vitro* la survie cellulaire et ouvrir des perspectives d'utilisation *in vivo* de ces agents pharmacologiques pour traiter efficacement les symptômes des souris jimpy.

Pour adresser la question de la relation de cause à effet entre la mutation PLP et l'accélération de la mort cellulaire, nous avons utilisé deux techniques différentes (test MTT et test au bleu de trypan) pour évaluer la viabilité/survie et la mort cellulaires des OL 158JP et 158N. Nos résultats montrent une augmentation du pourcentage de mort cellulaire (+30%) chez les OL 158JP comparés aux OL contrôles 158N. De plus, nous avons utilisé la technique de cytométrie en flux pour confirmer nos résultats et démontrer aussi que dans les cultures d'OL 158JP, les pourcentages des cellules apoptotiques précoces et des cellules apoptotiques

tardives/nécrotiques sont plus élevés (respectivement +7% et +19,5%) que dans les cultures d'OL témoins.

Pour identifier les mécanismes ou processus endogènes pouvant permettre d'expliquer la surmortalité observée dans les cultures d'OL 158JP, nous avons combiné les techniques de *reverse transcription* (RT), qPCR en temps réel et *Western-Blot*. Cette combinaison technique a permis d'évaluer et de comparer les niveaux intracellulaires des marqueurs protéiques de l'apoptose dans les cellules 158JP et 158N. Nos résultats montrent une élévation du ratio Bax/Bcl-2 dans les OL 158 JP, ce qui atteste que la mutation du gène PLP favorise une surexpression du facteur pro-apoptotique Bax, accompagnée d'une répression du facteur anti-apoptotique Bcl-2, dans les cellules 158JP.

Des données antérieures suggèrent que la production anormale de PLP peut entraîner son accumulation dans le réticulum endoplasmique (RE) et provoquer le stress du RE qui est suspecté comme étant un processus pouvant jouer un rôle clé dans la PMD et les pathologies impliquant des protéines mal repliées. L'accumulation de PLP dans le RE et des anomalies morphologiques du RE ont été mises en évidence dans des cellules souches pluripotentes dérivées de patients PMD. Néanmoins, le rôle direct joué par le stress du RE dans la genèse de la mort oligodendrocytaire induite par l'expression aberrante de PLP est encore mal connu. Grâce à la combinaison des méthodes de RT, qPCR et Western-Blot, nous avons évalué les niveaux endogènes des marqueurs du stress du RE dans les OL 158JP et 158N en condition normale/physiologique (absence de toxicité exogène). Nos résultats montrent que le niveau d'expression de la protéine BiP (marqueur du stress RE) est nettement plus élevé (+30%) dans les OL 158JP comparés aux OL contrôles 158N. De plus, en exposant les OL 158JP et 158N à un stress du RE induit par un agent exogène, notamment la tunicamycine (un inhibiteur de la N-glycosylation des protéines), nous avons constaté une diminution de la viabilité des deux

lignées cellulaires. Toutefois, l'IC50 de tunicamycine (concentration induisant 50% de mort cellulaire) est de 0,13µg/ml pour les OL 158N et de 0,002µg/ml pour les OL 158JP, ce qui démontre que les OL 158JP sont particulièrement fragilisés en présence de la tunicamycine. En effet, le stress du RE évoqué par la tunicamycine s'additionne au niveau endogène de stress du RE préalablement élevé chez les OL 158JP pour accélérer la mort oligodendrocytaire.

Le stress du RE provoque une réponse bi-phasique initiée par une phase adaptative permettant à la cellule d'éliminer ou de réguler les agrégats protéiques. Cependant, si le stress est trop intense, la cellule bascule vers l'activation de mécanismes pro-apoptotiques conduisant à la mort cellulaire, on parle alors de phénomène de mort apoptotique médié par le stress du RE. Nos résultats montrent qu'en absence de toxicité exogène (milieu de culture normal), les OL 158JP sur-expriment également la protéine CHOP qui est un marqueur cellulaire indiquant le basculement des processus endogènes ou intracellulaires vers des phénomènes apoptotiques. Ces données sont confirmées par des résultats additionnels que nous avons obtenus par cytométrie en flux et qui démontrent que les OL 158JP expriment des niveaux élevés de la caspase-12 qui est spécifique à l'apoptose induite par le stress du RE.

L'ensemble de nos résultats met en évidence une corrélation positive entre la mort cellulaire accélérée et les niveaux endogènes élevés de stress du RE et d'apoptose chez les OL 158JP qui sont porteurs d'une mutation du gène PLP. La mise en évidence d'une telle corrélation nous a alors incités à vérifier si des molécules ou agents pharmacologiques capables d'inhiber le stress du RE pourraient diminuer la mort oligodendrocytaire et améliorer la survie des cellules 158JP.

Le 4-Phenylbutyrate (4-PBA) est une molécule chaperonne modulatrice du stress du RE dont les effets bénéfiques sur la survie cellulaire ont été démontrés *in vitro* et *in vivo*. Nos résultats

montrent qu'un traitement avec le 4-PBA (500µM) pendant 48h améliore la survie des OL 158JP, diminue l'expression des marqueurs du stress du RE (BiP, CHOP) et de l'apoptose. En particulier, le traitement 4-PBA réduit le niveau d'expression du facteur pro-apoptotique Bax, augmente l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2, ce qui conduit à une baisse conséquente du ratio Bax/Bcl-2 dans les OL 158JP.

Outre le 4-PBA, nous avons également testé deux composés de la famille des neurostéroïdes, l'alloprégnanolone et l'œstradiol, qui sont connus pour leurs effets neuroprotecteurs, anti-apoptotiques et/ou modulateurs du stress du RE. De façon surprenante, les résultats montrent que l'alloprégnanolone et l'œstradiol n'exercent ni d'effets délétères ni d'actions bénéfiques sur la survie de OL 158JP. Etant donné que des travaux antérieurs suggèrent que des stéroïdes anti-progestatifs pourraient exercer un effet protecteur et réducteur de l'apoptose dans un modèle murin de PMD, nous avons testé la capacité de l'acétate d'ulipristal, un antagoniste du récepteur nucléaire de la progestérone, à prévenir la mort cellulaire induite par la mutation PLP dans les OL 158JP. L'acétate d'ulipristal n'exerce également aucun effet bénéfique ou délétère sur les OL 158JP. Ces résultats suscitent une interrogation concernant l'expression des récepteurs stéroïdiens capables de relayer les effets des neurostéroïdes dans les OL 158JP.

Une perspective de notre travail sera donc de vérifier l'existence ou les niveaux d'expression des récepteurs de neurostéroïdes, en particulier les récepteurs de l'alloprégnanolone, de la progestérone et de l'œstradiol, dans les OL 158JP pour comprendre les raisons de l'absence des effets de ces stéroïdes sur ces cellules.

Le 4-PBA s'étant révélé comme un composé prometteur capable d'améliorer la survie des OL 158JP en diminuant le stress du RE et l'apoptose, une autre perspective de notre travail sera d'étudier la capacité du 4-PBA à protéger *in vivo* contre la mort oligodendrocytaire dans le

SNC, à réduire la sévérité des symptômes neurologiques et améliorer la survie des souris jimpy dont la durée de vie dépasse rarement 30 jours.

A terme, nos travaux permettront de proposer des pistes prometteuses pour le développement de stratégies thérapeutiques efficaces contre la PMD et les pathologies dysmyélinisantes.

Abstract

Mutations of proteolipid-protein (PLP) cause oligodendrocyte (OL) death and myelin disorders. To contribute to the elucidation of the mechanisms involved, the present PhD work has used 158N (normal) and 158JP (mutated PLP) OL lines, to show the occurrence of a high cell death percentage in 158JP OL cultures compared to the controls. An increased Bax (pro-) /Bcl2 (anti-apoptosis) ratio is evidenced in 158JP cells. Also, the endoplasmic reticulum stress marker (SRE) BiP is overexpressed in 158JP OL. Exposure of 158N and 158JP cells to tunicamycin-induced SRE revealed that the ED_{50} for 158JP OL is 65 times lower than the ED_{50} for 158N OL. Proteins CHOP and caspase-12, that pivotally determine the switching from survival to apoptotic pathways, are upregulated in 158JP cells. 4-Phenylbutyrate, a SRE inhibitor, which improves 158JP cell survival, also decreases the levels of SRE and apoptosis markers in 158JP OL. The thesis opens promising perspectives for the development of effective strategies against myelin disorders.

1. Introduction

1.1 La myéline du SNC et ses pathologies

La myéline est une structure lipo-protéique formant une gaine protectrice autour des axones neuronaux. De par ses propriétés isolantes, la gaine de myéline permet de moduler la vitesse de conduction de l'influx nerveux et d'assurer la conduction saltatoire des potentiels d'action via les nœuds de Ranvier. Son rôle est essentiel au bon fonctionnement du système nerveux et sa destruction ou son altération aboutit chez l'homme à des affections très invalidantes. Les cellules de Schwann sont responsables de la formation de la myéline dans le système nerveux périphérique (SNP) et les oligodendrocytes (OL) dans le système nerveux central (SNC). Dans ce chapitre, nous nous focaliserons sur la myéline centrale formée par les OL.

1.1.1 Architecture de la gaine de myéline

La myéline est une structure multi-lamellaire formée par l'enroulement des membranes des prolongements oligodendrocytaires autour de l'axone (figure 1, A). La gaine de myéline n'est pas continue le long de l'axone mais est organisée de manière segmentaire, définissant plusieurs zones distinctes organisées autour du nœud de Ranvier comprenant : l'internœud qui est la zone myélinisée de l'axone, le juxtaparanœud, région intermédiaire faisant la jonction avec le paranœud qui représente la fin de la myéline compacte et le commencement du nœud de Ranvier (figure 1, B).

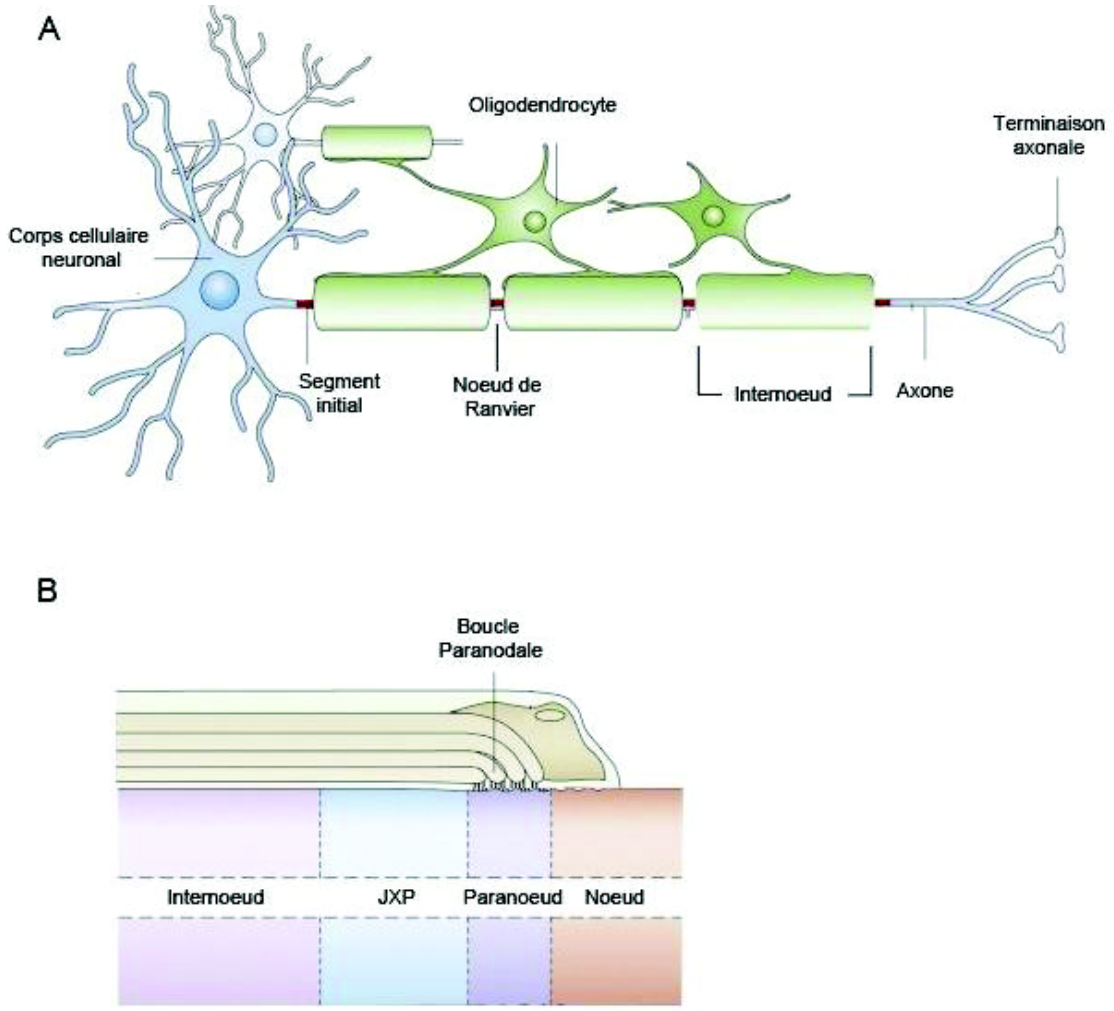

Figure 1 : Organisation de la gaine de myéline.

(A) La gaine de myéline est formée par l'enroulement de membranes issues des prolongements oligodendrocytaires autour de l'axone du système nerveux central. Les segments d'axones myélinisés (internoeuds) sont séparés par les nœuds de Ranvier, site de concentration des canaux NaV et d'initiation du potentiel d'action.

(B) Schéma de l'organisation de la gaine de myéline, les internœuds sont composés de myéline compactée et bordés de zones de myéline décompactée appelées juxtaparanœud (JXP) et paranœud. A cet endroit une zone de contact axone-glie spécialisée permet d'ancrer les boucles paranodales à l'axone afin d'isoler la partie myélinisée du nœud de Ranvier.

D'après Poliak et Peles (2003).

zones sont les parties spiralées multi-lamellaire formées par l'apposition des faces intra- et extracellulaire des OL. L'apposition des faces cytoplasmiques de la membrane oligodendrocytaire donne lieu aux lignes périodiques, également désignées par le terme de lignes denses majeures. A l'inverse, les lignes intra-périodiques sont formées par l'accolement des faces externes de la membrane, ce sont elles qui sont les plus denses aux électrons, rendant une couleur sombre et permettant ainsi de les reconnaître en microscopie électronique par transmission (figure 2).

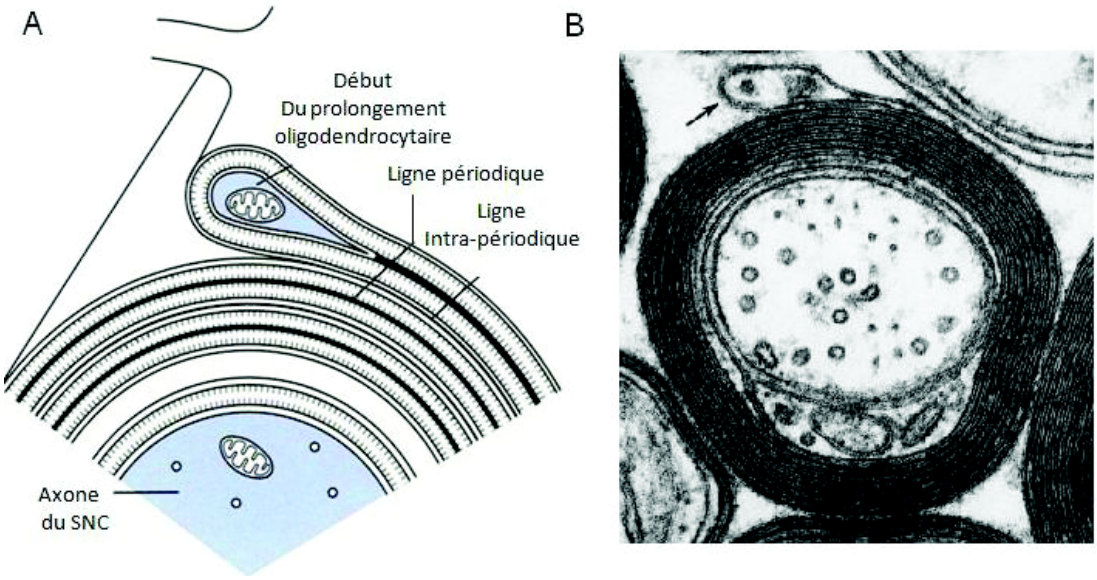

Figure 2 : Organisation des lignes périodiques et intra-périodiques

(A) Représentation schématique de la formation des lignes périodiques et intra-périodiques. (B) Micrographie d'une fibre myélinisée du SNC, la ligne périodique (sombre) peut être discernée des lignes intra-périodiques possédant une couleur plus claire.

Schéma d'après le cours d'histologie du Dr Serge Nataf, Université de Lyon/Hospices Civils de Lyon, 2008. Micrographie issue de Quarles et Richard (1999).

Structure de séparation entre l'internœud et le paranœud, le juxtaparanœud est le site où sont regroupés tous les canaux potassiques de type Kv1.1/1.2. Bien qu'enfouis sous la gaine de myéline, ces canaux permettent de réguler l'excitabilité neuronale (Thaxton et Bhat 2009).

Les segments de myélines compactes de l'internœud viennent se refermer et s'attacher à l'axone pour laisser place au nœud de Ranvier dans une zone appelée le paranœud. La région paranodale détermine la zone où les lamelles de myéline compacte s'ouvrent en plusieurs boucles cytoplasmiques qui rejoignent l'axone pour s'y ancrer. Ces boucles cytoplasmiques paranodales sont reliées à l'axone par des jonctions dites « septate-like » car elles ressemblent aux jonctions retrouvées entre les cellules épithéliales chez les invertébrés. La présence de ces jonctions permet d'établir une barrière empêchant la diffusion des petites molécules et des ions entre l'internœud et le nœud de Ranvier. Cette jonction axo-gliale est la plus large jonction intracellulaire connue, allant jusqu'à s'étendre sur une longueur de 1mm² dans les plus grosses fibres (Salzer 2003). Elles sont maintenues par l'interaction entre des molécules d'adhésion neuronale et gliales spécifiques : la protéine Caspr (contactin associated protein), une molécule d'adhésion présente au niveau du neurone et la protéine Neurofascin 155, une isoforme de la neurofascin exprimée de manière spécifique dans les OL (Tait et al. 2000).

1.1.2 Nœuds de Ranvier

La gaine de myéline recouvre l'axone à l'exception de petits espaces non myélinisés, où l'axone est laissé « libre ». Ces espaces sont nommés « nœuds de Ranvier » en référence au médecin français à l'origine de leur découverte, Louis-Antoine Ranvier. Les nœuds de Ranvier se répartissent le long de la gaine de myéline à des distances allant de 1 à 2 mm, et occupent un espace d'environ 1µm (Salzer 2003). Grâce à sa capacité isolante, la gaine de

myéline réduit la conductance de l'axone et permet ainsi d'augmenter la vitesse de conduction du potentiel d'action. Cependant, la présence des canaux ioniques à la membrane de l'axone est indispensable pour permettre à l'influx nerveux de se propager. C'est dans ces nœuds de Ranvier que sont concentrés les canaux permettant au potentiel d'action de se propager de nœud en nœud et donnant ainsi la dénomination de « conduction saltatoire ». Cette conduction saltatoire est alors bien plus rapide et économique en dépense énergétique que dans les fibres non myélinisées, où les canaux sont répartis tout le long de l'axone. Bien que les nœuds de Ranvier occupent un très petit espace, ils contiennent une grande quantité de canaux sodiques voltages dépendants (NaV), occupant une densité d'environ 1,500μm^2 (Waxman et Ritchie 1993). Il existe différentes isoformes des NaV et il a été démontré que celles-ci s'expriment de manière différentielle au cours du développement et notamment au cours de la myélinisation. Durant cette période, une transition s'effectue entre l'expression des canaux NaV1.2 dans les étapes précoces, remplacés par l'isoforme NaV1.6 au cours de la myélinisation active (Boiko et al. 2001). Au sein des nœuds sont aussi exprimés de nombreuses protéines d'adhésion telles que la neurofascine, ainsi que des protéines d'ancrage au cytosquelette comme la protéine ankrin G (Salzer 2003). Ces protéines sont capables d'interagir avec les canaux NaV ce qui leur permet de jouer un rôle important dans le regroupement des canaux sodiums au sein du nœud pendant la phase de myélinisation ainsi que de permettre la communication entre l'axone et le milieu extracellulaire.

1.1.3 Biochimie

La gaine de myéline est composée à 70% de lipides et 30% de protéines. Ce rapport est inversé comparativement à la membrane des autres types cellulaires et c'est cette composition particulière qui lui confère sa capacité isolante permettant d'accélérer la conduction du potentiel d'action à travers l'axone.

1.1.3.1 Lipides

Les lipides sont les constituants principaux de la gaine de myéline, cependant les lipides retrouvés au sein de cette structure sont similaires à ceux présents dans les autres membranes plasmiques.

1.1.3.1.1 Cholestérol

Le cholestérol est l'un des constituants majeurs des OL et plus généralement de toutes les membranes cellulaires chez les mammifères. Le cerveau est l'organe le plus riche en cholestérol et entre 70 et 80% de ce cholestérol est intégré au sein des gaines de myélines (Zhang et Liu 2015). Le cholestérol cérébral est synthétisé *de novo* à cause de la difficulté pour les stérols de passer la barrière hémato-encéphalique (Jeske et Dietschy 1980). Toutes les cellules du SNC participent activement à la synthèse de cholestérol. Les OL sont responsables d'un pic d'augmentation du cholestérol cérébral pendant la période active de myélinisation faisant passer les taux de 3.5mg/g chez le nouveau-né à 12mg/g trois semaines après la naissance (Dietschy et Turley 2004). En effet, une production importante de cholestérol au sein des OL est indispensable à la bonne formation de la gaine de myéline. Une étude sur une souris mutante ne synthétisant plus de cholestérol au sein des OL montre une myélinisation fortement perturbée se traduisant par un phénotype clinique notamment au niveau des fonctions motrices et du tonus musculaire (Saher et al. 2005). Le fait que la myélinisation ne soit pas totalement absente chez ces mutants prouve que les OL sont capables de recevoir des apports de cholestérol des cellules avoisinantes.

La synthèse du cholestérol se fait au sein du réticulum endoplasmique à travers une réaction complexe impliquant 37 étapes. Pendant les périodes de myélinisation active, une synthèse importante et quasi permanente des lipides composants la myéline est requise. Ainsi au niveau du réticulum endoplasmique, des protéines senseurs sont capables de surveiller les

taux intracellulaires de stérols afin de veiller à sa synthèse continue, par exemple la protéine SCAP (SREBP cleavage activating protein) est connue pour activer la protéine SREP (sterol responsive element binding protein) qui sort du réticulum pour activer des gènes capables de relancer la synthèse de cholestérol (Saher and Stumpf, 2015). La manière dont le cholestérol intègre ensuite la gaine de myéline n'est pas entièrement élucidée mais il est suspecté qu'une grande partie pourrait transiter jusqu'aux membranes via un transport vésiculaire empruntant les microtubules, putativement à l'aide du complexe protéique SNARE (Feldmann et al. 2009). Il est possible qu'il existe plusieurs voies parallèles permettant d'apporter le cholestérol jusqu'aux prolongements myélinisants au vu des quantités importantes requises. Le cholestérol intègre finalement la membrane cellulaire des prolongements myélinisants où il reste de manière pérenne, avec une demi-vie de l'ordre d'une année (Ando et al. 2003).

1.1.3.1.2 Phospholipides

Les phospholipides représentent environ 40% du total lipidique de la myéline (Baumann et Pham-Dinh 2001). Le plus représentatif des phospholipides exprimés dans la myéline est l'ethanolamine plasmalogène, un glycérophospholipide contenant un groupe acétyl ether. Comme pour le cholestérol et les cérébrosides, les niveaux de plasmalogènes dans le cerveau augmentent de manière drastique pendant la phase active de myélinisation (Nagan et Zoeller 2001). La demi-vie des plasmalogènes dans la myéline est comprise entre 10 à 30 jours comparativement à la demi-vie de ceux retrouvés dans la substance grise qui est comprise entre 10 à 30min. Ceci suggère que ces lipides possèdent un rôle structurel dans la gaine de myéline (Rosenberger et al. 2002). De plus, les plasmalogènes sont suspectés d'avoir un rôle protecteur face au stress oxydatif et empêcher la peroxydation des lipides (Lessig et Fuchs 2009).

1.1.3.1.3 Glycosphingolipides

Les galactosylcéramide (GalC) ainsi que leurs formes sulfatées aussi connues sous le nom de cérébroside sulfate font partie de la famille des glycosphingolipides qui sont des lipides ubiquitaires composant les feuillets externes des membranes plasmiques chez les vertébrés. Les GalC sont les lipides les plus typiques de la gaine de myéline, représentant 20% du poids sec lipidique dans la gaine myélinique mature (Baumann et Pham-Dinh 2001). L'augmentation de la concentration de ce lipide pendant le développement est positivement corrélé avec le degré de myélinisation, en faisant un indicateur fiable de la quantité de myéline présente dans le SN (Norton and Poduslo, 1973). Les GalC sont localisés massivement à la face externe des membranes (et donc dans les lignes intra-périodiques) et sont impliqués dans le maintien de la stabilité de la gaine de myéline en contribuant à l'adhésion des membranes entre elles (Ohler et al. 2001). Ces lipides sont exprimés de manière très précoce au cours du développement (Schaerenwiemers et al. 1995) et sont ainsi suspectés de participer à la formation de la gaine de myéline, de plus, l'inhibition de GalC à l'aide d'anticorps est capable de perturber la myélinisation *in vivo* (Rosenbluth et al. 1994). De manière intéressante, une altération dans les enzymes lysosomiales dégradant ces lipides donne lieu à des leucodystrophies (Baumann et Pham-Dinh 2001).

Parmi les autres glycosphingolipides exprimés dans la gaine de myéline se trouvent les gangliosides dont la famille contient plus de 100 formes différentes. Dans le cerveau les formes majoritairement exprimées (96% des gangliosides) sont les formes GM1, GD1a, GD1b et GT1b (Schnaar et al. 2014). Avec le développement de la myélinisation, la concentration et la complexité structurelle des gangliosides augmentent (Svennerholm et al. 1989). Les gangliosides sont suspectés d'être des ligands fonctionnels de la protéine MAG, une protéine de structure de la myéline. En effet les formes GD1a et GD1b comprennent une séquence NeuAcα3Gal β3GalNAc à laquelle la protéine MAG est capable de se lier *in vitro*

(Yang et al. 1996). Cette interaction entre MAG et les gangliosides serait important dans la médiation de l'interaction entre axone et OL comme le prouvent les déficits observés sur les souris ne produisant pas les galactosides GD1b et GT1b (Sheikh et al. 1999; Schnaar et al. 2014) .

1.1.3.2 Protéines de la myéline

Environ un tiers de la gaine de myéline est constituée par des protéines, celles-ci sont pour la plupart spécifique à cette structure pouvant ainsi servir de marqueurs. Parmi elles on peut distinguer les protéines ayant une activité enzymatique et des protéines de structure, n'ayant pas d'activité enzymatique connue et contribuant à la formation et au maintien de la gaine de myéline. Les avancées dans le domaine de la protéomique, notamment grâce à la technique de spectrométrie de masse, ont démontré que la quantité de protéines présentes au sein de la myéline a été largement sous-estimée (figure 3). On compte à ce jour 1280 protéines associées à la myéline du SNC, représentant de nouvelles pistes de recherches dans le domaine (Panfoli et al. 2014). Dans cette partie nous détaillerons les protéines les plus connues et les plus étudiées de la myéline.

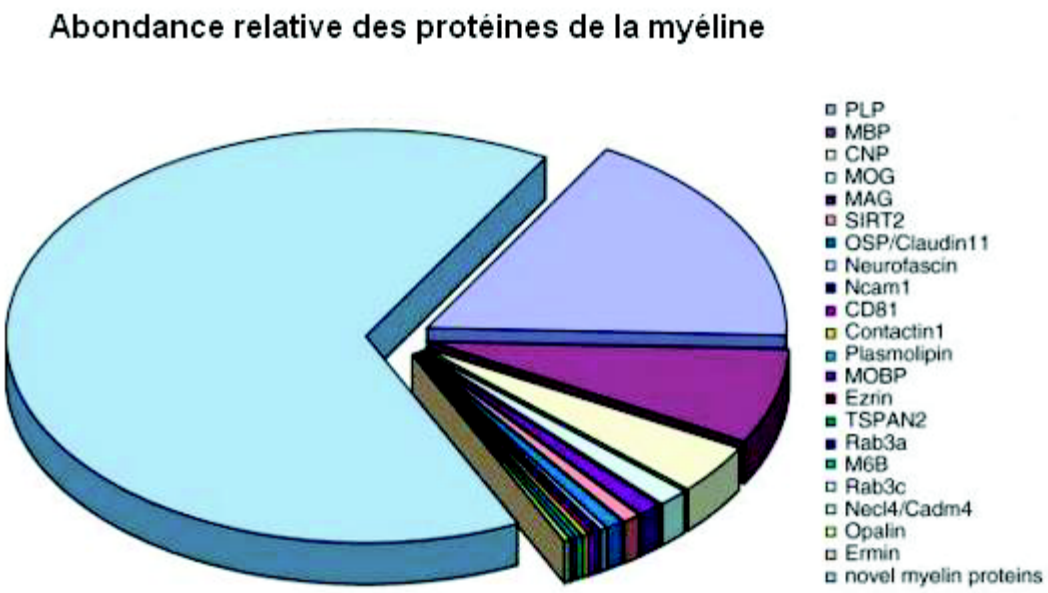

Figure 3 : Abondance relative des protéines de la myéline déterminée par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse. D'après Jahn et al. (2009).

1.1.3.2.1 Protéolipide-protéine (PLP)

En 1951, Folch et Lees identifièrent une protéine de la famille des lipoprotéines dans des échantillons de cerveau. Cette protéine présentait la spécificité de ne pas être soluble dans l'eau mais dans des solvants de type chloroforme-méthanol, leur conférant une similarité avec la famille des lipides. Ils donnèrent à cette nouvelle protéine le nom de « protéolipide-protéine » (PLP) (Folch et Lees 1951). La PLP est, avec la protéine basique de la myéline (MBP), une des protéines les plus abondantes de la myéline et représente 17% des protéines totales de la myéline (Jahn et al. 2009).

Le gène codant pour la protéine PLP est appelé plp1 chez la souris et PLP1 chez l'humain. Il est localisé sur le chromosome X en position Xq22 chez l'humain et comprend 7 exons arrangés sur 15kb de gène (Greer et Lees 2002). Ce gène est connu pour produire deux isoformes, la protéine PLP faisant 25kDa ainsi que la protéine DM20 de 20kDa produit par

épissage alternatif du gène dont l'accepteur est localisé sur l'exon 3. Les deux isoformes partagent la même séquence d'acides aminés à l'exception de 35 acides aminés encodés au sein de l'exon 3 qui sont absents dans DM20 (Nave et al. 1987). Deux autres isoformes, sr-PLP et sr-DM20, ont été découvertes plus tardivement et ont été nommées « *soma restricted* » (sr) car elles ne sont pas incorporées à la gaine de myéline, suggérant un rôle biologique différent, potentiellement lié avec le transport intracellulaire de par leur association aux vésicules (Bongarzone et al. 2001). La PLP possède une séquence en acide aminés très conservée, il existe une identité complète de séquence entre la souris et l'humain ainsi que 99% de similitude avec le chat et le chien et plus de 85% avec les oiseaux et les amphibiens. Du point de vue structurel, c'est une protéine transmembranaire comprenant 4 hélices α hydrophobes s'intégrant au sein des deux couches lipidiques de la membrane ainsi que 3 domaines cytoplasmiques et deux domaines extracellulaires (figure 4) (Greer et Lees 2002).

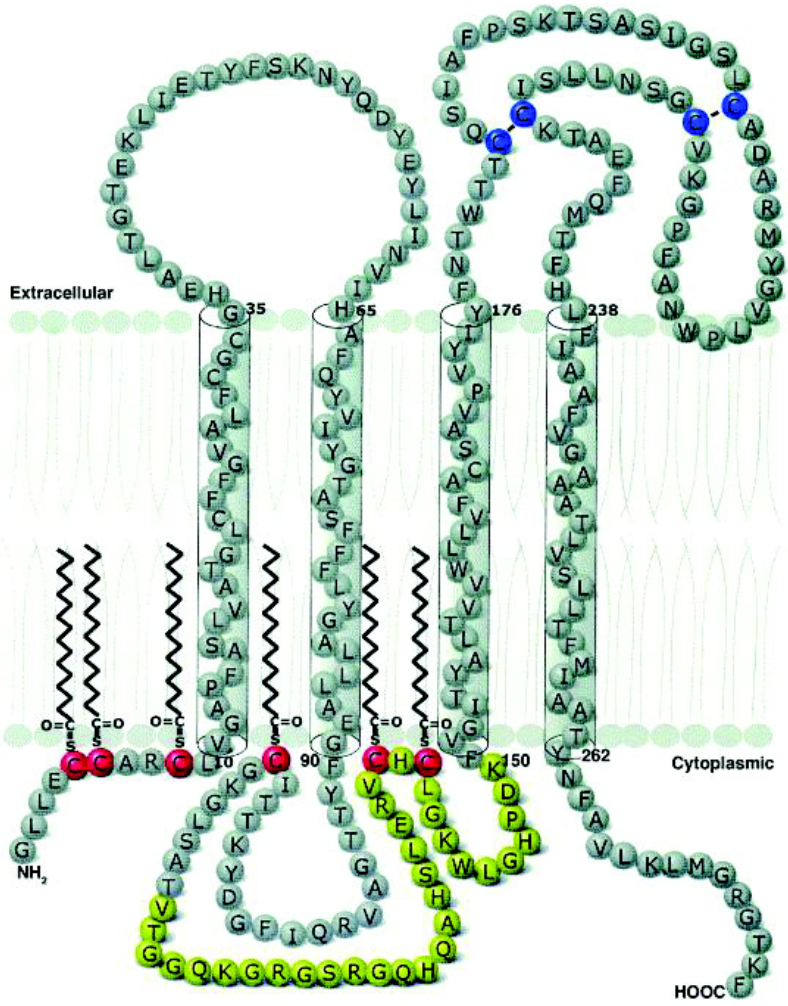

Figure 4 : Orientation de la PLP à la membrane de la myéline.

La PLP contient 4 domaines transmembranaires en hélice α, avec les terminaisons NH_2 et COOH terminales localisées à la face cytoplasmique de la membrane. La région en jaune (résidus 116-150) n'est pas exprimée dans l'isoforme DM20. Les régions en bleu représentent les cystéines impliquées dans la formation de pont disulfures. Les six cystéines pouvant être acétylées sont représentées en rouge. D'après Greer et Lees (2002).

De nombreuses études ont cherché à déterminer la cinétique de la transcription du gène PLP1 en ARNm et de sa traduction en protéine. Ces études montrent que la PLP commence à être exprimée pendant la période embryonnaire et que son expression augmente pendant les 3 premières semaines post-natales chez le rongeur, période coïncidant avec le développement de la myélinisation. La protéine PLP est exprimée de manière plus tardive que la protéine DM20 qui est prédominante au début du développement (Wight et Dobretsova 2004).

La PLP est localisée à la membrane au niveau des lignes périodiques et intra-périodiques (Baumann et Pham-Dinh 2001). Elle est ainsi considérée comme une protéine de structure de la myéline, jouant le rôle d'un « zip » entre les membranes de la myéline permettant sa compaction et le maintien de son intégrité (figure 5). Cette fonction est confortée par les analyses réalisées sur différentes souris mutantes conduisant à l'inhibition de l'expression de PLP : chez ces animaux la myéline se forme mais avec une instabilité marquée de la gaine se traduisant par une condensation des lignes intra-périodiques ainsi qu'une instabilité des enroulements des feuillets de la myéline (Boison et al. 1995; Klugmann et al. 1997; Wang et al. 2008). Ces mutants se caractérisent aussi par une dégénérescence axonale (Griffiths et al. 1998) suggérant un rôle pour la PLP dans le maintien de l'intégrité de l'axone et la communication axono-gliale. Cette hypothèse est notamment supportée par des travaux démontrant un effet neuroprotecteur de PLP pouvant être distingué de son rôle dans la structuration de la gaine de myéline (Yin et al. 2006).

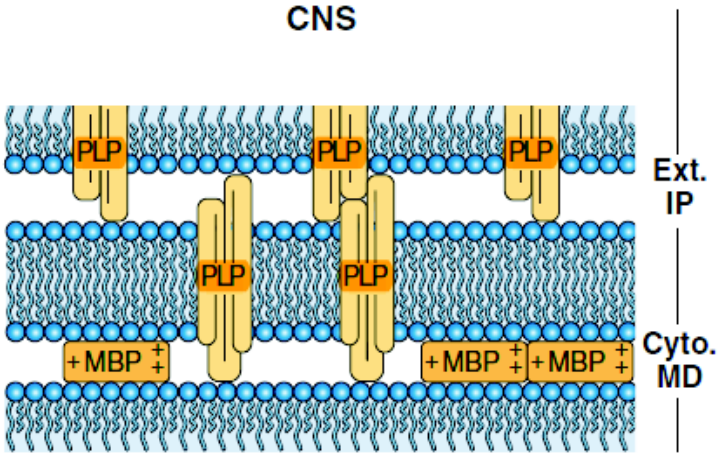

Figure 5 : Représentation schématique de l'organisation structurelle de la myéline compacte.

Les protéines PLP et MBP participent à la formation d'une jonction stabilisatrice entre les différents feuillets de la myéline permettant de maintenir la compaction de cette structure. D'après Quarles et Richard (1999).

Le gène PLP est exprimé de manière majoritaire dans les OL, suggérant un rôle important dans la myélinisation du SNC. Cependant, l'expression du gène PLP est détectée à faible concentration dans d'autres types cellulaires du SN comme les cellules de Schwann (Griffiths et al. 1989) mais aussi dans d'autres tissus comme dans les monocytes cardiaques (Campagnoni et al. 1992) ainsi que dans les cellules de Leydig dans les testicules (Li et al. 2002). Ceci suggère que la PLP pourrait avoir un rôle biologique différent dans d'autres tissus qui reste encore à élucider. De même, les isoformes sr-PLP/DM20 sont retrouvées exprimées au cours du développement fœtal de manière plus importantes dans les neurones que dans la glie, avec une expression majeure dans les motoneurones (Jacobs et al. 2004). Deux nouvelles isoformes de la PLP ont été découvertes donnant lieu à 4 transcrits différents qui, eux aussi,

ont une forte expression neuronale au cours du développement suggérant un autre rôle pour la protéine PLP que celui connu dans la myélinisation (Sarret et al. 2010).

1.1.3.2.2 Protéine basique de la myéline (MBP)

La protéine basique de la myéline ou *myelin basic protein* (MBP) est la deuxième protéine abondante de la myéline après la PLP. C'est aussi la protéine la plus conservée, retrouvée chez les vertébrés les plus primitifs. La composition en acides aminés de la MBP bovine et humaine fut reportée pour la première fois en 1971 par deux équipes indépendantes (Carnegie 1971; Eylar et al. 1971). Il existe en réalité plusieurs isoformes de la protéine produite par différents épissages de l'ARNm, formant ainsi une famille de protéines MBP. Par des analyses SDS-PAGE il a été mis en évidence des MBP de 21,5 ; 20,2 ; 18,5 ; 17,24 ; 17,22, et 14 kDa chez la souris et de 21,5 ; 20,2, 18,5, et 17,2 kDa chez l'humain (Boggs 2006). Les formes majoritairement exprimées sont celles de 18,5kD chez l'homme et 18,5kD et 14kD chez la souris. Ainsi de manière générale l'appellation « MBP » fait référence à la forme de 18,5kD. Ces isoformes sont produites par différents transcrits du gène MBP qui est localisé sur le chromosome 18 et contient 7 exons englobés dans un complexe plus large appelé « GOLLI » pour « gene expressed in the OL lineage ». Les gènes faisant partie du complexe GOLLI produisent des transcrits exprimés très tôt au cours du développement et de la mise en place de la gaine de myéline (Campagnoni et al. 1993).

L'expression des différents isoformes de MBP est dépendante du développement et ces protéines sont retrouvées à des endroits différents au sein de la cellule suggérant une variété de rôle isoformes dépendants Par exemple les isoformes contenant l'exon 2 (les protéines MBP de 17 et 21,5kDa) sont fortement exprimées à des stades précoces et déclinent au cours du développement alors que les formes ne contenant pas ce domaine sont exprimées plus tardivement (Baumann et Pham-Dinh 2001). En plus de cette variété d'isoformes, il

existe une variété de modifications post-transcriptionnelles pouvant modifier les protéines MBP. Les rôles physiologiques associés à cette grande diversité de la protéine MBP restent encore à être élucidés.

La MBP joue un rôle fondamental dans les processus de myélinisation comme le prouve le mutant shiverer. Ce mutant possède une délétion partielle du gène MBP empêchant sa synthèse protéique. Ces souris ont une durée de vie d'environ 90-150 jours et présentent différents symptômes tels que des tremblements et des crises épileptiques. L'analyse du SNC de ces animaux montre une gaine de myéline quasi inexistante, avec une absence totale de ligne dense majeure sur le peu de myéline formée (Privat et al. 1979). Ces informations, ainsi que la localisation de la protéine MBP à la surface interne des membranes, faisant la jonction entre deux lamelles de myéline formant les lignes périodiques (Harauz et Boggs 2013), confèrent à cette protéine le rôle de seule protéine connue comme étant indispensable pour assurer la bonne compaction de la myéline (figure 4). Il a été démontré que le phénotype de ce mutant ainsi que les défauts retrouvés dans la gaine de myéline sont bien dus à l'absence d'expression de la protéine car ceux-ci peuvent être corrigés par une expression exogène du gène MBP fonctionnel (Readhead et al. 1987).

L'étude de la protéine MBP à susciter un grand intérêt car elle pourrait représenter un autoantigène dans la maladie de la sclérose en plaque (SEP). En effet, des lymphocytes T spécifiques à la MBP sont retrouvés chez le sujet sain et les patients atteints de la maladie (Pette et al. 1990). Il semblerait de plus que l'expression des différents variants du gène MBP puisse être corrélée avec l'évolution de la maladie (Zhou et al. 2017). La protéine MBP est depuis longtemps utilisée comme autoantigène dans l'induction de modèle murin de SEP, notamment via les techniques d'induction passives et actives d'encéphalomyélite autoimune expérimentale (EAE) (McCarthy et al. 2012).

1.1.3.2.3 Glycoprotéine associée à la myéline (MAG)

La MAG est une protéine exprimée de façon très minoritaire au sein de la myéline qui n'a été découverte qu'après les protéines majeures PLP et MPB. Elle est exprimée à la fois dans les OL et les cellules de Schwann, ce qui suggère un rôle central comme périphérique. Le gène codant pour cette protéine est localisé sur le chromosome 7 chez la souris (19 chez l'humain), mesure 16kb et comprend 13 exons (Baumann et Pham-Dinh 2001).

La protéine MAG est exprimée en deux isoformes résultant d'un épissage alternatif, L-MAG (pour large MAG) et S-MAG (pour small MAG) régulés de manière différenciée durant le développement. La forme L-MAG est exprimée de manière plus importante durant la myélinisation du SN, alors que l'expression de la forme S-MAG augmente avec la maturation. Ainsi, à l'âge adulte, les courbes d'expression se rejoignent et les deux formes se retrouvent exprimées dans les mêmes proportions (Quarles 2007). La forme L-MAG est la forme ayant le plus d'importance au sein du SNC. L'inhibition sélective de son expression, et pas celle de S-MAG, donne lieu à des altérations de la myéline (Fujita et al. 1998).

La MAG appartient à la superfamille des immunoglobulines qui regroupent des glycoprotéines impliquées dans les processus de liaison, reconnaissance et d'adhésion des cellules. A l'inverse, des protéines comme la PLP et MBP qui sont présentes dans les zones compactes de la gaine de myéline, la protéine MAG ne se retrouve que dans les zones non compactées. Elle est exprimée de manière importante dans l'environnement cytoplasmique péri-axonale, en contact direct avec l'axone (Trapp et Quarles 1982). La protéine MAG n'est pas indispensable à la formation d'une gaine de myéline fonctionnelle, cependant son absence impacte la formation de l'espace péri-axonale où des anomalies morphologiques sont retrouvées. De plus, un retard de myélinisation ainsi qu'un recouvrement « accidentel » de certains axones déjà myélinisés ont été observés, suggérant que la protéine MAG pourrait

avoir un rôle dans la reconnaissance et la distinction des axones myélinisés et non myélinisés (Montag et al. 1994).

1.1.3.2.4 Myéline/oligodendrocyte protéine (MOG)

La protéine MOG fait partie de la famille des immunoglobulines, son gène est localisé sur le chromosome 6 (6p21.3-p22) chez l'humain et le chromosome 17 chez la souris (Phamdinh et al. 1993). Ce gène code pour une protéine de 26kDa une fois purifiée, pouvant former des dimères d'une masse moléculaire de 52 à 54kDa (Amiguet et al. 1992). MOG est une protéine transmembranaire exprimée de manière majoritaire à la surface de la gaine de myéline, et retrouvée que faiblement dans les enroulements de la gaine de myéline compacte (Brunner et al. 1989). Son expression est détectée de manière tardive, elle apparaît à la membrane des OL 1 à 2 jours après les deux protéines majeures de la myéline PLP et MBP (Scolding et al. 1989) et n'est retrouvée exprimée que sur les OL myélinisants, en faisant un marqueur des OL matures (Solly et al. 1996). La fonction physiologique de MOG reste encore à élucider, son positionnement à la surface externe de la gaine de myéline suggère qu'elle pourrait recevoir de l'information issue de l'espace extracellulaire, ou jouer le rôle de protéine d'adhésion avec d'autres cellules (Johns et Bernard 1999).

1.1.3.2.5 2′,3′-cyclic nucleotide 3′-phosphodiesterase (CNP)

La myéline a longtemps été considérée comme une structure inerte, cependant la découverte de protéines ayant une fonction enzymatique dans la gaine de myéline implique que celle-ci est une membrane métaboliquement active dans la synthèse et le renouvellement de ses constituants. La CNP est une de ces protéines de la myéline possédant une activité enzymatique. Elle est codée par le gène CNP1 localisé sur le chromosome 11 chez le rongeur et 17 chez l'humain et est exprimée en deux isoformes de 48kDa et 55kDa (Baumann et

Pham-Dinh 2001). La CNP qui représente 4% des protéines totales de la myéline, est une enzyme ancrée à la membrane et présente uniquement dans les régions non compactes de la myéline (Trapp et al. 1988). Bien que découverte depuis une cinquantaine d'années, sa fonction biologique reste aujourd'hui encore un mystère. Ses propriétés incluent une capacité d'interaction avec le cytosquelette d'actine, suggérant un rôle dans la croissance des prolongements oligodendrocytaires (Lee et al. 2005) ainsi qu'une capacité à moduler l'expression génique par liaison à l'ARN (Gravel et al. 2009).

1.1.4 Les oligodendrocytes

Les OL sont les cellules myélinisantes du SNC. Il existe également des OL périneuronaux satellites n'intervenant pas dans les processus de myélinisation en temps normal. Toutefois, ces OL périneuronaux sont potentiellement impliqués dans les processus de remyélinisation suite à des atteintes de la gaine de myéline (Szuchet et al. 2011). L'OL mature est capable d'étendre de nombreux prolongements venant s'enrouler autour des axones neuronaux afin de produire cette structure spiralée isolante qu'est la myéline. Les faisceaux axonaux myélinisés forment dans l'encéphale ce qu'on appelle la substance blanche (SB) par opposition à la substance grise (SG) composée des corps cellulaires des neurones. On retrouve les OL à fois dans la SB et la SG.

1.1.4.1 Développement

Dans le cortex des mammifères, les neurones et les cellules gliales proviennent des cellules souches neuroépithéliales présentes dans la zone ventriculaire, aussi appelée épithélium germinatif et formée par la couche cellulaire adjacente à la lumière du tube neural. Au cours du développement, les cellules souches neuroépithéliales sont les cellules les plus précoces donnant lieu aux neurones, à la glie radiaire, aux astrocytes et aux cellules

précurseurs d'OL. L'identification et l'étude spatio-temporelle des précurseurs oligodendrocytaires sont rendues difficiles par l'absence de marqueurs spécifiques. Ainsi, le stade de précurseur est défini par l'expression de marqueurs tels que la nestine ou la PSA-NCA qui sont exprimés dans d'autres types cellulaires, de manière concomitante avec l'absence d'expression du ganglioside GD3 (Baumann et Pham-Dinh 2001). Au cours du développement, ces précurseurs migrent vers la zone sous-ventriculaire, c'est à ce moment que la transition entre les cellules précurseurs et les cellules progénitrices d'OL (OPC) s'effectue (Lubetzki et al. 1997). Les OPC sont identifiés par leur morphologie bipolaire et grâce à l'expression des marqueurs GD3, de l'anticorps A2B5 qui reconnaît plusieurs types de gangliosides et du protéoglycan NG2 (Lubetzki et al. 1997; Baumann et Pham-Dinh 2001). Les OPC sont des cellules prolifératives et motiles qui peuplent le SNC, se différencient de manière progressive et deviennent des OL matures myélinisants (figure 6). Brièvement, les OPC commencent à peupler le SNC en développement en 3 vagues temporellement distinctes. Par exemple, chez les rongeurs, il a été démontré que la 1ère vague d'OPC dans la moelle épinière émerge du tube neural ventral au 12ème jour embryonnaire et s'installe sous le contrôle des facteurs de transcription sonic hedgehog (SHH), olig1 et olig2 (Orentas et al., 1999; Vallstedt et al., 2005). Au 15ème jour embryonnaire, une seconde vague d'OPC émerge de la partie dorsale du tube neural et la spécification de ces cellules indépendante du facteur SHH est régulée par les facteurs Dbx1 et Ascl1 (Cai et al., 2005; Fogarty et al., 2005; Vallstedt et al., 2005; Sugimori et al., 2008). Enfin, la troisième vague d'OPC apparaît à la naissance et semble inclure des progéniteurs locaux ainsi que ceux provenant de la zone subépendymaire du canal central (Rowitch et Kriegstein, 2010). La production des OPC dans l'encéphale s'effectue selon une cinétique similaire avec quelques nuances et variations au niveau des facteurs de transcriptions ou de leur isoformes qui contrôlent le processus (Tekki-Kessaris et al., 2001; Kessaris et al., 2006; Rowitch et Kriegstein, 2010; Chapman et al.,

2013). La différenciation de la lignée oligodendrocytaire est régulée par une multitude de facteurs intrinsèques et extrinsèques impliquant des facteurs de croissance, des protéines kinases, des molécules de la matrice extracellulaire ainsi que des régulations transcriptionnelles et traductionnelles (Bercury et Macklin 2015).

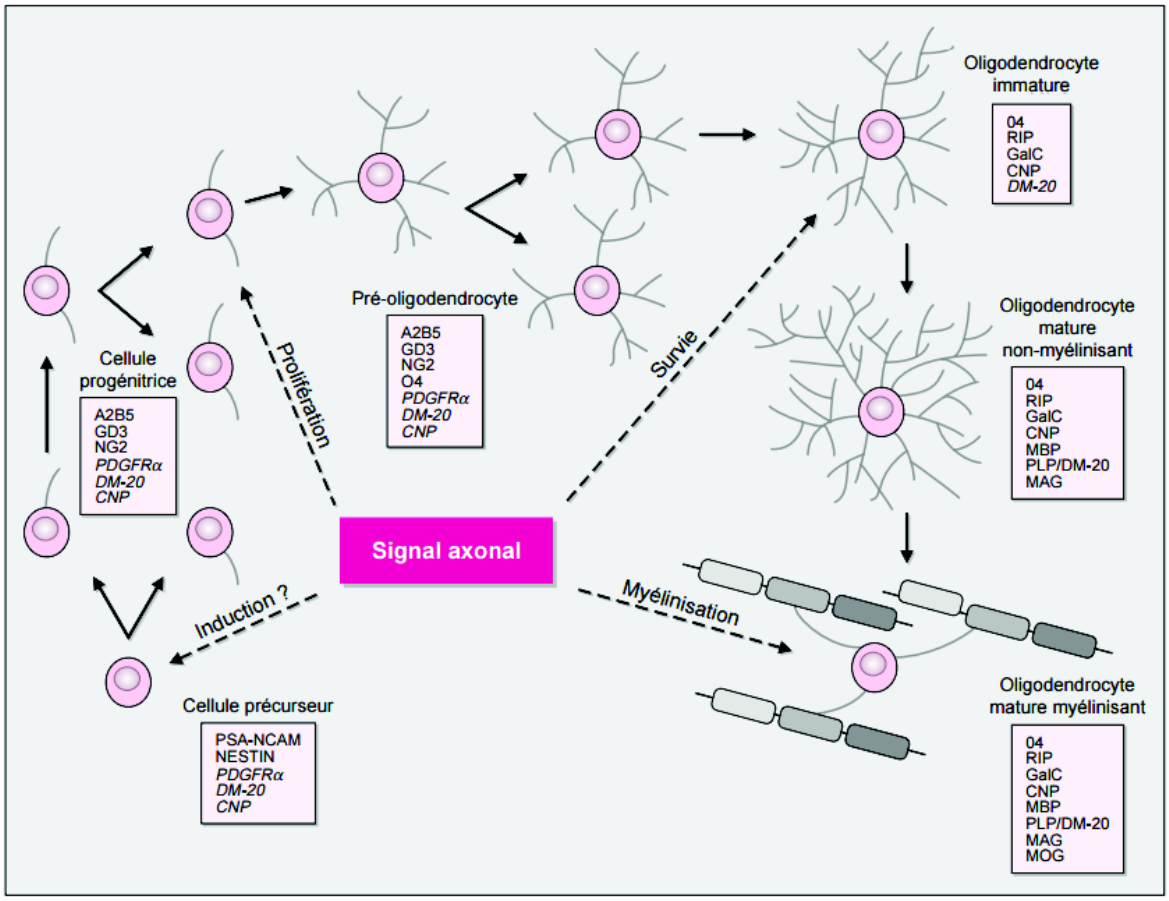

Figure 6 : Représentation schématique des différents stades du lignage oligodendrocytaire.

Les précurseurs deviennent des cellules progénitrices d'OL (OPC), cellules qui prolifèrent et donnent lieu au pré-OL puis à l'OL immature. Cette cellule post-mitotique mature jusqu'à devenir un OL myélinisant exprimant les protéines de la myéline telles que PLP, MBP, CNP, MAG et MOG. Chacune de ces cellules se caractérise par la présence de marqueurs plus ou moins spécifiques. D'après Lubetzki et al. (1997).

1.1.4.2 Migration

Les OPC parcourent un long chemin après leur genèse et traversent le tube neural pour aller peupler l'ensemble du SNC. La question est de savoir comment ces OPC trouvent leur chemin jusqu'à leur destination finale où ils acquièrent leur phénotype mature. La migration des OL est facilitée par l'action des facteurs de croissances tels que FGF-2 et PDGF-AA. Ce sont ces molécules qui activent la motilité des OL et leur permettent de parcourir de longues distances au sein du SNC (de Castro et al. 2013).

Pendant longtemps, on pensait que les OPC suivaient simplement des routes pré-établies par les axones du SNC, ce qui est corroboré par les expériences réalisées sur le nerf optique démontrant une invasion des OPC définie par la topographie axonale (Webb et al. 1995; Ono et al. 1997). Cependant, la réalité est plus complexe ; une expérience de section des axones du nerf optique chez le rat (le jour de naissance ou P0 avec une répartition des OL à peine débutante) a démontré que les OL continuaient à se répartir dans les mêmes zones spatiales que chez les rats contrôles, indiquant que ceux-ci sont capables d'être guidés par d'autres signaux que ceux pourvus par les axones (Ueda et al. 1999). Ainsi, les OPC migrent en utilisant différentes routes et en étant guidés par une multitude de facteurs impliquant les axones des cellules nerveuses avoisinantes ainsi que des molécules présentes dans leur environnement. Ces molécules sont des facteurs « motogèniques » c'est-à-dire qu'elles activent la motilité cellulaire (comme les facteurs de croissances) ou des molécules possédant des propriétés « attractive/répulsive » représentant ainsi des signaux permissifs ou restrictifs capables d'influencer la direction que vont emprunter les cellules. Il est assez difficile de discriminer expérimentalement la fonction motogènique de celle d'attraction/répulsion et certaines molécules peuvent jouer ces deux rôles à la fois. La guidance des OL via leur interaction avec les axones va dépendre de l'expression de molécules d'adhésion présente à la surface des cellules (PSA-NCAM, N-Cadhérine, Eph/éphrines) ainsi que des protéines de la

matrice extracellulaire (Laminine, fibronectine, mérosine, ténascine-C). Les facteurs secrétés impliqués dans la migration impliquent des facteurs de croissances ainsi que des facteurs chemotropiques tels que les nétrines ou les sémaphorines. L'ensemble de ces molécules peuvent avoir un effet positif ou négatif sur les capacités migratoires des OPC permettant le guidage vers les localisations cibles (de Castro et Bribian 2005).

Une fois arrivé à destination, un signal « stop » est nécessaire pour indiquer la localisation finale des OPC. La chémokine CXCL1 a été identifiée comme étant un signal « stop » potentiel de la moelle épinière via son action sur les récepteurs CXCR2 présents sur les OPC. Présente dans les astrocytes de la substance blanche à la période ou les OPC colonisent cette région, CXCL1 est capable d'empêcher la migration des OPC *in vitro*. La suppression de son récepteur CXCR2 provoque une concentration anormale des OL à la périphérie de la moelle épinière (Tsai et al. 2002).

1.1.4.3 Maturation et myélinisation

Les OL arrivés à destination vont acquérir leur phénotype mature et perdre leur capacité motile afin de commencer à myéliniser les axones environnants. L'OPC devient un pré-oligodendrocyte (pré-OL) puis un OL mature. Le pré-OL est caractérisé par une augmentation de son arborisation et son immunoréactivité à l'anticorps O4 (figure 5).

Les OL matures commencent à exprimer les différentes protéines spécifiques à la myéline telles que PLP, MBP, MAG, CNP et en dernier lieu la protéine MOG qui est le signe final de la maturation oligodendrocytaire. L'observation de leur ultra structure en microscopie électronique par transmission met en évidence un corps cellulaire relativement petit (entre 10 à 20µm) avec un cytoplasme sombre pourvu de nombreuses organelles. Leur noyau de forme ovoïde regroupe de nombreux clusters d'hétérochromatine. Bien qu'il n'existe pas

d'organelles qui seraient spécifiques aux OL, on peut dénoter la présence de corps lamellaire dense dans le cytoplasme des OL matures (Mori et Leblond 1970). Les OL ne forment cependant pas une masse homogène de cellules possédant toutes les mêmes caractéristiques. Plusieurs classifications ont été basées sur leur morphologie. Déjà lors de leur découverte, Pío del Río-Hortega décrivit 4 classes d'OL en fonction de leur taille, leur forme ainsi que des caractéristiques de leurs prolongements et des axones qu'ils myélinisent (Pérez-Cerdá et al. 2015). Mori et Leblond distinguèrent 3 sous types d'OL basés sur les variations de densité du cytoplasme (Mori et Leblond 1970). Ils différencient ainsi les OL clairs, qui sont les plus larges et constituent 6% de la population dans le corps calleux, les OL medium qui ont une taille plus petite possèdent un noyau plus dense et foncé ainsi que de nombreux prolongements, puis les OL « foncés » qui possèdent peu de prolongements et représentent 40% des cellules. En utilisant des critères morphologiques et biochimiques, Butt et al. distinguent 4 types d'OL en fonction de leur forme et de la façon dont ils myélinisent les axones, différenciant des petits OL pouvant myéliniser plusieurs petits axones, des grands OL ne myélinisants que quelques grands axones ainsi que deux types intermédiaires (Butt et al. 1995).

La formation de la gaine de myéline est un phénomène qui requiert (1) des OL matures caractérisés par de nombreux prolongements, (2) l'établissement d'un contact entre ces prolongements et les axones à myéliniser, (3) l'élaboration des membranes de myéline et l'enroulement de cette membrane autour de l'axone et (4) la compaction de cette membrane aboutissant à la gaine de myéline mature. La façon dont la myélinisation s'accomplit n'est pas encore bien comprise. Elle semble impliquer l'expression d'une multitude de signaux intrinsèques et extrinsèques capables de déclencher des re-modélisations du cytosquelette d'actine afin de procéder à la formation et l'extension des prolongements oligodendrocytaires permettant de venir contacter les axones à myéliniser (Bauer et al. 2009). Des re-

modélisations rapides du cytosquelette d'actine sembleraient de même être impliquées dans le processus d'enroulement de la gaine de myéline autour de l'axone, et pourraient être coordonnées par l'expression de la protéine MBP (Hughes et Appel 2016).

1.1.5 Les pathologies de la myéline

La mort des OL a pour conséquence une mauvaise formation et/ou une destruction de la gaine de myéline centrale. La perte des OL impacte de manière indirecte la communication neuronale en perturbant la conduction de l'influx nerveux pouvant avoir des conséquences plus ou moins graves en fonction de la sévérité de la perte oligodendrocytaire et de la région touchée. Parmi les pathologies portant atteinte à la myéline, on peut distinguer deux types impliquant deux mécanismes physiopathologiques différents : les maladies dites démyélinisantes et dysmyélinisantes/hypomyélinisantes. De manière additionnelle, de nombreuses pathologies neurodégénératives sont connues pour comporter des atteintes de la myéline pouvant participer au tableau clinique de ces maladies.

1.1.5.1 Pathologies démyélinisantes

Les pathologies dites démyélinisantes impliquent que la gaine de myéline est correctement formée lors du développement de l'individu mais est ensuite détruite par les conséquences de la maladie. Bien que des dommages axonaux soient souvent retrouvés dans ce type de pathologie suite à la destruction de la gaine de myéline, on ne classe dans les pathologies démyélinisantes que celles ou les dommages de la myéline sont la cause et non la conséquence de l'axonopathie. La gaine de myéline centrale est susceptible d'être détruite par de nombreux facteurs exogènes tels que des infections virales, les accidents vasculaires cérébraux, des carences nutritionnelles (comme une carence en vitamine B_{12}), certains poisons et médicaments tels que la chimiothérapie ainsi que l'abus d'alcool (Miller et al. 2005; Love

2006; Dietrich 2010; Vargas et al. 2014). La démyélinisation peut aussi être la conséquence de pathologies à l'étiologie pouvant être variable : maladies immunitaires, inflammatoires ou métaboliques (Love 2006).

La SEP est la pathologie démyélinisante la plus commune. Affectant les jeunes adultes, elle représente la première cause de handicap sévère non traumatique chez les trentenaires et donne lieu à des perturbations motrices, cognitives et sensitives. Son étiologie n'est pas connue mais semble être la résultante de l'interaction entre différents facteurs environnementaux et génétiques. La SEP est initiée par une réaction auto-immune dirigée contre les OL et la gaine de myéline, cette réaction est médiée par l'activation des lymphocytes T dans le système immunitaire périphérique. Ces cellules vont ensuite traverser la barrière hémato-encéphalique où elles seront à l'origine de l'activation de l'inflammation et de l'infiltration des macrophages produisant un environnement menant à la mort des OL et à la démyélinisation (Wu et Alvarez 2011). La SEP évolue généralement en différents plateaux ou l'inflammation décroît, laissant la place à des mécanismes de remyélinisation. Cependant, ces périodes de remyélinisations ne sont pas suffisantes pour réparer les dégâts occasionnés par la maladie (Podbielska et al. 2013).

Des maladies moins communes telles que la neuromyélite optique ou la sclérose concentrique de Balo sont aussi des pathologies dans laquelle l'activation du système immunitaire et l'inflammation vont engendrer une démyélinisation (Love 2006). La neuromyélite optique est caractérisée par une démyélinisation des nerfs optiques engendrant des épisodes aigus de cécité et de paraparésie ou tetraparésie, accompagnés de troubles sensoriels et sphinctériens (de Seze et al. 2016). La sclérose concentrique de Balo est considérée comme un variant de la SEP dans laquelle la lésion de démyélinisation est caractérisée par une disposition concentrique de bandes de myéline séparées par des bandes de démyélinisation (Hardy et Miller 2014).

1.1.5.2 Pathologies dysmyélinisantes/hypomyélinisantes

Les maladies dysmyélinisantes et hypomyélinisantes provoquent des anomalies dans la formation ou le maintien de la gaine de myéline au sein du système nerveux. Les processus pathologiques interférant avec le développement de la myéline donnent lieu à une hypomyélinisation du SNC qui est différentiable de la démyélinisation par son *pattern* en IRM. Le critère diagnostique de l'hypomyélinisation est une absence de changement dans le *pattern* IRM de myélinisation incomplète sur deux examens réalisés à 6 mois d'intervalle (Steenweg et al. 2010). Les leucodystrophies, terme qui regroupe un ensemble de maladies génétiques orphelines affectant la myéline, ont souvent été classifiées comme pathologies dysmyélinisantes de par leur origine « acquise » provoquant des perturbations de la substance blanche. Cependant, l'analyse par IRM a démontré que la plupart des leucodystrophies montrait un *pattern* démyélinisant plutôt qu'hypomyélinisant (Boespflug-Tanguy et al. 2008). Ainsi, en utilisant l'IRM comme critère de différenciation entre dysmyélinisation/hypomyélinisation et démyélinisation, la plus prototypique des leukodystophies dysmyélinisantes/hypomyélinisantes est la maladie de Pelizaeus-Merzbacher (PMD) dans laquelle des mutations affectant la synthèse de la protéine majoritaire de la myéline, la PLP, empêchent la formation correcte de la gaine de myéline. Cette pathologie fera l'objet du chapitre 2 de cette thèse. Ces 20 dernières années, d'autres pathologies présentant un *pattern* IRM hypomyélinisant ont été décrites incluant la maladie de Salla, le syndrome de Cockayne, le syndrome de Tay, l'hypomyélinisation avec atrophie des ganglions de la base et du cervelet et la pathologie Pelizaeus-Merbacher-like (Steenweg et al. 2010). Cette dernière présente les mêmes symptômes que ceux rencontrés dans la PMD ainsi qu'une hypomyélinisation diffuse du SNC engendrée par des mutations dans le gène GJA12 codant pour une connexine présente au niveau des gap jonctions, la connexine 47, qui est retrouvée exprimée de manière très importante dans les OL (Bugiani et al. 2006).

1.1.5.3 Pathologies avec atteintes de la gaine de myéline

Le rôle des cellules gliales et notamment des OL et de la myéline a souvent été sous-estimé dans le fonctionnement du système nerveux par rapport à l'importance accordée aux neurones. Cependant, de plus en plus d'études démontrent des atteintes touchant à la gaine de myéline dans les pathologies neurodégénératives et psychiatriques. Ces atteintes sont susceptibles de participer aux problèmes moteurs et cognitifs rencontrés et permettent d'établir de nouvelles pistes de recherches sur l'origine de ces pathologies ainsi que d'élaborer des nouvelles stratégies thérapeutiques.

1.1.5.3.1 Pathologies psychiatriques

La schizophrénie est une maladie psychiatrique affectant 1% de la population en se manifestant par un ensemble de symptômes très variables pouvant être regroupés en symptômes positifs et négatifs. Les symptômes positifs incluent hallucinations, désorganisation de la pensée et délires alors que les symptômes négatifs se traduisent par une apathie, une perte de volonté, anhédonie et aboulie. La mémoire, les émotions, le langage et l'attention sont aussi altérés chez les patients schizophrènes. L'origine de cette pathologie n'est pas connue mais les théories actuelles postulent qu'elle pourrait résulter d'un trouble de la connectivité neuronale (Harrison et Weinberger 2005). Ces troubles de connectivité peuvent résulter de différentes altérations (dysfonctions synaptiques, mauvaise intégration des circuits corticaux…). De nombreuses études combinant analyses post-mortem et études *in vivo* par IRM ont démontré des anomalies de la myéline chez les patients schizophrènes (Davis et al. 2003; Martins-de-Souza et al. 2009). L'hypothèse sous-jacente est que les anomalies de myélinisation pourraient engendrer ou contribuer à la mauvaise connectivité neuronale retrouvée chez les patients par l'altération de la transmission de l'influx nerveux et ainsi occuper une place importante dans la physiopathologie de la maladie.

Une autre pathologie psychiatrique dans laquelle des anomalies de la gaine de myéline sont suspectées de jouer un rôle est le trouble bipolaire. Le trouble bipolaire est un trouble de l'humeur caractérisé par l'alternance de phase dépressive et de phase d'euphorie appelée « état maniaque ». Une étude d'imagerie fonctionnelle a mis en évidence une altération bilatérale des faisceaux de substance blanche dans les zones cérébrales impliquées dans la régulation des émotions (amygdale, cortex cingulaire). De manière intéressante, ces anomalies de la myéline sont réduites chez les patients traités aux sels de lithium, utilisés pour soigner les phases maniaques de la pathologie (Benedetti et al. 2011).

1.1.6.3.2 Pathologies neurodégénératives

Le plus grand facteur de risque d'apparition des pathologies neurodégénératives est le vieillissement. Une diminution progressive de la substance blanche est retrouvée lors du vieillissement normal et une théorie émise par Bartzokis pose la myéline au centre du développement des pathologies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer (Bartzokis 2011). Sa théorie se base sur le fait que la myéline devient plus fragile au cours du vieillissement et que sa capacité de régénération face aux dommages environnementaux et génétiques diminue progressivement. La destruction de la gaine de myéline avec l'âge formerait ainsi un terreau favorable au développement des pathologies neurodégénératives via différents mécanismes (Bartzokis 2004). La diminution de la conduction nerveuse causée par la perte de myéline engendre une perturbation de la synchronisation neuronale pouvant porter atteinte aux fonctions cognitives (Fornari et al. 2012). De plus, la dégénérescence des OL induit une perte de production de facteurs neuroprotecteurs tels que les neurostéroïdes pouvant être délétère pour la survie des cellules nerveuses (Melcangi et al. 2008).

1.2 La maladie de Pelizaeus-Merzbacher

1.2.1 Introduction

La maladie de Pelizaeus-Merzbacher (PMD) est une pathologie dysmyélinisante d'origine génétique faisant partie de la famille des leucodystrophies. La PMD a été décrite la première fois en 1885 par un médecin allemand, Friedrich Pelizaeus, qui fit le tableau clinique d'une famille dont 5 individus masculins étaient touchés par un retard développemental moteur et cognitif incluant des mouvements oscillatoires involontaires des yeux (nystagmus), des tremblements, une quadriparésie spastique et une ataxie évoluant de manière progressive (Pelizaeus 1885). Friedrich Pelizaeus observa que la maladie était transmise exclusivement par la mère mais qu'elle n'affectait pas les individus féminins. En 1909, Ludwig Merbacher réexamina cette famille, qui comprenait alors 14 individus atteints (Merzbacher 1910). Une analyse post-mortem détaillée de l'encéphale d'un individu atteint lui a permis de mettre en évidence une perte massive de la myéline dans la substance blanche.

Dans les années 80, le gène PLP1 codant pour la PLP (protéine majoritaire de la myéline) est localisé sur le chromosome X et l'association génétique entre ce gène et la PMD est ainsi suggérée (Willard et Riordan 1985). Cette association fut confirmée par la suite avec l'identification de mutation chez des individus atteints de PMD (Hudson et al., 1989). L'existence de nombreux modèles animaux présentant spontanément des mutations dans le gène PLP1 et présentant des phénotypes cliniques sévères rappelant la pathologie humaine a fortement aidé à la caractérisation de la PLP et à l'établissement du lien entre les mutations génétiques et la pathologie humaine (Duncan et al. 2011) (Tableau 1).

Aujourd'hui, il est commun de regrouper les leucodystrophies dysmyélinisantes ayant pour origine des mutations dans le gène PLP1 sous le terme de « PLP-pathies ». Les PLP-

pathies englobent l'entièreté du spectre de la PMD ainsi qu'une entité décrite auparavant comme nosographiquement distincte, la paraplégie spastique de type 2 (SPG2), dont l'origine liée à des mutations sur le gène PLP1 fut découverte par la suite (Saugier-Veber et al. 1994; Cambi et al. 1996; Lee et al. 2004). La SPG2 est indissociable sur des critères objectifs de la forme la plus modérée de PMD nommée « syndrôme PLP1-null » (Hobson et Kamholz 1999). Ainsi, nous garderons le terme PMD au cours de cette thèse en y incluant la forme PLP1-null/SPG2.

Année	PMD	PLP1	Animaux avec mutations plp1
1885	Première description par Pelizaeus		
1910	Description et autopsie d'une famille atteinte par Merzbacher		
1951		(Folch et Lees 1951) Découverte de la protéolipide-protéine (PLP)	
1954			(Phillips 1954) souris jimpy
1957		(Folch et al. 1957) isolation de la PLP	
1964	(Zeman et al. 1964) hypothèse d'un déficit de PLP dans la PMD		
1970	Seitelberger: formes "classique," "néonatale," et "transitionnelle" de PMD		
1984			(Kerner et Carson 1984) déficits de production de PLP chez la souris jimpy
1985	(Willard et Riordan 1985) gene PLP1 localisé sur le chromosome X		
1986		(Morello et al. 1986) PLP et DM-20 sont des transcrits du même gène	
1987	(Koeppen et al. 1987) déficits en PLP dans la PMD		
1989	(Hudson et al. 1989) mutation ponctuelle dans le		

	gène PLP1 chez un patient PMD		
1990			(Griffiths et al. 1990) défaut de production de PLP chez la souris rumpshaker (*rsh*)
1991	(Raskind et al. 1991) suppression complète du gène PLP1 chez une famille PMD		
1994	(Saugier-Veber et al. 1994) La SPG2 est allélique à la PMD		

Tableau 1 : Historique de la découverte des liens entre la PMD, la découverte de la PLP et la localisation de son gène PLP1 sur le chromosome X.

Adapté de Koeppen (2005).

1.2.2 Incidence et prévalence dans la population

La PMD est une pathologie rare pour laquelle il n'existe que très peu de données sur sa prévalence (nombre de cas existant dans la population) et son incidence (proportion de nouveaux cas). Une étude menée en 1996 en Allemagne a estimé l'incidence des formes majeures de leucodystrophies dans la population à 2.0/100,000 naissances et la PMD identifiée par test génétique à 0.26/100,000 naissances (Heim et al. 1997). Cependant, ce chiffre devrait être revu à la hausse sachant qu'à cette époque les tests génétiques ne permettaient pas d'identifier la forme majoritaire de PMD liée à une duplication de gène (voir chapitre 1.2.4). Deux études plus récentes réalisées aux Etats-Unis et au Japon reportent une incidence respective de 1.9/100,000 et 1.45/100,000 naissances (Bonkowsky

et al. 2010; Numata et al. 2014). Au sein de cette dernière étude, la prévalence des cas est estimée à 0.78/100,000.

1.2.3 Formes cliniques et symptomatologie

La PMD est une maladie à large spectre clinique. La classification établie par Seitelberger en associant symptômes cliniques et caractéristiques neuropathologiques délimitait deux formes de la pathologie : la forme néonatale caractérisée par l'absence totale de myéline et la forme classique dans laquelle la substance blanche forme des lésions de type « tigroïde » (Seitelberger 1995; Hobson et Garbern 2012). Les différents types de PMD sont actuellement vus comme un spectre hétérogène allant de la forme la plus sévère (forme néonatale) à une forme plus transitoire (forme classique) jusqu'à la forme la plus modérée (syndrome PLP1-null/SPG2). Au vu de l'hétérogénéité rencontrée dans le spectre de la PMD, une classification alternative a été proposée, se superposant à la nosographie classique (Cailloux et al., 2000). Elle s'établit en fonction du niveau moteur développé par les patients : aucune acquisition motrice (forme 0), tenue de la tête (forme 1), tenue en position assise (forme 2), tenue debout/marche avec assistance (forme 3), marche autonome (forme 4). Les signes neurologiques rencontrés reflètent directement le retard de myélinisation au niveau du SNC et sont notamment un nystagmus reflétant l'hypomyélinisation des nerfs occulomoteurs, une ataxie et une hypotonie pouvant évoluer en spasticité, des crises d'épilepsie et un retard cognitif. Ces différents symptômes apparaissent de manière plus ou moins précoce avec une différence de sévérité selon la forme rencontrée.

La forme néonatale (formes 0-1) est la forme la plus rare et la plus sévère. Elle apparaît directement à la naissance ou pendant les premières semaines de vie et progresse de manière très rapide jusqu'à la mort du patient. Cette forme implique des troubles neurologiques très sévères ainsi qu'une démyélinisation totale (Spalice et al., 2000).

Les symptômes rencontrés incluent un nystagmus pendulaire irrégulier avec une composante elliptique battant vers le haut présent dès la naissance, un stridor (bruit aigu et anormal émis lors de la respiration) ainsi qu'une hypotonie qui évoluent en une spasticité sévère pendant l'enfance. La présence de crise épileptique peut être dénotée. Les enfants atteints ne sont pas capables d'accéder à la marche et le langage ne se développe pas, même s'il est possible d'établir une communication non verbale. Il est souvent requis de nourrir les patients à l'aide d'une sonde d'alimentation. Leur espérance de vie ne dépasse généralement pas la période de l'adolescence.

La forme classique de la PMD (formes 2-3) est celle ayant été découverte originellement par Pelizaeus et Merzbacher. C'est la forme la plus commune et implique le plus souvent des duplications du gène PLP1. Cette forme débute dans les 5 premières années de la vie. Un nystagmus apparait au cours des deux premiers mois et disparait par la suite entre 2 et 5 ans. Par la suite, apparaissent une hypotonie, des titubations de la tête ainsi qu'une ataxie. Les patients sont capables d'atteindre certains jalons développementaux tels que la capacité à s'asseoir, à se tenir debout et peuvent apprendre à marcher avec assistance. Cependant, si des améliorations motrices sont observées jusqu'à environ 10-12 ans, un plateau est vite atteint et une détérioration est observée vers 10-15ans. Les patients sont capables d'apprendre à parler mais avec des troubles dans l'articulation de la parole (dysarthrie). Les crises d'épilepsies peuvent être présentes mais restent assez rares. L'espérance de vie moyenne se situe vers 40 ans mais avec une variabilité assez prononcée (±11 ans) (Nave et Boespflug-Tanguy 1996).

La forme la plus modérée de PMD (forme 4) est désignée par le terme « syndrome PLP1-null ». Comme indiqué dans l'introduction de ce chapitre, cette forme n'est pas clairement dissociable sur des critères objectifs de la SPG2. Dans cette forme, les déficits apparaissent au cours des 5 premières années de la vie et impliquent un retard

développemental pouvant s'accompagner d'une neuropathie périphérique. Une quadriparésie spastique modérée peut être présente. Le nystagmus retrouvé dans les deux autres formes n'est pas systématiquement présent ici. Les patients sont généralement capables d'apprendre à marcher de manière autonome et le langage se développe normalement.

1.2.4 Génétique

Le gène PLP1 est localisé sur le chromosome X mais la maladie affecte essentiellement les individus masculins. En effet, les hommes héritant du chromosome X porteur de la mutation PLP1 sont directement affectés par la maladie. Alors que les femmes sont majoritairement des porteuses saines. Chez elles, la présence d'un deuxième chromosome X sain est suspectée compenser les déficits de production de PLP induit par la mutation. Au vu de la sévérité de la maladie, les hommes atteints ne peuvent généralement pas avoir d'enfants, c'est pourquoi la maladie est habituellement transmise par les femmes porteuses de la mutation. Ainsi, des mutations *de novo* peuvent apparaitre à tout moment et passer à travers des générations d'individus de type féminin jusqu'au moment où apparait le premier cas. Les femmes porteuses ont ainsi 1 risque sur 2 de transmettre le gène à leurs fils et à leurs filles. Ce risque est identique pour chaque grossesse. Les fils héritant du gène seront affectés tandis que les filles seront porteuses saines dans la majorité des cas.

La PMD a longtemps été considérée comme une maladie à transmission récessive liée au chromosome X. Cependant, une rare proportion de cas de PMD chez des individus féminins a été recensée (Hodes et al. 1997; Vaurs-Barriere et al. 2003; Hurst et al. 2006). De manière générale, la pathologie est moins sévère chez les femmes que chez les hommes, avec une apparition progressive des symptômes vers l'adolescence ou le début de l'âge adulte. Cependant, chez certaines femmes on retrouve une pathologie très précoce marquée par une paralysie spastique exprimée durant l'enfance (Hodes et al. 1995; Inoue et al. 2001) suggérant

une forme dominante d'expressivité variable chez les femmes hétérozygotes. Les mécanismes moléculaires de cette variabilité n'ont pas encore été élucidés à ce jour. L'hypothèse la plus probable est que cette hétérogénéité serait sous-tendue par les phénomènes d'inactivation du X, processus épigénétique permettant d'équilibrer les dosages des gènes liés au chromosome X chez les individus féminins.

Il existe une grande variété de mutations causant la PMD. Ces mutations impliquent des duplications, des mutations ponctuelles ainsi que des délétions entières ou partielles du gène PLP1 (figure 7).

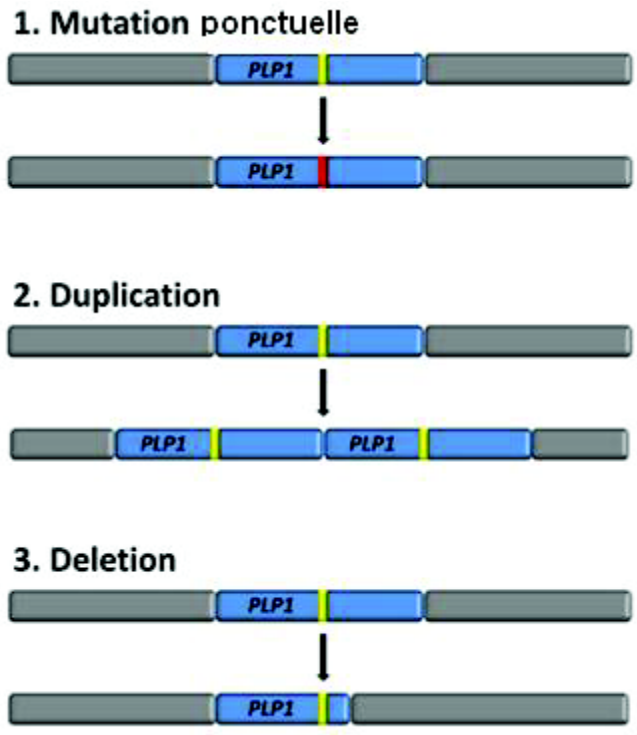

Figure 7 : Illustration schématique des 3 mécanismes de mutations impliqués dans la PMD.

D'après Xia et Wang (2013).

Les duplications sont les mutations les plus fréquentes représentant entre 60 et 70% des cas de PMD (Inoue et al., 1999; Mimault et al., 1999; Sistermans et al., 1998). Ces duplications sont de taille variable, pouvant aller de moins de 100kb à 9 Mb ou plus (Hobson et Garbern 2012). Les duplications du gène PLP1 créent des copies supplémentaires donnant lieux à une augmentation de l'expression de la protéine PLP/DM20. A priori, il n'existe pas de relation entre le nombre de copies supplémentaires de PLP1 et la sévérité de la pathologie Dans la majorité des pathologies impliquant des duplications de gène, celles-ci sont causées par des mécanismes de recombinaison telle que la recombinaison allélique non homologue (NAHR) ou la jonction des extrémités non homologues (NHEJ). Cependant, dans le cas de la PMD, il a été démontré que certains des réarrangements chromosomiques permettant la création de copies supplémentaires du gène PLP1 sont dus à un mécanisme particulier et non conventionnel appelé FoSTEs (*Fo*rk *S*talling and *Te*mplate *S*witching) (Lee et al., 2007). De manière rare, des triplications et quintuplations de gène peuvent aussi être retrouvées (Beck et al. 2015).

Les mutations ponctuelles représentent environ 20% des cas de PMD (Inoue, 2005). Elles peuvent être faux-sens, résultant en la substitution d'acides aminés ou non-sens donnant lieu à une protéine tronquée. Quand ces mutations sont situées dans les régions codantes, elles sont capables d'affecter la conformation protéique de PLP. Des mutations ponctuelles au niveau des introns ont aussi été mises en évidences (Taube et al. 2014).

Le dernier type de mutation impliqué est la délétion partielle ou entière du gène PLP1. Ce type de mutation représente de manière surprenante la cause la plus rare de PMD, en 2005 seulement trois familles avaient été identifiées dans la littérature (Raskind et al. 1991; Inoue et al. 2002). De plus, les régions supprimées par les délétions sont de taille beaucoup plus petites que celles qui sont retrouvées dans les duplications. Une hypothèse serait que les délétions

sont très rares et impliquent de petites portions du gène car des délétions plus importantes seraient létales ou pourraient jouer sur l'infertilité.

Il est important de noter qu'il existe au sein de cette pathologie un lien génotype-phénotype (figure 8). Les délétions de gène ainsi que les mutations ponctuelles empêchant la synthèse de PLP ont été reconnues comme étant directement responsables des formes les plus modérées de PMD (Cailloux et al. 2000). Même si la corrélation est moins parfaite, les formes les plus sévères de PMD sont, dans la grande majorité des cas, causées par des mutations ponctuelles de type faux-sens. Il a été démontré que les mutations faux-sens touchant la région N-terminale causent le phénotype le plus sévère, alors que celles affectant le second domaine intracellulaire peuvent induire tout type de forme de PMD. Ainsi la sévérité associée avec une mutation ponctuelle particulière est définie par son impact final sur la conformation de la protéine (Garbern 2007). Les duplications de gène sont majoritairement responsables de la forme classique (Cailloux et al. 2000). Cette corrélation suggère que la surexpression ou la mauvaise expression de la PLP est plus délétère que son absence totale, démontrant que le mécanisme régulant la sévérité de la pathologie est dû à un gain de toxicité plutôt qu'à la perte de la protéine fonctionnelle. De même, dans la famille des mutations ponctuelles, les mutations affectant la bonne conformation de PLP donnent lieu à un phénotype clinique sévère alors que les mutations non-sens causent une pathologie modérée. En effet, les mutations non-sens vont être dégradées par un mécanisme de surveillance de l'ARNm qui veille à éliminer les ARNm possédant des codons stop prématurés (Inoue 2005). Chaque type de mutation est ainsi susceptible d'induire des mécanismes physiopathologiques propres sous-tendant la sévérité de la dysmyélinisation et les symptômes associés.

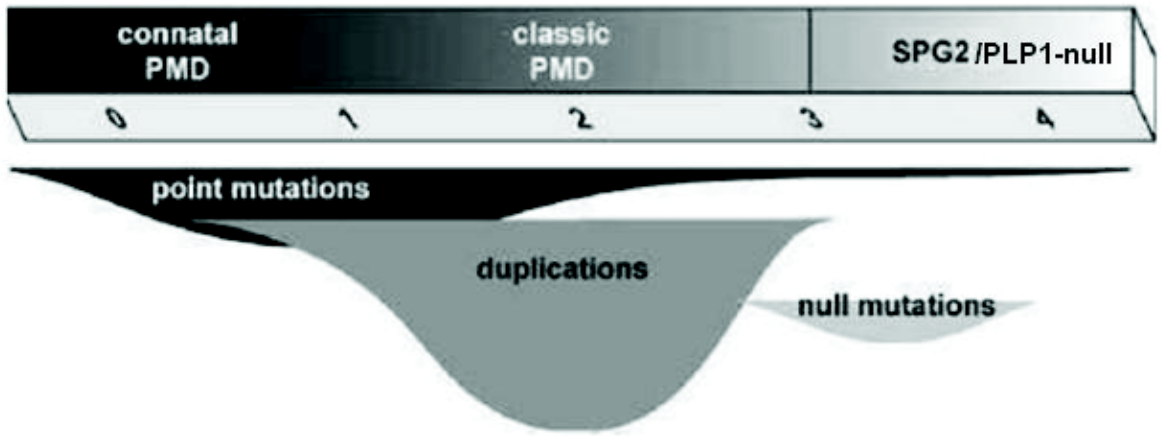

Figure 8 : Illustration des relations entre phénotype et génotype dans la PMD.

Le rectangle en haut représente les classifications des formes cliniques de la PMD historiquement utilisées. En bas du rectangle est présentée la classification numéraire proposée par Cailloux et al. (2000). Cette classification, qui est plus hétérogène, se base sur la sévérité des symptômes moteurs allant de 0 (très sévère) à 4 (légers). En dessous de la classification numéraire est représentée la distribution gaussienne des mutations associées au phénotype clinique. Il est important de noter que chaque type de mutation peut causer plusieurs phénotypes, ainsi il n'est pas possible de prédire à partir des manifestations cliniques, la mutation qui est impliquée. D'après Inoue (2005).

1.2.5 Diagnostique et traitement

Le diagnostic de la PMD/SPG2 repose sur l'examen des signes cliniques et se base sur l'analyse des troubles neurologiques typiques de la maladie, la présence d'anomalie de la myéline en imagerie par résonnance magnétique et sur un test génétique permettant de mettre en évidence la présence de mutations sur le gène PLP1. Le diagnostic différentiel inclut la

maladie de Krabbe, de Canavan, la leucodystrophie métachromatique, la maladie d'Alexander, la paraplégie spastique familiale, la maladie Pelizaeus-Merzbacher-like et l'infirmité motrice cérébrale (Hobson et Kamholz 1999).

L'imagerie par résonnance magnétique (IRM) est un outil diagnostique très utile pour la PMD car elle permet de visualiser les défauts de myélinisation de manière non invasive. Dans le cerveau sain en développement, la myélinisation peut être observée en IRM par un changement de l'hypo-signal T1 en hyper-signal et la formation complète de la gaine de myéline est identifiée par un changement de l'hyper-signal T2 en hypo-signal (Barkovich et al. 1988; Sie et al. 1997). Le cerveau des patients atteints de PMD montrent une hyper-intensité T2 (figure 9) comparable à celle retrouvée chez les nouveau-nés. L'hyper-signal T2 est présent de manière caractéristique dans toute la substance blanche permettant de la distinguer d'autres pathologies où les anomalies se retrouvent généralement localisées de manière spécifique. Le signal obtenu en T1 reste généralement normal et n'est donc pas intéressant pour le diagnostique. L'hyper-signal T2 dans l'encéphale corrèle de manière partielle avec le degré d'hypomyélinisation permettant de distinguer les formes plus modérées (PLP-null/SPG2) des formes classiques. Cependant, la différence entre les formes classiques et néonatales sont minimes au sein de la substance blanche ne permettant pas de les différencier (Inoue 2005). Une étude indique toutefois que ces deux formes pourraient être identifiées par les degrés de dysmyélinisation détectés dans le tronc cérébral (Takanashi et al. 1999).

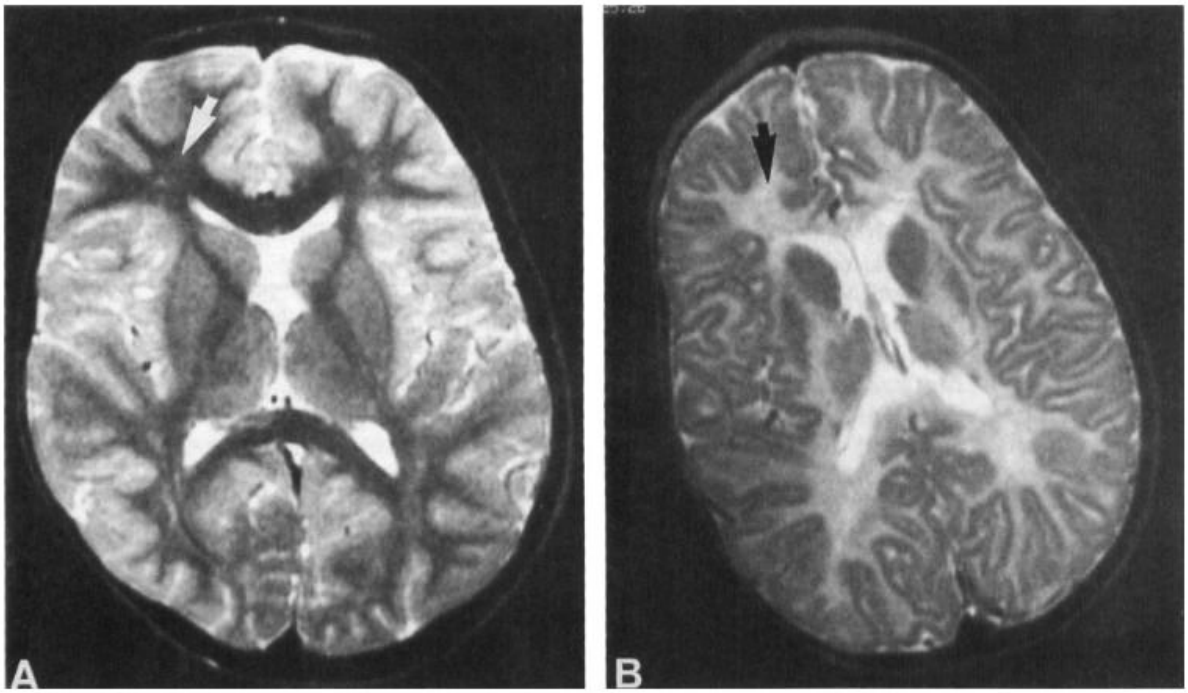

Figure 9: Images pondérées en T2 d'un sujet sain âgé de 3ans (A) et d'un patient du même âge atteint de PMD (B).

Les zones de la substance blanche hypo myélinisée présentent un hyper- signal diffus (flèche noire) comparativement à l'hypo-signal obtenu chez l'enfant sain chez qui la myélinisation est complète (flèche blanche).

D'après Nave et Boespflug-Tanguy (1996).

Il existe une grande difficulté à différencier les pathologies hypomyélinisantes, ainsi seul un test génétique permettant de mettre en évidence une mutation sur le gène PLP1 permet de poser le diagnostic précis de PMD. Les duplications étant les formes les plus répandues, une grande variété de technique est disponible afin de les identifier. Ces techniques permettent aussi de détecter les délétions. Les plus communément utilisées sont la PCR et l'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) permettant de mettre en évidence des

changements dans le nombre de copies du gène (Xia et Wang 2013). Cependant, ces méthodes n'aident pas à déterminer si les répétitions sont en tandem ou insérées ailleurs dans le génome. Si aucune duplication ou délétion n'est trouvée par ces méthodes, un séquençage est requis pour la détection des mutations ponctuelles. L'utilisation de ces techniques peut permettre de procéder à un diagnostique pré-implantatoire chez les couples à risques afin de procéder à une fécondation *in vitro* des embryons non porteurs de la mutation (Verlinsky et al. 2006).

Un défaut dans la réponse auditive évoquée du tronc cérébral (A*uditory Brainstem Response*, ABR) a été retrouvé dans les leucodystrophies congénitales dont fait partie la PMD. Du fait que l'ABR est une réponse facilement mesurable chez les nourrissons et les enfants en bas âge, les auteurs proposent qu'une association entre ABR et détection de signe clinique précoce tel que le nystagmus pourrait être un outil de diagnostique précoce de ce type de pathologie avant que ne puissent s'effectuer les analyses IRM (Numata et al. 2014).

Une autre étude a mis en évidence une atrophie cérébrale évoluant de manière plus rapide que la démyélinisation observée par hyper-signal T2 chez des patients PMD pouvant représenter un nouveau biomarqueur pertinent pour suivre l'évolution de la pathologie (Sarret et al. 2016).

Bien que les études ne s'accordent pas de manière claire, il semblerait que des variations dans des métabolites tels que la N-acetylaspartate et la choline aient été observées dans la PMD grâce à la technique de résonnance magnétique du proton (Spalice et al. 2000; Pizzini et al. 2003; Takanashi 2015). Un changement dans l'expression de ces marqueurs est interprété comme le signe d'altérations axonales (Bjartmar et al. 2002) suggérant que l'utilisation de cette technique pourrait permettre de suivre l'évolution de la neurodégénérescence présente dans la PMD.

A ce jour, il n'existe pas de traitement efficace pour la PMD. La prise en charge des patients fait appel à une équipe multidisciplinaire, impliquant neurologues, kinésithérapeutes, orthopédistes, pneumologues et gastro-entérologues. Une gastrostomie peut être nécessaire pour les patients présentant des problèmes d'alimentation de type dysphagie. Des antiépileptiques peuvent être prescrits si nécessaire. Pour la spasticité, une kinésithérapie associée à un traitement anti-spastique (baclofène, diazépam, tizanidine) est mise en place Une chirurgie correctrice peut être requise en cas de scoliose sévère altérant la fonction respiratoire. Il est conseillé d'effectuer un suivi neurologique de manière annuelle ou semi-annuelle pendant l'enfance afin de surveiller l'évolution de la pathologie.

1.2.6 Physiopathologie

Au vu de la relation entre génotype et phénotype chez les patients, il semblerait que les différents types de mutations impliquent des processus cellulaires distincts pouvant aboutir *in fine* à une dysmyélinisation plus ou moins prononcée sous-tendant l'expression d'une pathologie plus ou moins sévère. Les mécanismes induisant la dysmyélinisation peuvent résulter d'une perte de fonction de la protéine PLP liée à son absence d'expression induite par les délétions ou à un gain de fonction toxique induite par les duplications et les mutations ponctuelles. La recherche sur les mécanismes sous-tendant les déficits de myélinisation chez les patients PMD a fortement été facilitée par la disponibilité de modèles murins modélisant la pathologie (Sidman et al. 1964; Griffiths et al. 1990; Yool et al. 2000; Duncan et al. 2011).

1.2.6.1 Perte de fonction

1.2.6.1.1 Délétions

De manière surprenante, la perte d'expression de la PLP induit la forme la plus modérée de la pathologie. Chez une lignée transgénique abolissant l'expression de la PLP, les OL semblent se développer de manière normale, se différencier et myéliniser correctement le SNC (Klugmann et al. 1997). Les souris apparaissent phénotypiquement normales jusqu'à leur première année de vie, période durant laquelle leur performances motrices commencent à décroitre (Griffiths et al. 1998). L'analyse ultra-structurale de la myéline chez ces animaux à permis de mettre en évidence des défauts subtiles dans la gaine de myéline. La structure multi-lamellaire présente des défauts de compactions, les lamelles ayant tendance à se dissocier les unes des autres induisant une instabilité de la structure. La décompaction de la myéline se traduit par une formation anormale des lignes intra-périodiques (Rosenbluth et al. 2006). Ces anomalies de compaction sont couplées à une dégénérescence axonale progressive (Griffiths et al. 1998). L'absence de PLP cause l'accumulation d'organelles au sein de l'axone traduisant des perturbations du transport axonal rétrograde et antérograde (Edgar et al. 2004). Ceci est cohérent avec une étude réalisée en 2002 chez des patients PLP1-null démontrant en post-mortem une dégénérescence axonale le long du tractus cortico-spinal, dans les pyramides bulbaires et dans le faisceau gracile. Dans cette même étude, une analyse *in vivo* par spectroscopie RMN a permis de mettre en évidence une diminution de marqueurs axonaux en absence d'atteintes majeures de la gaine de myéline (Garbern et al. 2002). Ces études indiquent que la PLP est indispensable au maintien de la compaction de la gaine de myéline et que celle-ci soutient l'intégrité des axones. L'absence de PLP et la déstabilisation de la myéline perturberait ainsi l'interaction entre OL et axones, donnant lieu à une dégénérescence

axonale responsable des symptômes plus modérés rencontrés dans les formes PLP1-null/SPG2.

1.2.6.2 Gain de fonction

Les deux autres types de mutations à l'origine de la PMD impliquent une augmentation d'expression de la PLP (duplications) ou des changements conformationnels (mutations ponctuelles). Ces deux types de mutations causent les formes plus sévères de PMD (classiques et néonatales) qui se traduisent par une dys- et hypomyélinisation sévère. Ainsi, ces mutations sont donc suspectées d'agir à travers un gain de fonction délétère pour les OL.

1.2.6.2.1 Duplications

La présence de copies supplémentaires d'un gène est suspectée produire une augmentation d'expression protéique. Si cela n'a pas été confirmé directement chez l'humain, différentes lignées de souris transgéniques chez lesquelles ont été incorporées des copies supplémentaires de la PLP1 wild-type ont permis de montrer une augmentation de l'expression de PLP. Ces lignées arborent de 2 à 14 copies supplémentaires du gène et démontrent que sa surexpression donne lieu de manière dose-dépendante à une dysmyélinisation corrélée a la sévérité du phénotype clinique (Kagawa et al. 1994; Readhead et al. 1994; Anderson et al. 1998; Karim et al. 2007). De la même manière, les triplications et quintuplations de gènes chez certains patients PMD induisent un phénotype clinique encore plus sévère que celui causé par les duplications (Wolf et al. 2005). De manière intéressante, les animaux homozygotes présentant le plus de copies ont une durée de vie très courte (moins de trois mois) associée à une dysmyélinisation et une mort oligodendrocytaire. A l'inverse, certains animaux hétérozygotes développent une gaine de myéline d'apparence normale

suivie d'une démyélinisation progressive au cours de la première année de vie associée à une neurodégénérescence (Anderson et al. 1998).

Contrairement aux délétions, la surexpression de la PLP induit la mort des OL via une activation de la mort cellulaire programmée (apoptose). Une augmentation de l'expression de la caspase-3 et du cytochrome-c associée à un clivage de PARP a été retrouvée chez ces animaux (Cerghet et al. 2001). La façon dont la surexpression de PLP mène à la mort oligodendrocytaire et à la neurodégénérescence consécutive n'est pas encore bien comprise. Il a été démontré que la PLP exprimée en excès dans des cultures primaires d'OL conduit à son accumulation, ainsi que celle du cholestérol, au sein des endosomes tardifs et des lysosomes, susceptibles de perturber le transport intracellulaire et le bon fonctionnement des OL (Simons et al. 2002). Une réduction drastique des niveaux d'ATP (50%) a été mis en évidence dans la SB et la SG de manière concomitante avec une réduction du potentiel de membrane mitochondriale, une augmentation de l'activité du cytochrome c oxidase (l'enzyme clef de la phosphorylation oxidative) et une colocalisation de la PLP avec les mitochondries chez les souris possédant plusieurs copies de la PLP. Ces résultats démontrent que la surexpression de PLP induit d'importants déficits énergétiques au sein des OL pouvant engendrer ou participer à l'apoptose de ces cellules (Huttemann et al. 2009). Cette étude a été réalisée sur des cerveaux entiers, suggérant que les altérations ne sont pas dues exclusivement à des défauts métaboliques au sein des OL, mais sont aussi le reflet d'une souffrance neuronale. De plus, Boucher et al. ont démontré que la neurodégénérescence identifiée dans ces modèles semble être la résultante des défauts de myélinisation ainsi que de l'environnement toxique crée par la surexpression de PLP. Ceci a été montré par l'établissement d'une co-culture entre des neurones et des cellules non-gliales transfectées pour exprimer la PLP de manière importante. Dans ces cultures, la surexpression de PLP induit une diminution importante de la viabilité des neurones présents. La toxicité de la PLP proviendrait de l'altération des concentrations

ioniques dans l'espace extracellulaire, se traduisant par une acidification du pH (Boucher et al. 2002).

Pour finir, une activation importante de la microglie associée à l'augmentation de l'expression de cytokines pro-inflammatoires telles que TNF-α et IL-6 a été révélée chez des souris sur-exprimant la PLP, indiquant la stimulation d'une réponse immunitaire (Tatar et al. 2010). Il reste maintenant à élucider le rôle que joue ce processus dans la dégénérescence des OL.

1.2.6.2.2 Mutations ponctuelles

Les mutations ponctuelles présentes dans les régions codantes de plp1 sont capables d'altérer la conformation finale de la protéine, conduisant à un gain de fonction toxique pour les OL. Les animaux « jimpy », «myelin synthesis deficient » (msd) et « rumpshaker » (rsh) sont 3 modèles murins présentant des mutations ponctuelles localisées à différents endroits du gène plp1 et se traduisant par des phénotypes distincts. Les animaux jimpy et jimpy-msd modélisent les formes les plus sévères de PMD et se caractérisent par la mort massive des oligodendocytes (Gardinier et Macklin 1988) alors que les souris rumpshaker modélisent les formes modérées (Griffiths et al. 1990). D'autres espèces animales peuvent être touchées par la pathologie, telle que le rat myelin déficient (md) et le chien shaking-pup (sh) (Duncan et al. 2011).

La souris jimpy possède une mutation sur le site accepteur de l'épissage de l'exon 5, induisant une perte de 74 paires de bases de l'ARNm et un décalage du cadre de lecture conduisant à la production d'une PLP tronquée dans son extrémité C-terminale (Nave et al. 1986). Cette souris présente une dysmyélinisation importante du SNC se traduisant par un phénotype clinique très sévère qui se manifeste dès le 11ème jour de vie par des tremblements des membres postérieurs suivit de l'apparition de convulsions et une diminution de la prise de

poids. Les animaux finissent par mourir au cours de la 4ème semaine de vie (Sidman et al. 1964). Le peu de myéline observé chez les souris jimpy est caractérisé par une altération des lignes intra-périodiques ainsi qu'une absence totale d'immunoréactivité contre la protéine PLP (Duncan et al. 1989). Une diminution de l'expression de la neurofascine 155, impliquée dans l'ancrage de la myéline avec l'axone (voir chapitre 1.1.1 de cette thèse) est observée chez ces animaux (Harsan et al. 2004). Cette diminution pourrait expliquer les défauts d'organisation des lignes périodiques et intra-périodiques susceptibles de déstabiliser la formation de la gaine de myéline (Harsan et al. 2004). La dysmyélinisation observée chez les souris jimpy est due à la mort des OL matures par apoptose (Knapp et al. 1986; Skoff 1995; Vela et al. 1996; Cerghet et al. 2001; Skoff et al. 2004). Une lignée immortalisée d'OL jimpy (158JP) a été générée afin d'aider à la compréhension des mécanismes cellulaires impliqués dans la pathologie (Feutz et al. 2001). Il a été démontré que la PLP s'insère de manière incorrecte à la membrane des OL 158JP donnant lieu à un défaut de la voie de signalisation de l'AMPc (Ghandour et al. 2002). Dans ces cellules, on observe une augmentation du potentiel de membrane mitochondriale ainsi qu'une production d'espèces réactives oxygénées, parallèlement à une augmentation de la colocalisation entre la PLP et les mitochondries (Baarine et al. 2009). De plus, il existe une diminution drastique des concentrations en plasmalogène dans les 158JP et dans des fibroblastes de patients PMD (Wood et al. 2011). Ces résultats suggèrent que le stress oxydatif et des déficits peroxysomaux pourraient être impliqués dans la mort des OL. Une élévation de la concentration en calcium intracellulaire a été observée dans des cultures primaires d'OL jimpy pouvant accroitre leur vulnérabilité et participer au déclenchement des phénomènes apoptotiques (Knapp et al. 1999). Comme pour les duplications, une activation de la microglie a été identifiée dans le SNC dès le 10ème jour de vie des souris jimpy (Vela et al. 1995; Ikeda et al. 2016). Cependant, les facteurs initiateurs de cette activation ainsi que son rôle au sein de la physiopathologie restent encore à élucider.

Les souris rsh possèdent une mutation ponctuelle localisée dans l'exon 4 résultant en une substitution d'acides aminés au niveau de la deuxième boucle extracellulaire. De manière intéressante, cette mutation est identique à celle retrouvée chez un patient atteint de la forme modérée de la pathologie (Svenstrup et al. 2010). Bien que présentant une hypomyélinisation partielle, ces souris possèdent plus de myéline que tous les autres mutants (Schneider et al. 1992). Une augmentation du nombre d'OL est observée, indiquant que la mutation rsh n'induit pas de mortalité cellulaire (Griffiths et al. 1990). Ceci démontre que l'hypomyélinisation des souris rsh résulte d'autres mécanismes physiopathologiques encore inconnus à ce jour. De manière intéressante, l'expression de la mutation rsh sur un autre fond génétique (BH3) induit un phénotype clinique important, avec une mort prématurée des souris vers 40 jours et une hypomyélinisation impliquant des mécanismes apoptotiques (Al-Saktawi et al. 2003). Ainsi, différentes susceptibilités génétiques peuvent expliquer les variations d'expression de la pathologie pour une même mutation.

Au vu des différents phénotypes causés par les mutations ponctuelles à la fois chez l'homme et la souris, une toxicité de la protéine PLP plus ou moins importante semble être mise en jeu. Une hypothèse permettant d'expliquer le lien entre la conformation de la PLP et la mort des OL stipule que les protéines mal conformées resteraient pour la majorité accumulées au sein de leur organelle de synthèse, le réticulum endoplasmique. Ce mécanisme sera détaillé dans le chapitre 3 de cette thèse.

1.3 Le stress du réticulum endoplasmique

1.3.1 Le réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique (RE) est un organite des cellules eucaryotes qui représente le centre de la biosynthèse, des modifications post-traductionnelles et de l'adressage des protéines sécrétées et transmembranaires. Le RE est impliqué dans une diversité d'autres fonctions telles que la biosynthèse des phospholipides, du cholestérol et des stéroïdes, ainsi que la dégradation du glycogène et la régulation des concentrations intracellulaires de calcium. Cet organite est composé d'un empilement de tubules et de citernes interconnectés formés au sein d'une membrane qui s'établie dans la continuité de la membrane nucléaire externe (figure 10).

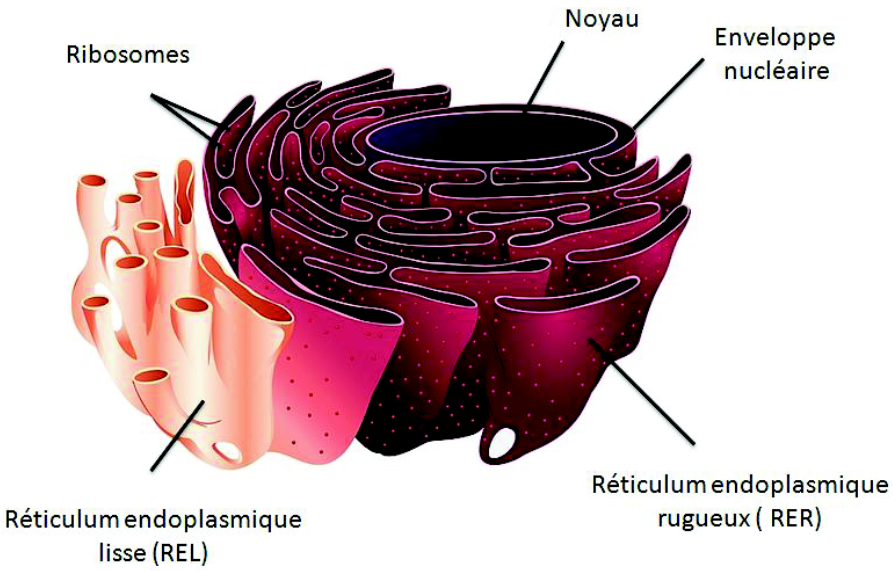

Figure 10 : Illustration schématique de l'organisation du réticulum endoplasmique.

Crédit Image : Sigma-Aldrich

Le RE se divise en deux unités que sont le réticulum endoplasmique lisse (REL) et le réticulum endoplasmique rugueux (REG). Le REL participe à la synthèse des phospholipides et des stéroïdes ainsi qu'au stockage des ions calcium (Baumann et Walz 2001). Le REG est appelé ainsi à cause de la présence de ribosomes sur sa membrane qui permettent la synthèse des protéines destinées à être secrétées ou adressées à la membrane. Les protéines destinées à emprunter la voie de sécrétion pénètrent dans la lumière du RE par translocation via la reconnaissance d'une séquence d'adressage, appelée peptide signal. La proportion de REL et REG varie en fonction du type cellulaire de manière consistante avec leur fonction, une cellule présentant une activité sécrétoire importante contiendra majoritairement du REG (Voeltz et al. 2002).

La lumière du RE possède un environnement oxydant favorable au repliement ainsi qu'aux modifications post-traductionnelles nécessaires à la maturation des protéines néo-synthétisées (N-glycosylation, oligomérisation, formation des ponts disulfures…). Un événement essentiel conduisant au bon repliement et à la stabilisation des protéines est la formation de ponts disulfures. Au sein du RE, la protéine disulfure isomérase (PDI) est l'enzyme qui catalyse cette réaction et permet la réduction et les réarrangements des ponts formés de manière incorrecte (Hatahet et Ruddock 2009). Il peut arriver, en situation normale ou pathologique, que la biosynthèse des protéines soit perturbée. Toutes les situations conduisant à une altération de la fonction du RE empêchent la conformation correcte des protéines. De même, une production excessive de protéine est susceptible d'excéder les capacités de stockage provoquant leur accumulation et perturbant le fonctionnement du RE. Pour éviter cela, le RE possède un système de « contrôle qualité » permettant de veiller au bon déroulement des étapes de la biosynthèse. Ce mécanisme de surveillance permet ainsi d'adresser les protéines correctement synthétisées à leur cible et de dégrader les protéines mal conformées ou produites en excès afin de ne pas nuire au fonctionnement de la cellule.

Le processus de dégradation des protéines mal conformées est appelé « ERAD » (Endoplasmic Reticulum-Associated Protein Degradation). L'ERAD consiste en deux mécanismes distincts : le système ubiquitine-protéasome (ERAD1) et le système autophagie-lysosome (ERAD2) (Fujita et al. 2007). La voie ERAD1 élimine les protéines solubles via leur reconnaissance par les chaperonnes, leur rétrotransloquation dans le cytosol et leur élimination successive dans le protéasome (figure 11) (Guerriero et Brodsky 2012). La voie ERAD2 dégrade à la fois les protéines solubles et insolubles via leur incorporation dans une vésicule à double membrane nommée autophagosome, qui va fusionner avec le lysosome où l'hydrolyse pourra être effectuée.

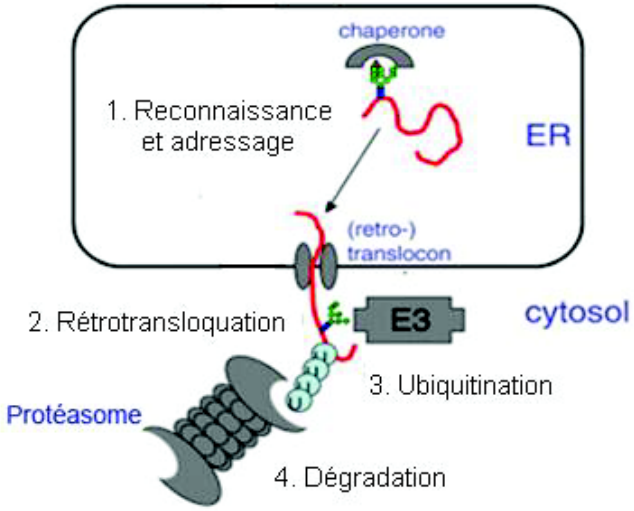

Figure 11: Représentation schématique de la voie de dégradation ERAD1.

Lors de la première étape les glycoprotéines mal conformées sont reconnues par les protéines chaperonnes et adressées au complexe de rétrotransloquation. Deuxièmement, les polypeptides sont retrotransloqués du RE vers le cytosol. Troisièmement, la poly-ubiquitination de la chaine polypeptidique est réalisée. Quatrièmement, les polypeptides poly-ubiquitinylés sont dégradés par le protéasome.

Adapté de Yoshida et Tanaka (2010).

Le système de contrôle est assuré par la présence de protéines chaperonnes au sein de la lumière du réticulum. Celles-ci appartiennent à la famille des protéines de choc thermique (telles que la protéine BiP et GRP94), des leptines (calnexine et calréticuline) et des thiol oxyreductase dont fait partie la PDI (Nishikawa et al. 2005). Elles sont capables d'interagir en utilisant l'ATP avec les protéines néo-synthétisées jusqu'à ce qu'elles atteignent leur structure finale. La calnexine et la calréticuline se fixent sur toutes les protéines néo-synthétisées N-glycosylées, ce qui permet aux protéines non conformées de résider plus longtemps dans le RE et d'être prises en charge par la machinerie de conformation des protéines (Rajagopalan et al. 1994). Les protéines BiP et GRP94 interagissent directement avec les segments hydrophobes exposés des protéines en cours de synthèse ou des protéines mal repliées, prévenant ainsi les erreurs de repliement. La PDI possède elle aussi une activité chaperonne dépendante et indépendante de son rôle dans la formation des ponts disulfures (Noiva 1999).

1.3.2 La réponse UPR (unfolded protein response)

Comme mentionné précédemment, les modifications physiologiques ou physiopathologiques altérant directement le bon fonctionnement du RE sont perçues comme un stress déclenchant une réponse cellulaire appelée « UPR » (*unfolded protein response*). L'accumulation de protéines mal conformées dans la lumière du RE étant un élément majeur de l'activation du stress du RE, la voie UPR va jouer un rôle très important dans les cellules à forte activité sécrétoire. L'UPR représente l'ensemble de voies de signalisation permettant à la cellule de s'adapter et de lutter contre le stress afin de rétablir l'homéostasie. L'UPR passe par l'activation de 3 voies de signalisation: IRE1, ATF6 et PERK, capables d'activer en aval des régulations transcriptionnelles et traductionnelles (Ron et Walter 2007). Ce sont les protéines chaperonnes, et notamment la protéine BiP, qui vont agir comme « senseurs » de l'accumulation protéique. Dans les cellules non stressées, BiP se lie à PERK, IRE1 et ATF6,

les maintenant dans un état inactif (Bertolotti et al. 2000). Quand les protéines mal conformées s'accumulent au sein du RE, elles sont reconnues par BiP qui leur permet de retrouver une conformation correcte. Cette fixation compétitive induit la dissociation de BiP et PERK/IRE1/ATF6 qui provoque l'activation des voies de signalisation sous-jacentes (figure 11). Lorsque la quantité de protéines mal conformées diminue suite aux processus adaptatifs mis en place, la protéine BiP sera libérée pour redevenir à nouveau capable de se lier aux transducteurs. Ceci permettra donc à la cellule de revenir à son état basal (Bertolotti et al. 2000; Shen et al. 2002). De manière intéressante, les protéines transmembranaires à l'origine des voies de signalisation UPR sont aussi capables de reconnaître les accumulations protéiques, suggérant que leur activation peut se faire de concert (Gardner et Walter 2011).

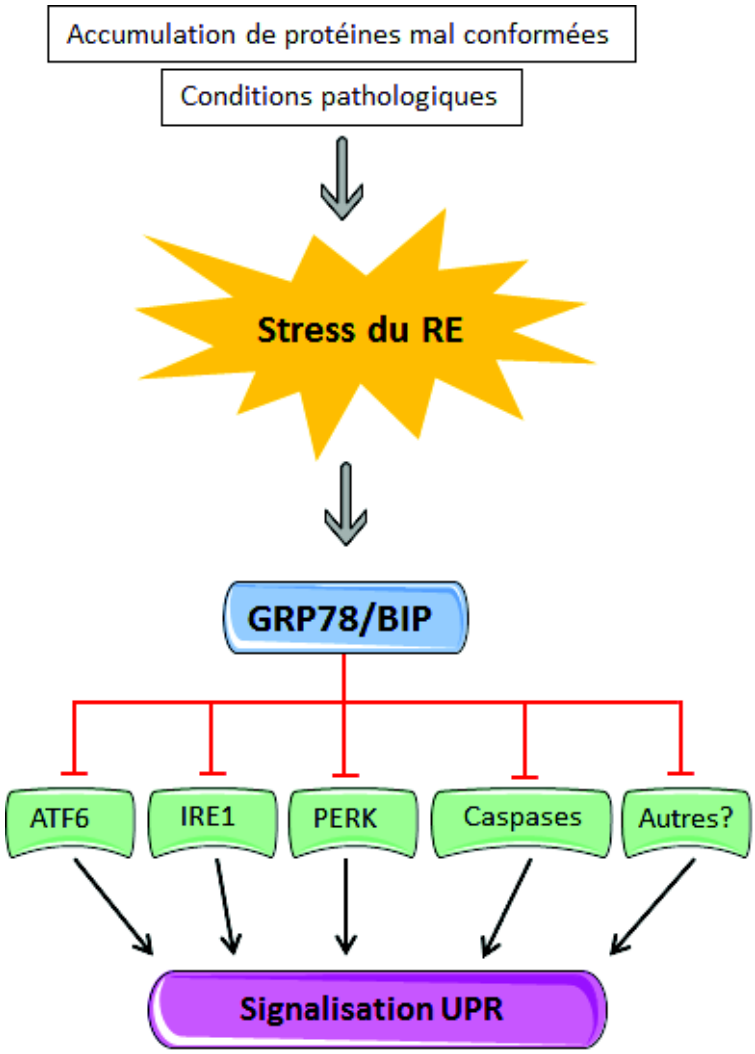

Figure 12 : La chaperonne BiP est le régulateur central des voies de signalisation de l'UPR.

Dans les cellules non stressées, les transducteurs ATF6, IRE1 et PERK sont maintenus dans un état inactif via leur interaction avec BiP. Pendant le stress du RE, la liaison de BiP aux protéines mal conformées active ces trois protéines et leur voie de signalisation, enclenchant ainsi l'UPR.

Adapté de Lee (2005).

1.3.2.1 La voie PERK

Le premier élément activé lors de la réponse UPR est la voie de signalisation liée à PERK. PERK est une sérine/thréonine kinase transmembranaire de type I de 125kDa. Son activation passe par la dissociation de BiP de son domaine luminal, permettant son oligodimérisation et son autophosphorylation en trans. PERK est alors capable de phosphoryler la sous unité α du facteur d'initiation de la traduction eIF-2 (eukaryotic translation initiation factor 2), lui permettant d'inhiber eIF2B, un facteur de transcription clef de la synthèse protéique, empêchant ainsi l'initiation de la traduction des protéines (Wek et Cavener 2007). Cette voie de signalisation permet de ralentir temporairement la synthèse des protéines afin d'éviter leur accumulation intracellulaire. Durant l'activation de cette voie, les protéines ayant une courte durée de vie ne sont plus exprimées. On peut noter que malgré le blocage de la synthèse protéique, la phosphorylation d'eIF-α induit l'augmentation de gènes possédant des séquences uORF (upstream open reading frame). Parmi eux, ATF4 contrôle l'expression de gènes impliqués dans l'apoptose, l'autophagie, le métabolisme des acides aminés et de réponses anti-oxydantes (Hetz et Mollereau 2014).

1.3.2.2 La voie IRE1

La voie IRE1 est la mieux étudiée des trois ; elle fut la première à être découverte et est aussi la plus conservée, retrouvée de la levure à l'Homme. Son domaine luminal est composé d'un peptide signal permettant son adressage au RE, d'un domaine d'oligomérisation et d'un domaine de liaison à la protéine chaperonne BiP. Son activation via la dissociation de BiP induit son oligomérisation et une induction de son activité kinase conduisant à son autophosphorylation en trans. De manière intéressante, l'action de IRE1 ne passe pas par une cascade de signalisation liée aux kinases car IRE1 n'a pas d'autre substrat

que lui-même (Shamu et Walter 1996). Son oligomérisation induit des changements conformationnels permettant l'induction d'une activité ribonucléase (RNase). Ceci permet de cliver l'ARNm d'un facteur de transcription appelé X-box binding protein 1 (XBP1). L'hydrolyse de 26 nucléotides induit un changement du cadre de lecture de l'ARN messager qui peut alors être traduit en une protéine plus longue. La protéine XPB1-s (épissée) traduite à la suite de ce clivage est un facteur de transcription de type leucine-*zipper* appartenant à la famille ATF/CREB. La translocation d'XBP1-s dans le noyau permet l'activation de gènes codant pour différents mécanismes impliqués dans le maintien de l'homéostasie du RE, telles que des protéines chaperonnes permettant d'aller aider au repliement protéique et les processus de dégradation ERAD (ERAD1 et ERAD2) (Hetz et al. 2011). XBP1-s active également la transcription d'enzymes impliqués dans la biosynthèse des phospholipides, lui permettant indirectement de réguler l'expansion du RE afin d'augmenter sa capacité de stockage des protéines (Shaffer et al. 2004).

1.3.2.3 La voie ATF6

La dernière voie de signalisation UPR implique une protéine transmembranaire, ATF6, contenant un domaine de transcription bZIP dans sa région cytosolique. ATF6 est retenue à la membrane du RE par un segment transmembranaire la rendant inactive. La dissociation du complexe BiP/ATF6 induit sa translocation dans l'appareil de Golgi où elle est clivée par les protéases S1P et S2P. Ce clivage produit la libération de son domaine cytoplasmique qui agit comme facteur de transcription en augmentant directement la synthèse des gènes impliqués dans le mécanisme ERAD et le repliement protéique. De plus, l'expression d'ATF6 stimule directement la transcription du gène XBP1, qui est ensuite clivé par la voie IRE1. Ceci démontre que l'UPR est une voie intégrative impliquant une coopération entre les différentes voies de signalisation.

1.3.3 Apoptose induite par le stress du RE

La réponse UPR est un mécanisme adaptatif mis en place pour maintenir l'homéostasie cellulaire. Cependant, lorsque le stress est trop intense ou prolongé, il peut mener à l'activation de l'apoptose ou mort cellulaire programmée. L'apoptose est induite par différents mécanismes impliquant les 3 voies de signalisations spécifiques de l'UPR. Cependant, le lien entre l'accumulation des protéines mal conformées et l'activation des mécanismes de mort cellulaire ne sont pas encore bien compris à ce jour.

En aval des cascades de signalisations spécifiques à l'UPR, les facteurs impliqués dans l'apoptose font pour la plupart partie de la famille Bcl-2 qui maintient l'intégrité des membranes du RE et des mitochondries. Cette famille regroupe des protéines pro-apoptotiques (Bax, Bak, Bim) ou anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-xl). En condition de survie, les protéines anti-apoptotiques, en se liant aux protéines pro-apoptotiques, inhibent leur activité. La voie classique de l'apoptose induit l'activation des protéines pro-apoptotiques qui mène à la formation de pores au sein de la membrane mitochondriale, relarguant le cytochrome-c et déclenchant la cascade des caspases aboutissant à la destruction de la cellule. Il a été démontré qu'une grande partie des protéines de la famille Bcl-2 sont aussi associées au RE (Rudner et al. 2002; Rao et al. 2004). De plus, la suppression de Bax et Bak induit une résistance à l'apoptose mitochondriale ainsi qu'à la mort induite par le stress du RE, suggérant l'existence d'un lien entre ces deux mécanismes (Wei et al. 2001).

La protéine CHOP (C/EBP-homologous protein) est un des facteurs clefs impliqués dans l'apoptose induite par le stress du RE. Son activation semble être médiée par les 3 voies de signalisation de l'UPR, bien que la voie PERK/eIF2-α ait été la plus étudiée. En effet, le facteur de transcription ATF4 activé par cette cascade de signalisation est capable d'activer directement l'expression de CHOP. Sa suppression induit une résistance et une survie

cellulaire augmentée face au stress du RE et sa surexpression mène à une sensibilité accrue à l'apoptose (McCullough et al. 2001; Gotoh et al. 2002). CHOP exerce son action délétère par la régulation de différents acteurs impliqués dans la mort cellulaire programmée. En effet, CHOP inhibe l'expression de la protéine Bcl-2, déstabilisant l'équilibre entretenu avec Bax. De plus, elle augmente l'expression de facteurs pro-apoptotiques tels que PUMA et Bim donnant lieu à l'activation de la cascade des caspases aboutissant *in fine* à la mort cellulaire. En parallèle, ERO1α (ER oxidase 1α) qui est une cible de CHOP est capable d'induire l'oxydation de la lumière du RE pouvant déclencher la libération de H_2O_2 dans le cytoplasme et induite la production de ROS, suggérant qu'un des mécanismes de mort induite par CHOP pourrait passer par le stress oxydatif (Marciniak et al. 2004).

La voie IRE1 est capable de stimuler la kinase ASK1 (Apoptotic-Signaling Kinase-1) via l'activation de TRAF2 (tumor necrosis factor receptor associated factor 2). Le complexe IRE1-TRAF2-ASK1 phosphoryle la kinase JNK (kinases Jun-N-terminal kinase). La translocation successive de JNK dans la mitochondrie permet d'inhiber l'expression de Bcl-2 et d'augmenter celle de la protéine Bim (Lei et Davis 2003). De même, une autre kinase p38 MAPK est activée par ASK1 et est capable de stimuler directement l'expression de CHOP. Ainsi, pendant une période prolongée de stress, les voies PERK et IRE1 convergent vers l'activation de CHOP. De plus, l'interaction IRE1/TRAF2 est susceptible de favoriser le clivage de la pro-caspase-12 en caspase-12. Sa translocation du RE vers le cytosol lui permet d'activer les caspases effectrices de l'apoptose (caspase-9 puis caspase-3) (Morishima et al. 2002). Un autre mécanisme d'activation de la caspase-12 pourrait passer par un relargage du $Ca^{2}+$ dans le cytosol suite à la formation de pore par les protéines Bax et Bak. Ceci active une caspase dépendante du $Ca^{2}+$, la m-calpaïne qui cliverait la caspase-12 et mènerait à l'apoptose (Nakagawa et Yuan 2000). La caspase-12 est considérée comme la caspase spécifique de la mort induite par le stress du RE. En effet, localisée au sein du RE, elle est activée par le stress

du RE et non par d'autres signaux apoptotiques mitochondriaux (Nakagawa et al. 2000; Martinez et al. 2010; Zhang et al. 2016).

1.3.4 Stress du réticulum endoplasmique et pathologies

Le stress du RE est impliqué dans une variété de pathologies incluant le cancer, le diabète, et les maladies du SN. En effet, l'agrégation protéique représente un risque particulièrement élevé dans les cellules post-mitotiques tels que les neurones ou les cellules gliales, qui ne peuvent pas éluer les agrégats à travers la division cellulaire. Ainsi, le stress du RE a été mis en évidence dans de nombreuses pathologies neurodégénératives et/ou pathologies de la myéline.

1.3.4.1 Stress du réticulum endoplasmique et maladies neurodégénératives

Parmi les maladies neurodégénératives, les protéinopathies regroupent les pathologies partageant la formation d'agrégats protéiques soupçonnées de sous-tendre la dégénérescence neuronale à travers différents mécanismes (Valastyan et Lindquist 2014).

La maladie d'Alzheimer est caractérisée par l'accumulation du peptide β-Amyloid-42 (Aβ42) donnant lieu à la formation de plaques amyloïdes dans l'ensemble de l'encéphale et la déposition d'enchevêtrement neurofibrillaire lié à l'hyperphosphorylation de la protéine tau. La quantité de plaques amyloïdes est liée au développement de la neurodégénérescence et à la progression des symptômes. Une activation de l'UPR, mise en évidence par des changements d'expression des marqueurs p-eIF2α, BiP et p-PERK, a été retrouvée dans l'hippocampe post-mortem de patients Alzheimer (Hoozemans et al. 2005; Hoozemans et al. 2009). Des mutations dans le gène codant la préséniline (une protéine impliquée dans la production d'Aβ) sont associées aux formes génétiques de la pathologie. De manière intéressante, ces mutations de la préseniline réduisent la phosphorylation de PERK et eIF2α, réduisant la capacité de cette

voie à inhiber la synthèse protéique (Katayama et al. 2001). La préséniline mutante inhibe également la voie IRE1, suggérant qu'une réduction de l'épissage de XBP1 pourrait changer le signal pro-survie en réponse pro-apoptotique (Gupta et al. 2010). De plus, la présence d'un polymorphisme sur le promoteur du gène XBP1 représente un facteur de risque de la maladie (Liu et al. 2013).

La maladie de Parkinson est une pathologie entraînant un dysfonctionnement moteur accompagné d'une rigidité et de tremblements du corps au repos. Ses caractéristiques physiopathologiques incluent la mort des neurones dopaminergiques de la substance noire pars compacta associé à la présence de corps de Lewy formés d'agrégats protéiques dont le constituant principal est l'α-synucleine. L'activation de la voie PERK-eIF2α a été mise en évidence dans les neurones dopaminergiques de certains patients et la colocalisation des marqueurs du stress avec l'α-synucléine suggère que son accumulation pourrait déclencher l'UPR (Hoozemans et al. 2007). Bien qu'étant une maladie majoritairement sporadique, certains cas sont causés par des mutations génétiques. Parmi elles, une mutation sur le gène codant la parkine a été mise en évidence. La parkine fonctionne comme une ubiquitine ligase impliquée dans le mécanisme de reconnaissance et dégradation des protéines mal conformées (ERAD1) (Shimura et al. 2000). Il a été démontré que la parkine module indirectement l'activité de XBP1 et que cette modulation est abolie par les mutations de parkine impliquées dans la maladie de Parkinson (Duplan et al. 2013). La suppression de l'interaction entre la parkine et XPB1 conduit à une altération de l'UPR, favorisant ainsi l'accumulation protéique.

La maladie de Creutzfeld-Jackob est caractérisée par une perte de contrôle moteur et l'apparition d'une démence causée par la conversion de la protéine prion endogène (Prp) en une forme pathologique appelée « scrapie » (tremblante) ou Prp^{sc}. Le Prp^{sc} est considéré comme un agent infectieux non conventionnel (car dénué d'acide nucléique contrairement aux virus et bactéries), capable de se répliquer. L'infection par Prp^{sc} de cellules *in vitro* induit une

augmentation de l'apoptose associée à l'activation de la caspase-12, spécifique du stress du RE ainsi que l'expression des chaperonnes BiP et GRP94 (Hetz et al. 2003). *In vivo,* un décours temporel est démontré entre l'activation des chaperonnes observée au début de l'infection et l'activation de la caspase-12 détectée dans les stades terminaux et associée à la mort neuronale (Hetz et al. 2005). Cette étude à démontré que la sur-expression de la chaperonne BiP *in vivo* protège contre la toxicité de Prp^{sc}.

1.3.4.2 Stress du RE et pathologies de la myéline

Pendant la phase active de myélinisation, les cellules gliales spécialisées doivent produire des quantités importantes de membrane. En effet, un OL myélinise plusieurs axones durant une phase active de myélinisation estimée entre 12 et 18 heures. Une étude réalisée chez le rat estime que durant cette période, les OL étendent leur surface de 5–50×10^3 μm^2/cellules/jours (Baron et Hoekstra 2010). Ce processus nécessite une synthèse massive de lipides et de protéines, ce qui rend ces cellules hautement sensibles aux perturbations du RE. Ainsi, il n'est pas surprenant qu'une activation des voies UPR soit retrouvée dans plusieurs pathologies de la myéline.

L'interféron-γ est une cytokine pro-inflammatoire activée par les lymphocytes T. Cette cytokine joue un rôle complexe dans les pathologies démyélisantes impliquant le système immunitaire tel que la SEP chez l'humain et l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale, considéré comme un modèle animal de SEP. Dans ces pathologies, l'augmentation des médiateurs de l'inflammation est susceptible d'activer l'UPR. *In vitro*, un traitement avec l'interféron-γ induit l'apoptose des OL accompagnée d'une augmentation des marqueurs du stress du RE tels que BiP, CHOP, caspase-12 et eIF2α (Lin et al. 2005). Dans cette même étude, une corrélation a été retrouvée entre la perte des OL et l'activation des marqueurs du stress du RE *in vivo* chez des souris exprimant l'interféron-γ. De plus, l'ablation de

l'expression de PERK chez ces animaux empire drastiquement leur phénotype clinique, indiquant que cette voie représente un mécanisme protecteur. De même, chez l'humain, une augmentation des marqueurs BiP et CHOP a été retrouvée dans les lésions et péri-lésions démyélinisantes de patients SEP (Cunnea et al. 2011). Cependant, le mécanisme par lequel l'activation de l'interféron-γ induirait le stress du RE n'est pas encore compris.

Le syndrome de l'« ataxie infantile avec hypomyélinisation centrale » est une leukoencéphalopathie caractérisée par une dégénérescence de la substance blanche associée à une perte oligodendrocytaire ainsi que des anomalies morphologiques dans les cellules restantes (van der Voorn et al. 2005). Cette pathologie est induite par des mutations dans le gène codant pour les 5-sous unités eIF2B (Leegwater et al. 2001). Lors du stress du RE, eIF2B est activé par la forme phosphorylée d'eIF2α (p-eIF2α) pour réduire la synthèse protéique (voir chapitre 1.3.2), associant directement cette pathologie à la voie UPR. Les mutations sont ainsi susceptibles de perturber directement la réponse à p-eIF2α, pouvant induire une hyperréactivité au stress du RE ainsi qu'une activation inappropriée des voies de l'UPR conduisant à une mauvaise balance entre phénomènes adaptatifs et apoptotiques (van der Knapp et al. 2006). L'activation des voies UPR a été démontrée chez les patients via une augmentation des marqueurs p-PERK, p-eIF2α, ATF4 et CHOP (van Kollenburg et al. 2006). *In vitro*, l'induction d'ATF4 face au stress du RE est augmentée dans des cellules exprimant une forme mutante d'eIF2B (Kantor et al. 2005). De plus, la transfection de eIF2B mutée dans une lignée oligodendrocytaire induit l'augmentation des marqueurs ATF4 et BiP ainsi qu'une sensibilité accrue au stress du RE induite par un agent pharmacologique exogène (Kantor et al. 2008).

1.3.4.3 Stress du réticulum endoplasmique et PMD

La PLP, dont les mutations sont à l'origine de la PMD, est synthétisée au sein du RE et transportée dans l'appareil de Golgi ou elle s'associe aux lipides afin de rejoindre la surface cellulaire et d'intégrer la gaine de myéline (Lee 2001). Il a été démontré que les délétions génèrent les formes les plus modérées de PMD. A l'inverse, les duplications et les mutations ponctuelles provoquent une perte oligodendrocytaire importante se traduisant par un phénotype clinique plus sévère. Ces mutations « gain de fonction » produisent un excès de PLP ou mènent à une conformation anormale de la protéine finale. Il a en effet été démontré que les mutations ponctuelles de PLP1 sont à l'origine de changements conformationnels dans la protéine PLP (Jung et al. 1996; Dhaunchak et al. 2011). Ces modifications vont perturber le bon fonctionnement du RE et mener à une activation de l'UPR pouvant être délétères pour la cellule en cas de perturbation protéique trop importante (Gow et al. 1998). La transfection de PLP dans la lignée cellulaire COS a permis de montrer que la protéine normale ou *wild-type* est correctement adressée à la membrane alors que les 5 types de PLP mutantes analysées sont retenues au niveau du RE où elles s'accumulent et colocalisent avec la protéine BiP (Gow et al. 1994).

L'accumulation de PLP au sein du RE est susceptible d'activer les voies UPR *in vitro* comme le montre l'augmentation des protéines BiP, CHOP et ATF3 dans les cellules COS transfectées avec la mutation msd (Southwood et al. 2002). L'augmentation de l'ARNm des marqueurs UPR est retrouvé *in vivo* chez les souris msd, rsh et jimpy (Southwood et al. 2002). Chez les souris jimpy, une activation de la caspase-12 (Cerghet et al. 2001) indique que l'apoptose induite par le stress du RE est capable de jouer un rôle dans la sur-mortalité des OL donnant lieu à la dysmyélinisation. De manière intéressante, une étude a démontré qu'une mutation causant une forme sévère de PMD produit une protéine résistante à la dégradation, provoquant un stress du RE, contrairement à celle associée à une forme modérée qui est

rapidement dégradée sans activation de l'UPR (Roboti et al. 2009). Ainsi, la sévérité de la pathologie pourrait être associée avec l'intensité du stress produit par la mutation (figure 13). De plus, une augmentation de la sensibilité à un stress exogène induit par un agent pharmacologique a été retrouvée dans des OL différenciés à partir de fibroblastes d'un patient PMD présentant la forme sévère de la pathologie (Numasawa-Kuroiwa et al. 2014).

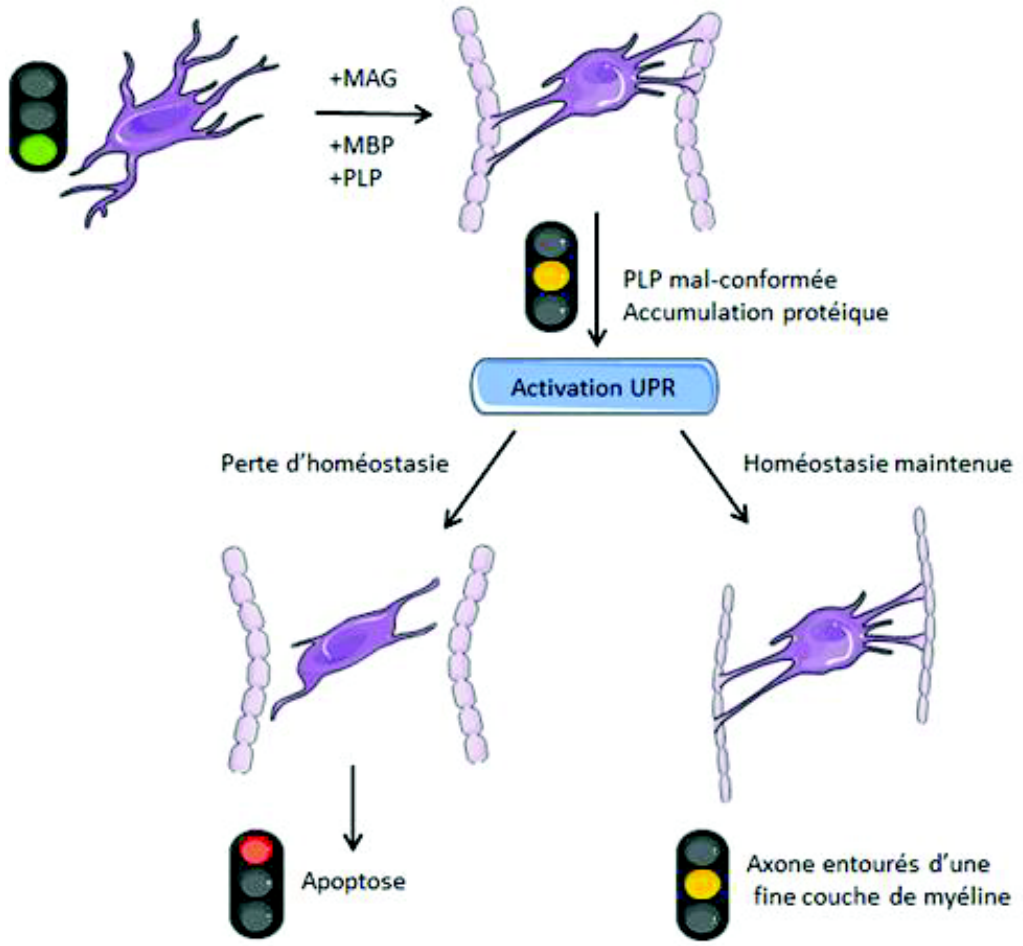

Figure 13 : Hypothèse physiopathologique des formes sévères et modérées de PMD.

Les OPC prolifèrent et se différencient jusqu'à devenir des OL myélinisants exprimant les marqueurs de la myéline tels que MAG, MBP et PLP. Au moment de la formation de la gaine de myéline, la synthèse massive de ses composants crée une accumulation intracellulaire de la PLP mutante ce qui active la réponse UPR. L'intensité de la réponse UPR déterminera ainsi si la cellule est maintenue en vie ou éliminée par apoptose.

Adapté de Southwood et Gow (2001).

1.4 Molécules à potentiel thérapeutique

Au regard des mécanismes physiopathologiques dont l'implication est suspectée dans la PMD et les pathologies de la myéline (voir chapitres 1.3.4.2 et 1.3.4.3), les composés modulateurs du stress du RE ainsi que les molécules protégeant les cellules nerveuses contre la mort cellulaire peuvent présenter un fort potentiel thérapeutique. Ainsi, le présent chapitre est dédié à l'analyse des données bibliographiques en faveur du potentiel des modulateurs du stress du RE (4-PBA, rapamycine) et des neurostéroïdes qui sont décrits comme des neuroprotecteurs dans divers modèles expérimentaux (Baulieu et al., 2001; Melcangi et al., 2008; Bove et al., 2011; Irwin et al., 2014; Patte-Mensah et al., 2014; Kolb et al. 2015).

1.4.1 Les modulateurs du stress du RE

1.4.1.1 Chaperonne chimique : le 4-Phenylbutyrate (4-PBA)

L'UPR est un mécanisme adaptatif mis en jeu pour éviter l'accumulation de protéines pouvant être toxiques pour la cellule. Les protéines chaperonnes endogènes du RE jouent un rôle majeur dans le système UPR, en supervisant le repliement protéique et s'assurant de la conformité de leur structure. Elles permettent également la dégradation des protéines mal conformées. Ainsi, les molécules exogènes pouvant exercer les mêmes fonctions protectrices que les chaperonnes représentent une piste thérapeutique intéressante pour le traitement des pathologies impliquant l'accumulation de protéines mal conformées.

Le 4-PBA est un acide gras volatile approuvé par l'agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux pour le traitement des désordres du cycle de l'urée. C'est une pro-drogue métabolisée en phénylacétate qui forme la phénylacétylgutamine par acétylation à la glutamine devenant ainsi comparable à l'urée en termes de concentration molaire.

Ceci permet une voie alternative d'élimination de l'azote. Ces dernières années, la capacité du 4-PBA à se comporter comme une chaperonne chimique agissant de manière bénéfique sur le stress du RE a été démontrée dans différents modèles de pathologies impliquant une agrégation protéique *in vitro* et *in vivo* (Kolb et al. 2015). Différentes études montrent que le 4-PBA améliore la sécrétion et restaure la fonctionnalité des protéines mutées impliquées dans la fibrose kystique, les pathologies du foie ou encore la maladie de Parkinson (Rubenstein et al. 1997; Burrows et al. 2000; Kubota et al. 2006). Cette amélioration de la conformation protéique *in vitro* est corrélée à une réduction du stress du RE, mis en évidence par la diminution des marqueurs UPR tels que BiP, GRP94 et p-Perk ainsi qu'une augmentation de la viabilité cellulaire (Kubota et al. 2006; Mimori et al. 2012). Un traitement des cellules SH-SY5Y avec la tunicamycine, un agent inhibant la N-glycolysation des protéines, produit un stress du RE et une diminution de la viabilité cellulaire (Zamarbide et al. 2013). Dans ce modèle, un traitement au 4-PBA protège les cellules de l'apoptose via la diminution de l'expression des marqueurs CHOP, XBP1s et BiP qui traduit une amélioration du stress du RE et l'inhibition de la caspase-3.

In vivo, un prétraitement au 4-PBA contrecarre les effets délétères consécutifs à l'ischémie cérébrale en diminuant l'expression de CHOP et de la caspase-12 (Qi et al. 2004). Dans ce modèle, les auteurs démontrent que le traitement au 4-PBA n'agit pas sur l'apoptose d'origine mitochondriale mais exerce son action protectrice via l'inhibition du stress du RE. Son administration chronique dans un modèle murin de Parkinson réduit les agrégats d'α-synucléine et inhibe la mort des neurones dopaminergiques. Cette augmentation de la survie cellulaire est accompagnée d'une réduction d'expression des marqueurs BiP et caspase-12 (Inden et al. 2007). De manière similaire, le 4-PBA exerce une action neuroprotectrice dans d'autres modèles murins de pathologies neurodégénératives comme les maladies d'Alzheimer

(Ricobaraza et al. 2009; Cuadrado-Tejedor et al. 2013), de Huntington (Gardian et al. 2005) et de Parkinson (Ono et al. 2009; Roy et al. 2012).

Bien que cela n'ait pas été formellement démontré, l'ensemble de ces études suggère que le 4-PBA agit comme une chaperonne chimique en inhibant l'agrégation protéique et en diminuant le stress du RE. De la même manière que les chaperonnes endogènes, le 4-PBA interagirait avec les domaines hydrophobiques des protéines mal conformées prévenant ainsi leur accumulation (figure 14). Cependant, il est possible que les mécanismes protecteurs du 4-PBA impliquent différents niveaux de régulations. Bien que le rôle de chaperonne semble primordial à l'effet bénéfique du 4-PBA (Mimori et al. 2013), il n'est pas exclu que le 4-PBA puisse agir en parallèle via une régulation directe de gènes protecteurs (figure 15) en inhibant l'activité des histones désacétylases (HDAC) par une interaction avec le site de liaison au zinc qui est essentielle pour l'action catalytique des HDAC de classes I et II (Mehnert et Kelly, 2007; Miller et al. 2011). De manière intéressante, il a notamment été démontré que l'activité transcriptionnelle et les niveaux protéiques de XBP1s et de BiP sont influencés directement par des phénomènes d'acétylation et de désacétylation (Wang et al. 2011).

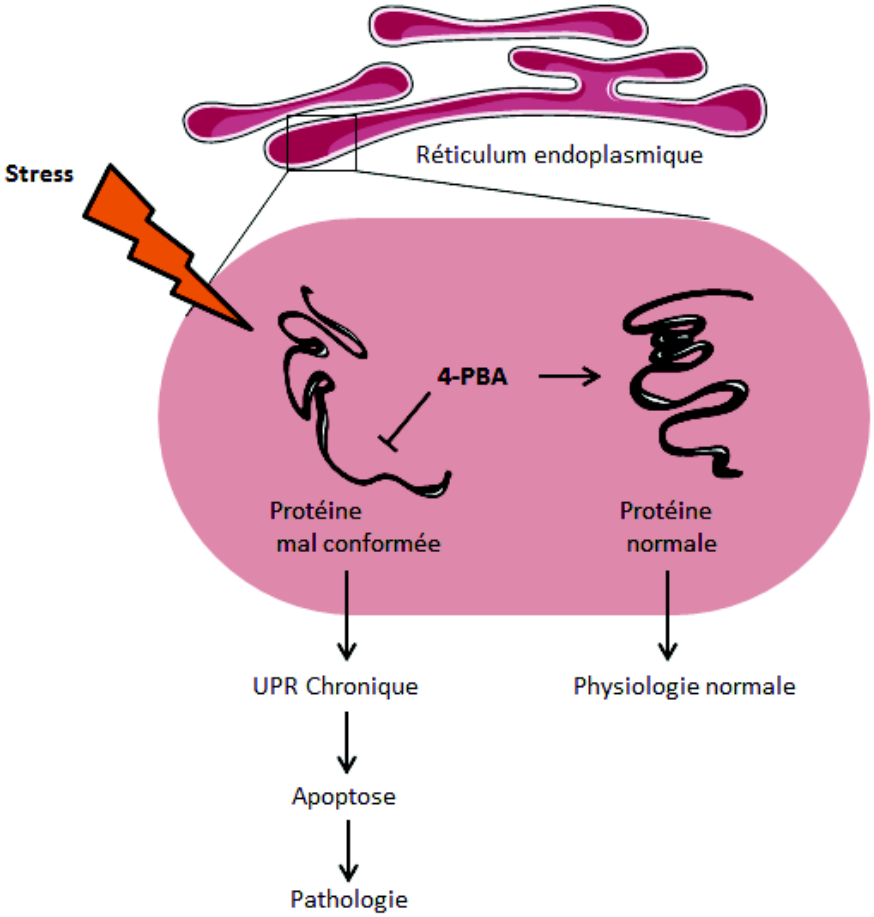

Figure 14 : Le mécanisme d'action supposé du 4-PBA implique sa capacité à interagir comme une chaperonne avec les domaines hydrophobes des protéines mal conformées, ce qui permet de réduire leur agrégation et de diminuer la réponse UPR.

Adapté de Kolb et al. (2015).

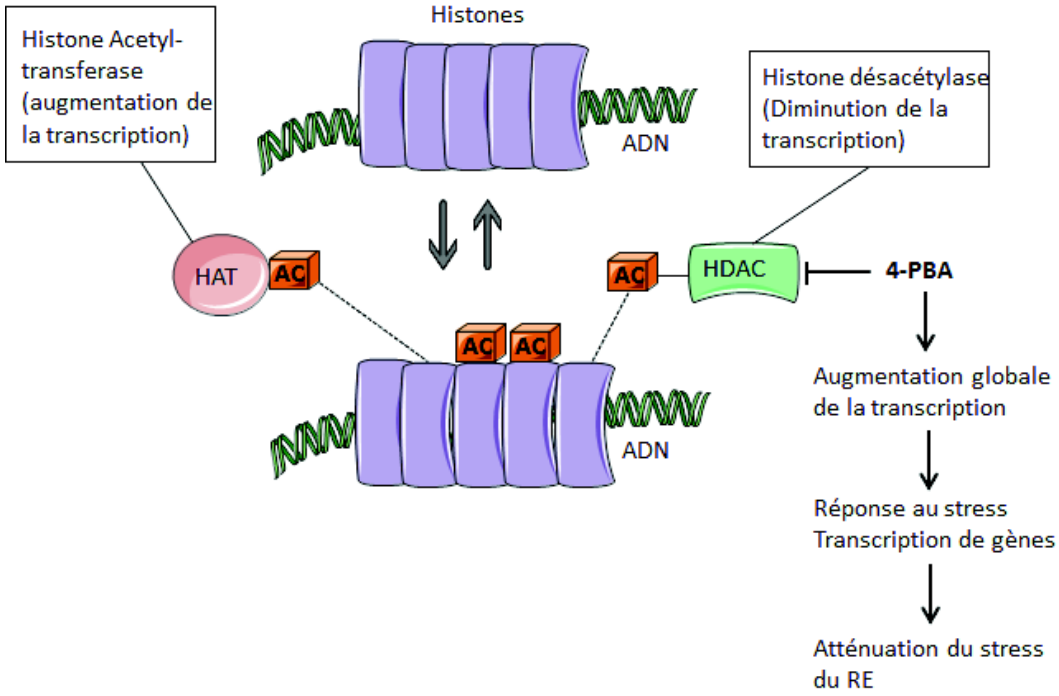

Figure 15: Le 4-PBA par son activité d'inhibiteur des histones désacétylases est susceptible d'agir sur le stress du RE en permettant la transcription de gènes pro-survie associés à la réponse adaptative de l'UPR.

Adapté de Kolb et al. (2015).

1.4.1.2 La rapamycine

Après détection des protéines mal conformées, l'UPR active les processus de dégradations des protéines mal conformées. La voie ERAD2 est connue pour dégrader les protéines en utilisant le mécanisme d'autophagie (voir chapitre 1.3.1). L'activation de l'autophagie par l'UPR participe au maintien de l'homéostasie et augmente la survie cellulaire (Ogata et al. 2006). Ainsi, une stratégie intéressante pour décharger la cellule des agrégats protéiques et empêcher le basculement vers les processus apoptotiques pourrait passer par la stimulation des voies de dégradations.

Dans le domaine du diabète, il a été démontré que le stress du RE joue un rôle important dans la résistance à l'insuline (Flamment et al. 2012). Ainsi, une augmentation du stress du RE associée à une diminution des mécanismes autophagiques a été mise en évidence dans le foie de souris résistantes à l'insuline (Wang et al. 2015). Dans cette étude, la restauration des mécanismes d'autophagie par la rapamycine (immunosuppresseur inhibiteur de la voie mTOR) protège le foie contre le stress du RE qui se traduit par une amélioration de la résistance à l'insuline. De manière similaire, un traitement à la rapamycine protège le foie de l'ischémie hépatique *in vitro* et *in vivo* par l'activation de l'autophagie et son effet inhibiteur sur le stress du RE a été mis en évidence par une diminution des marqueurs XBP1s, ATF4 et CHOP (Zhu et al. 2015). Par ailleurs, la rapamycine a démontré des effets protecteurs dans des modèles de pathologies neurodégénératives. La rapamycine réduit l'apoptose des neurones dopaminergiques *in vitro* et *in vivo* dans un modèle murin de la maladie de Parkinson (Malagelada et al. 2010). Une autre étude sur la maladie de Parkinson a démontré que l'induction d'un stress du RE de légère intensité active les mécanismes d'autophagie dans un but neuroprotecteur (Fouillet et al. 2012). Dans un modèle de la maladie d'Alzheimer, un traitement à la rapamycine réduit les taux de peptides amyloïdes Aβ42, se traduisant par une amélioration des performances cognitives (Spilman et al. 2010). Ces études démontrent que l'autophagie participe à la dégradation des protéines mal conformées et que sa stimulation par des molécules exogènes pourrait avoir des effets bénéfiques sur l'apoptose induite par le stress du RE.

1.4.2 Neurostéroïdes et stéroïdes neuroactifs

Le terme « stéroïde neuroactif » désigne tout type de stéroïde capable d'exercer une action sur le système nerveux. Ce terme regroupe ainsi les hormones stéroïdiennes, les neurostéroïdes ainsi que les stéroïdes de synthèse produits de manière exogène. Les hormones stéroïdiennes sont synthétisées dans les glandes endocrines, circulent dans le compartiment sanguin et atteignent leurs cibles à distance. Leur nature lipidique facilite la traversée de la barrière hémato-encéphalique, leur permettant d'atteindre le SNC où elles peuvent influencer son activité. Le terme neurostéroïde fait référence aux stéroïdes produits directement au sein du système nerveux et agissent par un mode autocrine ou paracrine. Leur synthèse s'effectue par les neurones et/ou les cellules gliales *de novo* à partir du cholestérol ou in *situ* à partir des métabolites circulants (figure 16). Des concentrations substantielles de neurostéroïdes restent détectables dans le système nerveux en l'absence des glandes stéroïdogènes classiques (Baulieu 1991; Mensah-Nyagan et al. 1999).

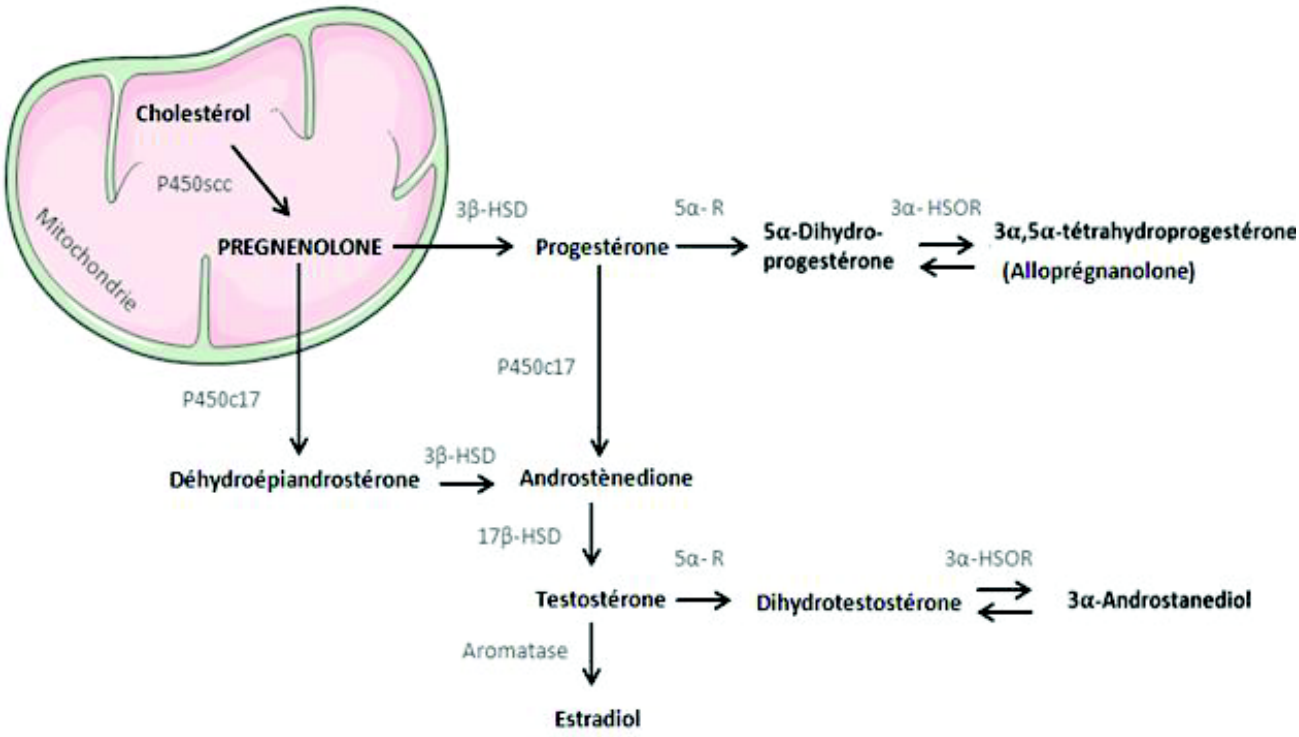

Figure 16 : Illustration schématique des étapes de biosynthèse des neurostéroïdes.

La conversion du cholestérol en prégnénolone par l'enzyme de clivage de la chaine latérale du cholestérol (P450scc) est l'étape limitante de leur biosynthèse. Une fois que la prégnénolone est produite, elle peut être convertie par des enzymes spécifiques pour permettre la synthèse des autres neurostéroïdes. P450c17, cytochrome P450c17; 3β-HSD, 3β-hydroxysteroid dehydrogenase; 5α-R, 5α-reductase; 3α-HSOR, 3α-hydroxysteroid oxidoreductase; 17β-HSD, 17β-hydroxysteroid dehydrogenase.

Adapté de Schaeffer et al. (2010).

Les stéroïdes neuroactifs exercent classiquement leurs effets par leur liaison à des récepteurs nucléaires spécifiques ce qui a pour conséquence de réguler l'expression génique. Ces récepteurs comprennent les récepteurs aux androgènes, aux œstrogènes, à la progestérone, aux glucocorticoïdes et aux minéralocorticoïdes (Beato et Klug 2000). Un autre récepteur, le pregnane xenobiotic receptor (PXR), a récemment été impliqué dans la réponse aux neurostéroïdes et notament à l'alloprégnanolone. Son activation serait impliquée dans l'homéostasie du cholestérol et la régulation de la production d'alloprégnanolone notamment au niveau de l'aire tegmentale ventrale (Frye et al. 2014). D'autre part, les stéroïdes neuroactifs ont la capacité d'induire des réponses très rapides au niveau du SN par leur liaison à divers récepteurs membranaires. Ainsi, les neurostéroïdes peuvent moduler l'activité des récepteurs GABA-A (Lambert et al. 2003), NMDA (Wang et al. 2007), sigma (Ueda et al. 2001), nicotiniques (Valera et al., 1992), des canaux calciques de type L et T (Luoma et al., 2011 ; Todorovic et Jevtovic-Todorovic, 2011) et des récepteurs membranaires de la progestérone ou mPR (Thomas et Pang 2012).

1.4.2.1 Stéroïdes neuroactifs et myéline

Les stéroïdes neuroactifs et notamment la progestérone et ses métabolites sont impliqués dans les processus de myélinisation et de remyélinisation du système nerveux. L'effet de la progestérone a tout d'abord été particulièrement étudié au niveau du SNP. Sa production locale favorise la remyélinisation des nerfs sciatiques après lésion (Koenig et al. 1995). La progestérone, dihydroprogestérone et l'alloprégnanolone stimulent l'expression des protéines de la myéline périphérique *in vivo* et *in vitro* (Melcangi et al. 1999). Cet effet est accompagné d'une réduction des anomalies morphologiques induites par le vieillissement dans les cellules de Schwann, suggérant un rôle protecteur de ces trois molécules (Melcangi et al. 2003). *In vitro*, l'expression du cytochrome P450scc et de la 3β-HSD dans les cellules de

Schwann est détectée pendant la phase active de myélinisation (Chan et al. 2000). La progestérone stimule la synthèse de myéline dans des co-cultures cellules de Schwann et de neurones en agissant de manière indirecte via l'activation de son récepteur nucléaire (Chan et al. 2000). L'activation du récepteur à la progestérone induit l'expression du facteur de transcription Krox-20 qui est indispensable à l'initiation de la myélinisation dans le SNP (Guennoun et al. 2001).

Dans le SNC, l'alloprégnanolone stimule la prolifération des cellules progénitrices PSA-NCAM+ donnant lieu aux progéniteurs oligodendrocytaires (voir chapitre 1.1.4.1) via un mécanisme passant par l'activation des récepteurs GABA-A (Gago et al. 2004). Il a été démontré que les pre-progéniteurs et les progéniteurs d'OL sont capables de synthétiser la progestérone, alors que les OL matures la convertissent de manière importante en dihyroprogestérone. Ceci suggère que cette dernière aurait un rôle plus important dans la régulation des fonctions oligodendrocytaires que la progestérone qui serait impliquée dans les stades plus précoces (Gago et al. 2001). La progestérone semble néanmoins pouvoir réguler les phénomènes de myélinisation. En effet, l'apport de progestérone dans des cultures organotypiques de cervelet augmente l'expression de la MBP via l'activation des récepteurs nucléaires (Ghoumari et al. 2003). Sa conversion en dihydroprogestérone et en alloprégnanolone semble partiellement impliquée dans les phénomènes pro-myélinisants. A noter que cet effet de l'alloprégnanolone passe par l'activation des récepteurs GABA-A, ce qui confirme leur implication dans la myélinisation (Ghoumari et al. 2003). En parallèle, la progestérone augmente la différenciation des OL *in vitro,* ce qui est mis en évidence par des changements morphologiques tels que l'augmentation des prolongements oligodendrocytaires (Marin-Husstege et al. 2004). *In vivo*, elle stimule la prolifération et la différenciation des OL induisant une augmentation de l'expression de PLP et favorisant la remyélinisation suite à une lésion de la moelle épinière (Labombarda et al. 2009) ainsi que dans un modèle de SEP

(Kashani et al. 2015). D'autres stéroïdes neuroactifs comme la testostérone et la dihydrotestostérone (DHT) ont démontré leur capacité à remyéliniser le SNC suite à une démyélinisation (Hussain et al. 2013).

1.4.2.2 Effets protecteurs des stéroïdes neuroactifs

En plus de leurs effets positifs sur la myélinisation et la re-myélinisation, les stéroïdes neuroactifs sont connus pour leurs effets protecteurs résultant de leurs propriétés anti-apoptotiques.

L'excitotoxicité est un processus qui est impliqué dans la dégénérescence des cellules dans de nombreuses pathologies neurodégénératives et qui induit l'apoptose par un excès de calcium intracellulaire. L'événement à l'origine de cette excitotoxicité est la stimulation de manière continue des récepteurs NMDA par les neurotransmetteurs excitateurs tels que le glutamate en réponse à des lésions cellulaires (Akwa et al. 2005). *In vitro*, l'alloprégnanolone et la déhydroépiandrostérone (DHEA) protègent les neurones de l'apoptose induite par excitotoxicité (Kimonides et al. 1998; Lockhart et al. 2002). L'alloprégnanolone réduit les mécanismes d'apoptose se traduisant par une diminution du relargage du cytochrome c, l'inhibition de la translocation de Bax et de la fragmentation de l'ADN (Xilouri et Papazafiri 2006). L'effet de la DHEA et de l'alloprégnanolone impliquent une augmentation de l'ARNm des sous-unités α1 et β1 du récepteur GABA-A. De manière intéressante, ces deux molécules augmentent la survie de cellules PC12 en contrôlant la transcription de Bcl-2 via l'activation des facteurs CREB et NFkB. Les cellules PC12 n'exprimant pas les récepteurs GABA-A, ceci suggère que leur effet anti-apoptotique implique ainsi différents modes d'actions (Charalampopoulos et al. 2004). Il a été démontré que la liaison de l'alloprégnanolone et de la DHEA aux récepteurs membranaires mPR pourrait être à l'origine de certains de leurs effets anti-apoptotiques « non-classiques » via l'activation de la voie MAPK (Pang et al. 2013).

Les effets bénéfiques de l'alloprégnanolone sur le stress oxydatif représentent un autre niveau de régulation des phénomènes apoptotiques. Dans la maladie de Niemman-Pick, on observe une diminution des taux de neurostéroïdes cérébraux; un traitement avec l'alloprégnanolone prolonge la durée de vie des souris et retarde l'apparition des premiers symptômes en augmentant la survie des cellules de Purkinje (Griffin et al. 2004). Cet effet neuroprotecteur semble impliquer sa capacité à diminuer la production de ROS ainsi que la peroxydation des lipides responsables de l'apoptose (Zampieri et al. 2009). De plus, l'alloprégnanolone et un analogue synthétique, le BR297, protègent les cellules SH-SY5Y en réduisant la production de ROS mitochondriale et cytosolique et en améliorant les mécanismes bio-énergétiques (respiration mitochondriale, production d'ATP) conduisant à une augmentation de la survie cellulaire (Lejri et al. 2017). L'effet bénéfique de ces deux composés semble indépendant de l'activation des récepteurs GABA-A. De manière intéressante, une action directe de l'alloprégnanolone sur la perméabilité mitochondriale pourrait être impliquée dans son effet anti-oxidatif. En effet, il empêche l'efflux de $Ca^{2}+$ consécutif à la perméabilisation des membranes mitochondriales empêchant ainsi le relargage du cytochrome-c dans le cytosol (Sayeed et al. 2009). Les effets protecteurs de la DHEA semblent aussi impliquer une inhibition du stress oxydatif, son action sur la kinase Akt est associée à une augmentation des défenses anti-oxydantes dans les cellules du foie de rat (Jacob et al. 2011).

A l'instar de la DHEA, la testostérone et l'œstradiol sont capables de moduler l'apoptose, jouant un rôle protecteur en augmentant la survie cellulaire dans le SN, notamment via leur impact sur le métabolisme énergétique et le stress oxydatif (Grimm et al. 2014; Grimm et al. 2016). L'activation du récepteur aux androgènes est connue pour induire une neuroprotection en stimulant la transcription de gènes pro-survie (Pike et al. 2008). Ainsi, un traitement avec la testostérone contrecarre l'apoptose des cellules musculaires C2C12 en

diminuant l'expression de Bax et le relargage du cytochrome c, empêchant ainsi la fragmentation de l'ADN induite par l'H_2O_2 (Pronsato et al. 2012). Son métabolite, la DHT empêche la mort des motoneurones dans un modèle de sclérose latérale amyotrophique (Yoo et Ko 2012). *In vitro*, la DHT protège les cellules gliales de l'apoptose via l'activation de la voie de signalisation PI3K /Akt qui diminue en aval l'expression de la protéine Bax et de la caspase-3 (Yao et al. 2016).

Les effets anti-apoptotiques de l'œstradiol semblent essentiellement être déterminés par son action protectrice contre le stress oxydatif (Nilsen et al. 2006; Nilsen 2008). Récemment, un mode de protection alternatif de l'œstradiol a été mis en évidence et fait intervenir une action contre le stress du RE dans des cellules pancréatiques via la diminution de l'expression des marqueurs BiP, CHOP, XBP1, ATF6, PERK et p-PERK alors que l'expression de Bcl-2 augmente (Kooptiwut et al. 2014). De manière intéressante, cet effet passe par l'activation de la voie Akt (Fu et al. 2014), une voie qui est connue pour être stimulée par la DHEA et la DHT. Ceci suggère que les effets protecteurs des stéroïdes neuroactifs peuvent potentiellement s'expliquer par leur capacité à contrecarrer le stress du RE (Dai et al. 2010).

1.5 Objectifs de la thèse

La maladie de Pelizaeus-Merbacher est une pathologie dysmyélinisante qui génère un handicap lourd pour lequel il n'existe à ce jour aucun traitement effectif. La souris jimpy qui est caractérisée par une perte oligodendrocytaire importante, représente un modèle animal pertinent pour l'étude préclinique de la PMD, des leucodystrophies ou des pathologies dysmyélinisantes (Sidman et al. 1964; Knapp et al. 1986; Duncan et al. 1989; Duncan et al. 2011). Toutefois, la durée de vie très courte des souris jimpy, le mode de transmission de la pathologie liée au chromosome X ainsi que les règles éthiques sur l'expérimentation animale ne facilitent pas leur utilisation intensive pour décrypter les mécanismes cellulaires et moléculaires déterminant les relations de cause à effet entre les mutations PLP et la mort oligodendrocytaire. Ainsi, dans le but de faciliter l'expérimentation visant le décryptage et l'élucidation des mécanismes physiopathologiques impliqués dans la PMD et les pathologies de la myéline, des travaux antérieurs ont permis d'immortaliser, à partir du SNC des souris jimpy et des souris normales (témoins), deux lignées d'OL dénommées respectivement OL 158JP (souris jimpy) et OL 158N (souris normales) (Feutz et al. 2001). Ces deux lignées oligodendrocytaires possèdent des caractéristiques d'OL matures mais les OL 158JP présentent des anomalies cellulaires, notamment un adressage membranaire défectueux de la PLP, un déficit du cycle cellulaire évoqué par un dysfonctionnement de la signalisation AMPc dépendante et une activation des facteurs cellulaires oxydants (Feutz et al. 2001; Ghandour et al. 2002; Baarine et al. 2009).

Les objectifs de ce travail de thèse ont donc été d'utiliser les lignées cellulaires OL 158JP et 158N pour résoudre les questions suivantes:

(i) déterminer les relations entre la mutation PLP et l'accélération de la mort oligodendrocytaire;

(ii) identifier les mécanismes ou processus endogènes facilitateurs de mort cellulaire qui prédominent dans le milieu intracellulaire des OL 158JP comparés aux OL 158N en s'intéressant plus particulièrement au stress du RE;

(iii) vérifier si l'inhibition ciblée (par des agents pharmacologiques appropriés) des mécanismes endogènes inducteurs de mort oligodendrocytaire peut améliorer *in vitro* la survie cellulaire et ouvrir des perspectives d'utilisation *in vivo* de ces agents pharmacologiques pour traiter efficacement les symptômes des souris jimpy.

2. Matériels et méthodes

2.1. Culture cellulaire

2.1.1. Lignée 158N et 158JP

Les cellules 158N et 158JP sont deux lignées d'oligodendrocytes immortalisées obtenues à partir de cultures secondaires provenant d'animaux Wild-type (158N) et Jimpy (158JP). Les oligodendrocytes en culture secondaire ont été transfectés à l'aide du plasmide $pMT_{wt}SVneo$ contenant l'antigène T du virus simien 40 (SV40) sous le contrôle du promoteur wild-type de la métallothionéine-I murine (Feutz et al., 2001).

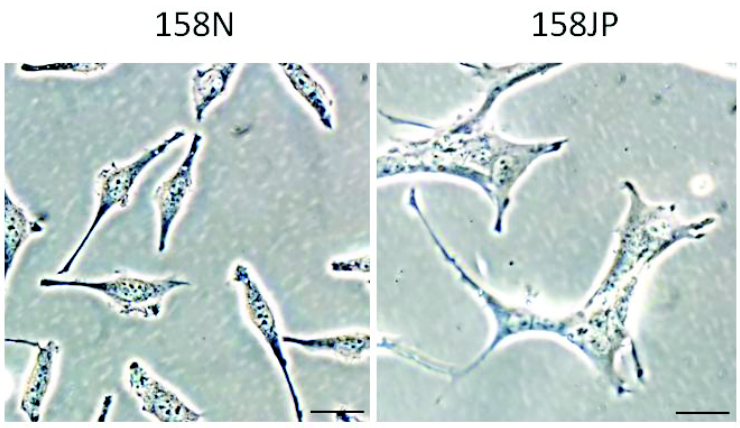

Figure 17 : Différences de morphologie des cellules 158N et 158JP.

Barre d'échelle = 20µm

2.1.1.1. Entretien des cellules en culture

Les deux lignées oligodendrocytaires 158N et 158JP sont cultivées à 37°C en atmosphère saturée en humidité et sous 5% de CO_2 dans du DMEM (Dubelcco's modified eagle medium) supplémenté en sérum de veau fœtal (5%), en glucose (4,5g/l) et en antibiotiques (streptomycine/pénicilline 0,5%).

L'entretien des cellules se fait de manière bihebdomadaire. La dissociation cellulaire est possible grâce à un milieu de dissociation non enzymatique (Sigma, St. Quentin, France) qui permet de détacher les cellules de leur support de culture et de les dissocier entre elles. Les cellules sont alors centrifugées à 500 g pendant 5min, le surnageant est éliminé et le culot est ensuite dilué dans une boite de culture contenant du milieu frais. Les cellules 158N sont ensemencées au 1/40ème et les cellules 158JP au 1/10ème. Les cellules sont maintenues en culture jusqu'à un nombre maximum de 15 passages afin d'éviter toute dérive génétique.

2.1.1.2 Congélation et décongélation des cellules

Pour préserver la lignée, les cellules à faibles passages sont stockées sous forme d'ampoules grâce à la conservation cryogénique. Le milieu de congélation se compose de DMEM supplémenté en glucose (4,5g/l), en antibiotiques (streptomycine/pénicilline 0,5%), en sérum de veau fœtal (20%) et en DMSO (5%). Le dimethylsulfoxide (DSMO) permet de protéger les cellules du choc thermique induit par une congélation rapide en abaissant le point de congélation de l'environnement cellulaire, permettant ainsi de ralentir la sortie d'eau intracellulaire et de prévenir la formation de cristaux pouvant porter atteinte à l'intégrité de la cellule.

Les cellules sont congelées quand la confluence de la boite de pétri atteint 90%. Le milieu de culture est changé 24h avant la congélation afin de congeler les cellules dans le meilleur état possible. Les cellules sont détachées à l'aide de milieu de dissociation non enzymatique (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin, France) puis centrifugées à 300g pendant 7min à température ambiante. Le culot est re-suspendu dans un cryotube adapté contenant du milieu de congélation. Les cryotubes sont ensuite placés pour la nuit dans de l'isopropanol à -80°C puis conservés à -80°C.

Pour décongeler les cellules, les ampoules sont placées directement dans un bain-marie à 37°C pour une décongélation rapide, ce qui favorise la survie des cultures cellulaires. Quand le milieu est à l'état liquide les cellules sont placées dans un flacon de culture contenant 5ml de milieu de culture préalablement maintenu à 37°C. Une exposition prolongée au DMSO étant néfaste pour les cultures cellulaires, le milieu est enlevé après adhésion des cellules au flacon et remplacé par 5ml de milieu frais.

2.1.1.3 Comptage cellulaire

Afin de connaitre et de contrôler le nombre de cellules utilisé dans les différentes expériences, les cellules sont comptées à l'aide d'un système automatisé TC20 (BioRad, Hercules, Etats-Unis). Après dissociation les cellules sont homogénéisées par un mélange vigoureux et dix microlitres de suspension cellulaire sont déposés sur des grilles de comptages (BioRad, Hercules, Etats-Unis) qui sont ensuite insérées dans l'appareil TC20. Trois comptages sont réalisés afin de déterminer un nombre moyen de cellules par millilitre. L'appareil possédant une gamme de concentration optimale allant de 1×10^5 à 5×10^6 cellules/ml, les suspensions cellulaires sont diluées ou concentrées de manière à donner un résultat proche du milieu de gamme.

2.1.1.4 Substances pharmacologiques

Les différentes molécules pharmacologiquement actives utilisées dans cette thèse ainsi que leur provenance sont référencées dans le tableau 2.

Modulateurs du stress du RE	Fournisseur
4-PBA	Sigma-Aldrich (Saint-Quentin, France)
Rapamycine	Alsachim (Alsace, France)
Tunicamycine	Sigma-Aldrich (Saint-Quentin, France)
Neurostéroïdes et antagonistes	**Fournisseur**
Allopregnanolone	Steraloids (Newport, USA)
17β-Œstradiol	Sigma-Aldrich (Saint-Quentin, France)
Progestérone	Sigma-Aldrich (Saint-Quentin, France)
5α-DHT	Sigma-Aldrich (Saint-Quentin, France)
DHEA	Sigma-Aldrich (Saint-Quentin, France)
Acétate d'ulipristal	Alsachim (Alsace, France)

Tableau 2 : Substances pharmacologiques utilisées

2.2 Tests de viabilité cellulaire

2.2.1 Test de viabilité MTT

La technique de MTT (bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium) est un test colorimétrique qui mesure la réduction du sel de tétrazolium (3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényl tetrazolium bromide) en formazan par la succinate déshydrogénase présente dans les mitochondries des cellules vivantes. Le formazan forme des cristaux de couleur bleue. Ainsi, après solubilisation des cristaux dans un solvant comme le DMSO, la mesure de l'absorbance à 570nm permet d'obtenir des valeurs d'absorbance directement proportionnelles aux nombres de cellules viables.

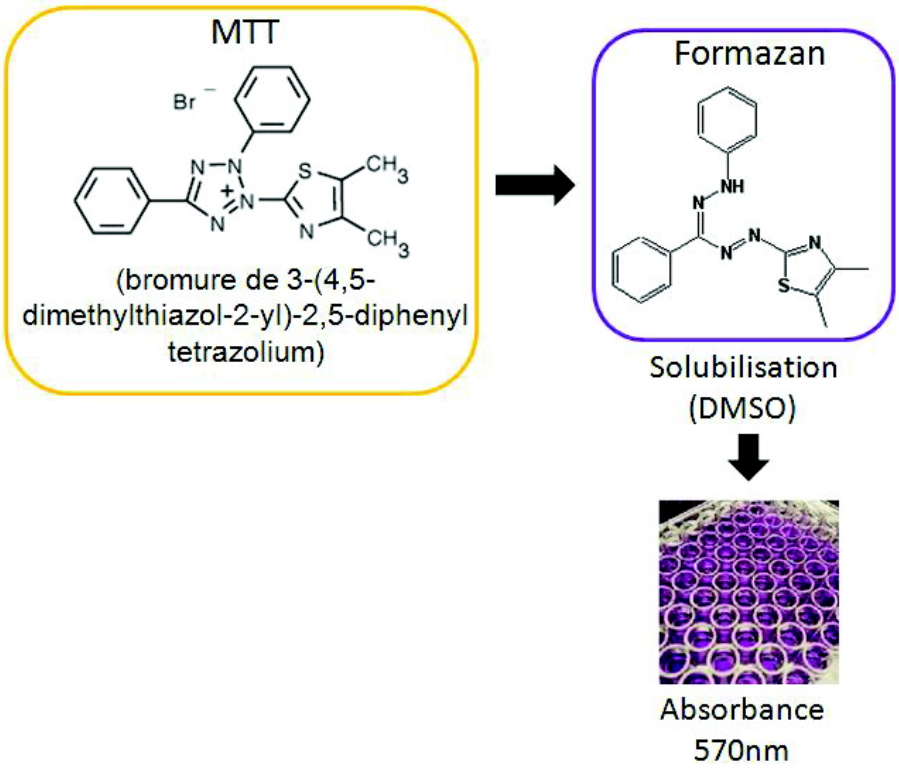

Figure 18 : Principe du test MTT.

Le MTT, un réactif de couleur jaune, est réduit par la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes en formazan. Le formazan forme un précipité de couleur violette dont l'absorbance est mesurée à 570nm. Un pourcentage de viabilité cellulaire peut être calculé par rapport à une culture de référence.

Mesure de la différence de viabilité entre 158N et 158JP

Les cellules 158N et 158JP sont ensemencées dans des plaques 96 puits à raison de 2000 cellules/puits et incubées pendant 24h, 48h et 72h à 37°C / 5% CO_2.

Mesure de la survie cellulaire lors de traitements par des agents pharmacologiques

Les cellules sont ensemencées dans des plaques 96 puits à raison de 1000 cellules/puits pour les 158N et 3000 cellules/puits pour les 158JP. Les cellules sont incubées à 37°C / 5% CO_2. Après 24h, le milieu de culture est changé par du milieu frais contenant les substances à tester.

Dans toutes les conditions le milieu de culture utilisé est du DMEM dépourvu de rouge de phénol afin de ne pas créer d'interférence avec les mesures colorimétrique. Le milieu est supplémenté en sérum de veau fœtal (5%, contrôlé sans stéroïdes détectables) glucose (4,5g/l), antibiotiques (streptomycine/pénicilline 0,5%) et glutamine (1%). Le MTT (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin, France) est ajouté à une concentration de 5mg/ml dans de l'eau distillée et laissé incuber 3h à 37°C / 5% CO_2. Le surnageant contenant le MTT est retiré et les cristaux de formazan contenus dans les cellules sont solubilisés dans 200µl de DMSO par puits. L'absorbance à 570nm est mesurée pour chaque puits grâce à un spectrophotomètre (Thermo Scientific, Villebon sur Yvette, France). L'absorbance du bruit de fond (correspondant aux réactifs sans cellule) est soustrait de chacune des absorbances mesurées. Le signal détecté pour chaque type cellulaire dans les conditions basales (absence de traitement) est arbitrairement placé à 100%.

2.2.2 Test de viabilité des cellules au Bleu de Trypan

Le test au bleu de trypan permet de distinguer la proportion de cellules vivantes et de cellules mortes dans une culture cellulaire. Ce test par exclusion repose sur le principe que les cellules vivantes sont capables d'expulser activement le colorant en dehors de leur cytoplasme

à l'inverse des cellules mortes qui garderont une teinte bleutée. Ainsi on distingue les cellules vivantes (incolores) des cellules mortes (colorées).

Mesure des différences de viabilité entre 158N et 158JP

Les cellules 158N et 158JP sont ensemencées dans une plaque 24 puits et incubées pendant 48h à 37°C / 5% CO_2.

Effets des traitements sur la survie cellulaire

Les cellules 158N et 158JP sont ensemencées dans une plaque 24 puits et incubées pendant 24h à 37°C / 5% CO_2. Après 24h, le milieu de culture est changé par du milieu frais contenant les substances à tester.

Les cellules sont détachées à l'aide de milieu de dissociation puis mélangées à un volume équivalent (v/v) de solution de bleu de trypan à 0,4% (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin, France). Dix microlitres de cette suspension cellulaire sont déposés sur les plaques de comptages et la coloration au bleu de trypan est analysée par l'appareil TC20 (BioRad, Hercules, Etats-Unis). Pour chaque puits, au moins deux comptages indépendants sont réalisés. Le pourcentage de survie cellulaire est calculé par le logiciel comme étant le nombre de cellules vivantes (incolores) divisées par le nombre de cellules totales (vivante et morte).

2.2.3 Xcelligence

Le système Xcelligence (ACEA Biosciences, San Diego, Etats-Unis) est un appareil permettant de mesurer en temps réel différents paramètres d'une culture cellulaire tels que l'adhésion, la prolifération, la viabilité ainsi que la morphologie. Le système est basé sur la mesure d'impédance des cellules grâce à des électrodes placées au fond des plaques de culture. Ainsi, il est possible d'évaluer les changements d'activités cellulaires à l'aide d'enregistrements successifs de leur impédance sur une période définie.

Les cellules 158JP sont ensemencées à 2000 cellules par puits dans des plaques 16 puits spécialisées (E-plate, ACEA Biosciences, San Diego, Etats-Unis) dans du DMEM en absence (témoins) ou en présence des substances testées. L'enregistrement est programmé pour mesurer l'impédance cellulaire toutes les 10min sur une période de 72h.

2.3 RT-qPCR

2.3.1 Extraction pour RT-qPCR

Les cellules confluentes à 80% sont détachées par grattage puis centrifugées à 500g pendant 5min. L'extraction se fait à l'aide du réactif NucleoZOL (Macherey-Nagel, Hœrdt, France). Le protocole consiste à lyser les cellules par homogénéisation du culot cellulaire avec le réactif NucleoZOL à raison de 10^7 cellules par ml de réactif. Les contaminants sont précipités en ajoutant au lysat 400µL d'eau ultrapure par ml de NucleoZOL. Les échantillons sont vigoureusement vortexés pendant 15sec puis laissés incuber 15min à température ambiante. Après une centrifugation de 15min à 12000g, les ARN sont prélevés et précipités à l'isopropanol pendant 10min à température ambiante. Une centrifugation de 10min à 12000g permet d'éliminer le surnageant et deux lavages à l'éthanol 75% sont réalisés. Enfin, l'ARN total est reconstitué dans 50µl d'eau ultrapure et les échantillons sont conservé à -80°C jusqu'à leur analyse.

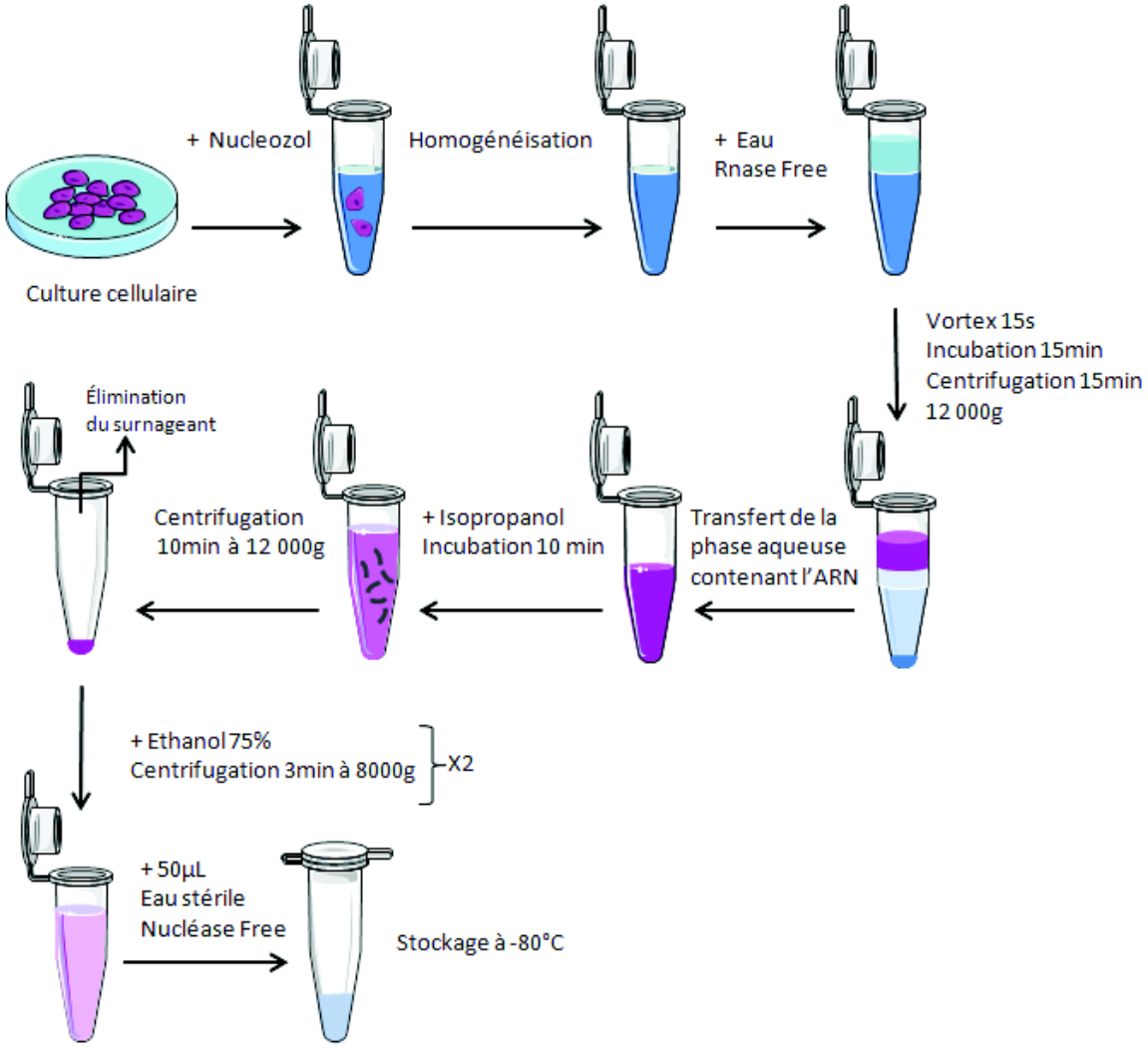

Figure 19 : Principe de l'extraction ARN au NucleoZOL.

2.3.2 Détermination de la quantité et de la qualité de l'ARN extrait

Les acides nucléiques sont quantifiés grâce à leur absorbance à 260nm (ultraviolet) détectée par spectrophotométrie. La concentration d'acide nucléique est déterminée selon la loi de Beer-Lambert : une mesure d'une unité d'absorbance à 260nm est considérée comme égale à une concentration de 40µg/ml d'ARN. Afin de vérifier la pureté des acides nucléiques, les DO à 280 et 260 nm sont mesurées en parallèle. En effet, le ratio 260/280 nm est utilisé pour détecter la contamination en protéines. Les ARN sont considérés de bonnes qualités

lorsque le rapport $DO_{260\ nm}/DO_{280\ nm}$ est supérieur à 1,7. Le ratio 260/230nm est un deuxième indicateur de pureté mesurant les contaminants absorbant à 230nm (comme par exemple le phénol). L'ARN est considéré comme pur quand le ratio est compris entre 2,0 et 2,2. Chaque échantillon est analysé deux fois à une dilution de 1/50 en déposant 2µL dans le système µdrop (Thermo Scientific, Villebon sur Yvette, France) qui est analysé au spectrophotomètre (Thermo Scientific, Villebon sur Yvette, France).

2.3.3 Transcription inverse

L'ADN complémentaire (ADNc) qui va servir de base d'amplification pour la PCR quantitative (qPCR) est obtenu à partir de l'ARN par transcriptase inverse à l'aide du kit iScript (BioRad, Hercules, Etats-Unis).

La transcription inverse est réalisée à partir d'1µg d'ARN selon les proportions suivantes :

iScript RT supermix	4µl
ARN (1µg)	Variable
H_20 sans nucléase	Variable
Volume total :	20µl

Le mix est incubé dans le thermal iCycler (BioRad, Hercules, Etats-Unis) selon la réaction suivante :

Initiation	5min à 25°C
Transcriptase reverse	30min à 42°C
Inactivation	5min à 85°C

Les produits de transcription inverse sont conservés à -80°C jusqu'à la réalisation de la RT-qPCR

2.3.4 PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR)

Dans la PCR classique, les échantillons sont amplifiés et quantifiés en un point final après migration et coloration sur gel d'agarose. La PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR) permet de suivre dans le temps l'accumulation du produit amplifié. La PCR en temps réel est possible grâce à l'insertion d'une molécule fluorescente dans l'ADN : la quantité de fluorescence émise est alors proportionnelle à la quantité de fragments d'ADN (amplicons) présents dans l'échantillon. Dans cette thèse, le marqueur fluorescent SYBR green (BioRad, Hercules, Etats-Unis), qui émet sa fluorescence en se liant à l'ADN double brin, a été utilisé. Les oligonucléotides sens et antisens utilisés sont indiqués dans le tableau 3.

Gène	Sens	Séquences 5'-3'	Fournisseur
BAX	Sens	CCAGGATGCGTCCACCAAGA	Eurogentec (Liège, Belgique)
	Antisens	GGTGAGGACTCCAGCCACAA	
BCL-2	Sens	CTCGTCGCTACCGTCGTGACTTCG	Eurogentec (Liège, Belgique)
	Antisens	CAGATGCCGGTTCAGGTACTCAGTC	
CHOP	Sens	TTCTCTGGCTTGGCTGACTGA	Eurogentec (Liège, Belgique)
	Antisens	TGGTCTTCCTCCTCTTCCTCCT	
XBP1u	Sens	ACTCAGACTACGTGCACCTCTGCA	Eurogentec (Liège, Belgique)
	Antisens	GAGAAAGGGAGGCTGGTAAGGAAC	
XBP1s	Sens	GGCTCGAATGAGTGAGCTGGAACA	Eurogentec (Liège, Belgique)
	Antisens	CAACTGGGCCTGCACCTGCT	
BiP		Non spécifié par le fournisseur	(BioRad, Hercules, Etats-Unis)
HMBS	Sens	CTGGGCTCCTCTTGGAATG	Eurogentec (Liège, Belgique)
	Antisens	GATGGGCAACTGTACCTGACTG	
β-Actine	Sens	TGACCCAGATCATGTTTGAG	Eurogentec (Liège, Belgique)
	Antisens	TAATGTCACGCACGATTTCC	

Tableau 3 : Séquences des oligonucléotides.

Pour valider des données obtenues, une gamme standard est établie par des dilutions successives d'ADNc de manière à englober toute la gamme de concentration potentielle des échantillons à analyser. De plus, la spécificité des produits de RT-qPCR est vérifiée par une analyse des courbes de fusion obtenues permettant l'identification d'un pic unique qui caractérise de manière spécifique chacun des gènes étudiés.

Le programme d'amplification est réalisé par l'iCycler (BioRad, Hercules, USA) selon un protocole décrit dans le tableau 4 :

Dénaturation initiale et activation de la polymérase :	95°C	2 min	1 cycle
Dénaturation :	95°C	5 sec	39 cycles
Hybridation/Elongation :	60°C	30 sec	
Courbe de fusion :	65-95°C (incrémentation 0,5°C)	5sec/étapes	1 cycle

Tableau 4 : Programme d'amplification des fragments d'ADN réalisé par l'iCycler.

Les quantités relatives du gène d'intérêt sont analysées à l'aide du logiciel Bio-Rad CFX Manager (version 3.1). Tous les échantillons sont mesurés en triplicats et normalisés par rapport au gène de référence HMBS ou β-Actine.

2.4 Analyses protéiques

2.4.1 Extraction protéique

Les cellules confluentes à 80% sont détachées par grattage puis centrifugées à 500g pendant 5min. Le surnageant est éliminé et chaque culot cellulaire est re-suspendu dans 150µl de tampon de lyse RIPA (Thermo Scientific, Villebon sur Yvette, France) contenant une tablette de *cOmplete® Protease inhibitor* (Roche, Mannheim, Allemagne) pour 10ml de tampon RIPA. Les échantillons sont gardés sur glace pendant 1h avec une agitation par vortex toutes les 10min. Une centrifugation à 12000g pendant 45min à 4°C est effectuée afin d'éliminer les précipités. Le surnageant est récupéré pour analyse.

2.4.2 Mesure de la concentration en protéine

La méthode BCA, *BiCinchoninic acid Assay*, (Smith et al. 1985) est un test colorimétrique permettant de doser la quantité de protéines présente dans un échantillon relativement à une gamme d'étalonnage de quantité connue de BSA (Albumine de Sérum Bovin). Le principe de la méthode repose sur la réduction en milieu alcalin des ions cuivriques Cu^{2+} en Cu^{+} par les protéines. L'acide bicinchoninique (BCA) est un réactif spécifique du Cu^{+} qui forme une coloration pourpre ayant une absorbance maximale à 562nm et dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de protéine présente dans l'échantillon. La concentration en protéine des échantillons est calculée grâce à une courbe de référence allant de 0 à 2µg/ml de BSA.

Les échantillons à mesurer sont préparés à deux dilutions de 1/10 et 1/20 dans de l'eau ultrapure. La gamme d'étalonnage est obtenue à partir d'un kit BCA (Interchim, Montlucon, France). Le réactif BCA est préparé en ajoutant 1 part de réactif B (solution d'acide

bicinchoninique) à 50 parts de réactif A (solution de soude à 0,1N). Dans une plaque 96 puits, 25µl de standards et d'échantillons sont déposés en triplicats. 200µl de BCA sont ajoutés dans chaque puits, la plaque est incubée 30 min à 37°C et l'absorbance à 562nm est mesurée au spectrophotomètre (Thermo Scientific, Villebon sur Yvette, France). La gamme d'étalonnage est construite à partir des standards et permet de calculer les concentrations de chacun de nos échantillons inconnus.

2.4.3 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE)

Le SDS-PAGE est une technique permettant la migration des protéines à travers un gel de polyacrylamide afin de les séparer en fonction de leur taille. Le principe de cette technique est basé sur la dénaturation de la conformation protéique et l'ajout de charge négative due à la présence de SDS (sodium dodécyl sulfate), un agent dénaturant possédant une extrémité chargée négativement. Ainsi, les protéines déposées sur le gel vont pouvoir migrer par l'application d'un courant électrique allant de la cathode vers l'anode.

Les protéines (45µg) sont déposées dans des gels 4-20% (TGX SDS pre-casted polyacrylamide gels, BioRad, Hercules, USA). Les protéines sont diluées dans un tampon Laemmli (BioRad, Hercules, USA) contenant du β-mercaptoéthanol comme agent réducteur permettant de couper les ponts disulfures responsables du repliement des protéines. Avant l'électrophorèse, les échantillons sont chauffés à 95°C pendant 5min. Un marqueur de poids moléculaire est déposé des deux côtés du gel afin de confirmer la taille des protéines révélées par la suite (Precision Plus Protein Dual color standard, BioRad, Hercules, Etats-Unis). La migration électrophorétique est réalisée grâce à un courant de 180mV et un tampon de migration contenant du Tris/glycine/SDS (BioRad, Hercules, Etats-Unis).

2.4.4 Western blot

La partie Western blot réfère à la migration des protéines sur une membrane permettant leur révélation et quantification à l'aide de technique d'immunomarquage. Pour cela les protéines qui ont migré à travers le gel de polyacrylamide grâce à la technique de SDS PAGE vont devoir être transférées sur un support plus adapté permettant de révéler les protéines d'intérêt à l'aide d'anticorps spécifiques. Ce support est une membrane de polyfluorure de vinylidène (PVDF) qui possède une haute affinité de liaison avec les protéines assurant ainsi une qualité de transfert optimale.

2.4.4.1 Transfert semi-sec

Afin de procéder au transfert des protéines contenues dans le gel de polyacrylamide sur la membrane de PVDF, la technique de transfert « semi-sec » est adoptée. Pour cela, deux piles de papier filtre sont enduites de tampon de transfert. La membrane de PVDF est activée pendant 5min dans l'éthanol absolu avant réalisation du transfert. Ensuite, la membrane et le gel contenant les protéines sont placés en « sandwich » entre les piles de papier filtre qui sont déposées en contact direct avec les deux électrodes de la cassette de transfert. La membrane de PVDF est placée le plus proche de l'anode et le gel du côté de la cathode. La cassette est ensuite insérée dans le système de transfert Transblot Turbo system (BioRad, Hercules, Etats-Unis) et l'intensité du courant appliqué est réglé en fonction du poids moléculaire de la protéine d'intérêt.

Poids moléculaire (kDa)	Temps (min)	Courant
>150	10	2.5A constant, jusqu'à 25V
<30	5	
5-150	7	

Tableau 5 : Protocole de transfert des protéines du gel vers la membrane de PVDF en fonction du poids moléculaire de la protéine.

2.4.4.2 Système de quantification « stain free » et immuno-detection

Afin de procéder à l'immuno-détection des protéines d'intérêt la membrane est incubée pendant 1h à température ambiante dans une solution de bloquant afin de saturer les sites aspécifiques. La membrane est incubée toute la nuit à 4°C dans l'anticorps primaire (dirigé contre la protéine d'intérêt) dilué dans la solution de bloquant.

Le lendemain, la membrane est lavée trois fois 5 min dans une solution de lavage TBS-Tween 0,1% (TBS-T) puis incubée 1h à température ambiante dans l'anticorps secondaire conjugué à la peroxydase, également dilué dans la solution de bloquant. Après 3 nouveaux lavages de 5min dans du TBS-T, la protéine d'intérêt est révélée grâce à l'ajout du substrat de révélation chemiluminescent (Clarity Western electrochemoluminescence substrate, BioRad, Hercules, Etats-Unis). Le substrat en présence de l'enzyme produira une réaction luminescente qui sera quantifiée par le détecteur ChemiDoc MP (Biorad, Hercules, CA, USA).

La méthode de normalisation classique du Western Blot consiste à révéler une protéine de référence en parallèle de la protéine d'intérêt par la même méthode d'immuno-détection. La protéine de référence sert de contrôle interne à l'expérience et permet de s'assurer (i) que la même quantité de protéine a été déposée dans chaque puits ; (ii) que le transfert a été effectué avec la même efficacité pour tous les échantillons et enfin (iii) que l'incubation avec les anticorps a été répartie de façon homogène sur toute la membrane. Pour être un bon contrôle interne, la protéine de référence doit répondre à différents critères et ne doit notamment pas être influencée par les différentes conditions d'expérimentation. Une méthode alternative est la technique de quantification par protéines totales grâce à la méthode d'imagerie « *stain-free* ». L'imagerie *stain-free* utilise le gel de polyacrylamide pour exacerber la fluorescence des acides aminés tryptophanes présents dans les protéines grâce à une brève photoactivation. Ceci permet de visualiser directement l'ensemble des protéines présentes à chaque étape de l'électrophorèse et du western blot. Cette technique permet de normaliser directement le signal de la protéine d'intérêt sur la quantité de protéines totales contenue dans l'échantillon, donnant lieu à une quantification plus précise et plus sensible qui s'affranchit des variations des techniques immunochimiques (Gurtler et al. 2013).

L'intensité des bandes et la quantification du ratio protéine d'intérêt/protéines totales est calculée à l'aide du logiciel Image Lab (BioRad, Hercules, Etats-Unis).

Anticorps primaire				
Anti Bax	lapin	Santa Cruz (Dallas, Etats-Unis)	sc-6236	1/800
Anti Bcl-2	souris	Santa Cruz (Dallas, Etats-Unis)	sc-509	1/200
Anti BiP	lapin	Enzo life science (Farmingdale, Etats-Unis)	ADI-SPA-826	1/1000
Anti CHOP	lapin	Santa Cruz (Dallas, Etats-Unis)	sc-793	1/1000
Anticorps secondaires				
Anti lapin IgG HRP	chèvre	Abliance (Compiège, France)	BI 2407	1/1000
Anti souris IgG HRP	chèvre	Abliance (Compiège, France)	BI 2413C	1/1000

Tableau 6 : Liste des anticorps utilisés dans les analyses Western blot.

2.5 Cytométrie en flux

La proportion de cellules apoptotiques dans les cultures 158N et 158JP a été mesurée par cytométrie de flux en utilisant (i) l'annexine-V combinée au marqueur phycoérythrine (PE) et l'iodure de propidum (eBioscience, Paris, France) et (ii) l'inhibiteur ATAD-FMK qui

se lie à la caspase-12 activée et marquée à la fluorescéine (FITC) (caspILLUME, GeneTex, Irvine, Etats-Unis).

2.5.1 Marquage de l'Annexine-V et à l'iodure de propidium

Les cellules 158N et 158JP sont détachées à l'aide de milieu de dissociation, centrifugées pendant 10min à 500g puis lavées dans du PBS avant d'être re-suspendues dans un tampon de liaison (Binding buffer, eBioscience, Paris, France) à une densité de 10^6 cellules par ml. Les cellules sont alors incubées avec l'annexine V-PE pendant 10min à température ambiante. Après un lavage au PBS l'IP est ajouté à une concentration de 20µg/ml dans chaque échantillon.

2.5.2 Marquage de la Caspase-12 activée

Les cellules 158N et 158JP sont détachées à l'aide de milieu de dissociation, centrifugées pendant 10min à 500g puis re-suspendues dans du PBS à une densité de 10^6 cellules par ml. Les cellules sont alors incubées avec le FITC-ATAD-FMK pendant 30min à 37°C sous une atmosphère de 5% de CO_2 puis lavées deux fois au PBS.

2.5.3 Analyse par le cytomètre de flux

Pour chaque expérience en cytométrie de flux, 10 000 cellules ont été analysées par échantillon avec un cytomètre de flux BD Accuri™ C6 Plus, (Bioscience, Montana, Etats-Unis). Les données ont été analysées à l'aide du logiciel BD Accuri C6.

2.6 Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant le programme GraphPad-Prism (GraphPad-Prism, San Diego, Etats-Unis). Toutes les données sur les graphiques représentent la moyenne ± l'erreur type (SEM). Les différences statistiques entre deux moyennes sont déterminées par un test *t* de Student. Les différences statistiques entre plus de deux moyennes sont déterminées à l'aide d'une ANOVA à un ou deux facteurs et complétées par un test post-hoc de Tukey. Les différences sont estimées significatives à partir d'un $p< 0,05$. Les valeurs DE_{50} de l'effet de la tunicamycine ont été déterminées par une régression non linéaire de type dose-effet par inhibition et ayant une pente variable. La bonne corrélation entre la prédiction mathématique et les points expérimentaux est déterminé par le coefficient de corrélation au carré ayant une valeur $r^2 >0,7$.

3. Résultats

3.1 Effets de la mutation PLP sur la survie des OL 158JP

3.1.1 Diminution de la viabilité des OL 158JP par rapport aux OL contrôles 158N

Les tests MTT et bleu de Trypan ont été réalisés pour comparer la viabilité des OL 158JP et 158N. L'analyse de l'absorbance du formazan nous a permis de démontrer que les cellules 158N possèdent une activité mitochondriale plus importante que celle des cellules 158JP à 48h et 72h après ensemencement (figure 20, A). Etant donné que le test MTT ne mesure que le pourcentage de cellules vivantes, le test d'exclusion au bleu de trypan a été utilisé pour déterminer à la fois les pourcentages de cellules vivantes et de cellules mortes. Une augmentation significative (p<0,0001) du nombre de cellules mortes a été mise en évidence dans les cultures d'oligodendrocytes 158JP (49,38% ± 1,824, n=12) comparées aux 158N (17,67% ± 1,539, n=12). Ainsi, il apparait que la diminution de l'activité mitochondriale retrouvée chez les 158JP ne soit pas uniquement le reflet d'un retard du cycle cellulaire mais atteste aussi d'une augmentation de la mort cellulaire induite par la mutation JP (figure 20, B).

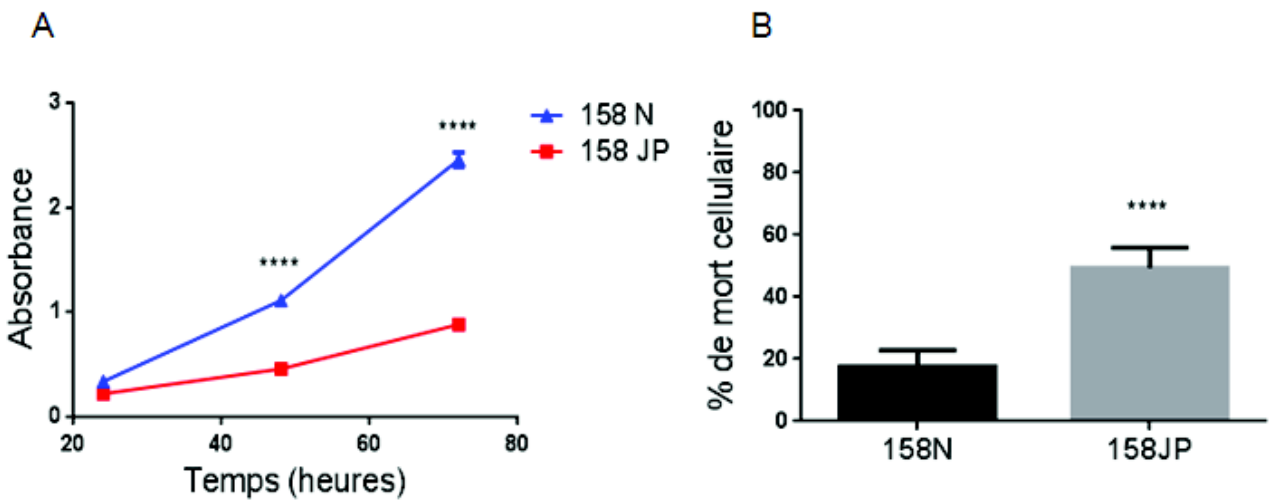

Figure 20 : Illustration de la baisse de viabilité et de l'augmentation de la mortalité dans les cultures d'OL 158JP comparées aux cultures d'OL contrôles 158N.

(A) Etude cinétique de la viabilité cellulaire des OL 158N (▲) et 158JP (■). Le test de réduction MTT a été utilisé pour déterminer la viabilité/survie des cultures des deux lignées cellulaires à 24, 48 et 72h (n=8, ANOVA : Interaction facteur lignée x facteur temps $F_{(2, 42)}$=168,2, $p < 0,0001$, suivie de post hoc Tukey, ****$p < 0,0001$). (B) Le test au bleu de trypan a été réalisé afin de calculer le pourcentage effectif de cellules mortes dans les cultures 158N et 158JP (n=12, $t_{(23)}$=13,18, ****$p < 0,0001$). Les valeurs représentent la moyenne + SEM.

3.1.2 La diminution de viabilité des OL 158JP est corrélée à l'activation des mécanismes d'apoptose

La combinaison de la cytométrie en flux avec un double marquage Annexine-V et iodure de propidium (IP) nous a permis d'identifier le mécanisme induisant l'augmentation de la mortalité cellulaire observée chez les OL 158JP. Nous avons observé 8,5% vs. 15,6% de cellules en phase précoce d'apoptose et 14% vs. 33,5% de cellules en phase tardive d'apoptose respectivement dans les cultures 158N et 158JP (figure 21). Le pourcentage de

cellules nécrotiques reste similaire et constant entre les deux lignées cellulaires (8,9% vs. 7,9%).

La combinaison des expériences de RT-qPCR et Western blot a révélé que les ratios des concentrations d'ARNm et de protéines des marqueurs endogènes clefs de l'apoptose Bax(pro-apoptotique)/Bcl-2(anti-apoptotique) sont plus élevés dans les OL 158JP (figure 22). De manière intéressante, nous avons observé que l'expression du marqueur anti-apoptotique Bcl-2 est extrêmement faible au point qu'il ne dépasse pas le seuil de détection des analyses en Western blot (figure 22, B). L'ensemble de ces résultats suggère que la mutation JP activerait les processus d'apoptose qui provoquent secondairement une diminution de la viabilité des OL 158JP.

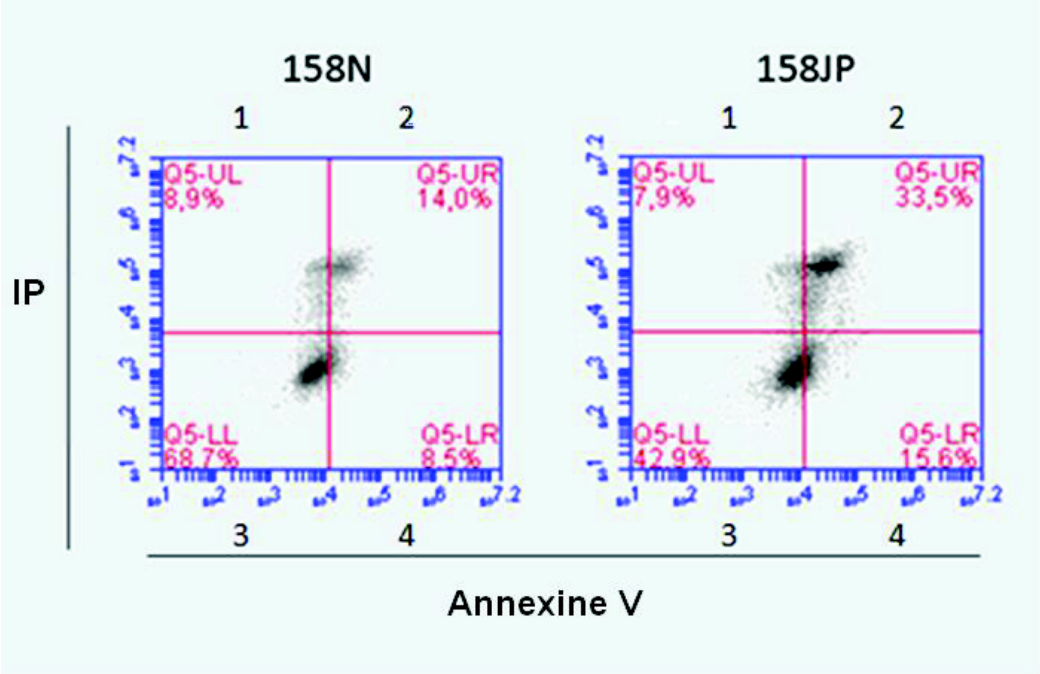

Figure 21: Evaluation qualitative de l'apoptose dans les cellules 158JP et 158N par cytométrie de flux.

L'intensité du marquage IP est représentée sur l'axe des ordonnées (y) et celle de l'annexine V sur l'axe des abscisses (x). Le premier quadrant représente les cellules nécrotiques, le quadrant 2 les cellules apoptotiques tardives et/ou nécrotiques, le quadrant 3 les cellules vivantes et le quadrant 4 les cellules apoptotiques précoces.

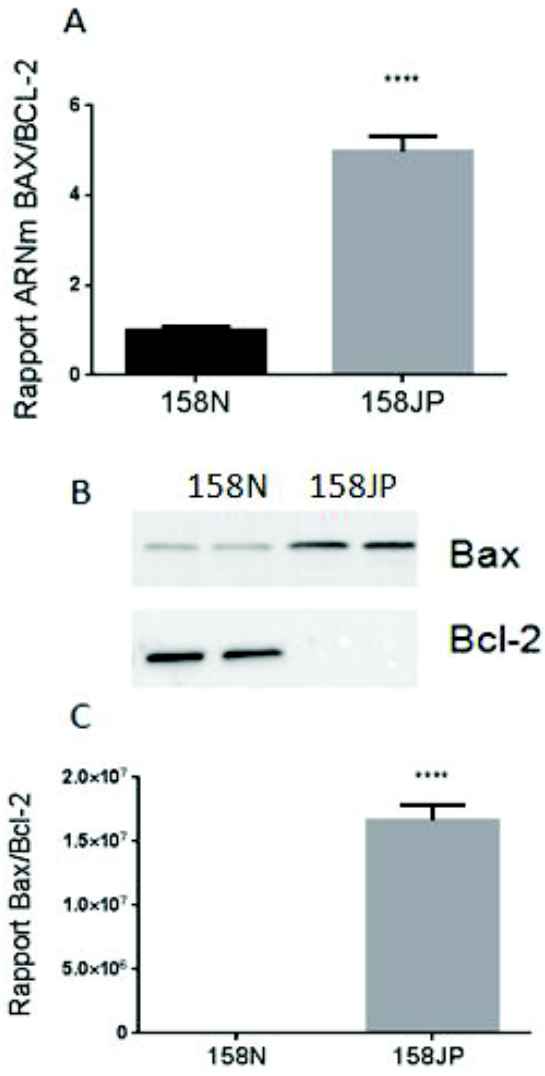

Figure 22: Evaluation des niveaux endogènes des marqueurs de l'apoptose dans les cellules 158N et 158JP.

(A) Analyses RT-qPCR du rapport des concentrations en ARNm de Bax/Bcl-2 dans les cellules 158N et 158JP (n=12, $t_{(22)}$=14,68, ****p < 0,0001). (B) Image du western blot et (C) semi-quantification du rapport protéique Bax/Bcl-2 dans les cellules 158N et 158JP ; la concentration de protéines totales est utilisée comme contrôle (n=8, $t_{(14)}$=21,10, ****p < 0,0001). Les valeurs représentent la moyenne + SEM.

3.1.3 Mise en évidence d'un niveau basal élevé de stress du RE dans les OL 158JP

Pour vérifier si l'augmentation de l'apoptose induite par la mutation JP dans les OL 158JP résulte de l'activation du stress du RE consécutive à l'accumulation de la PLP, nous avons mesuré les niveaux endogènes des marqueurs du stress du RE dans les lignées cellulaires 158N et 158JP.

La chaperonne BiP est un marqueur du stress du RE qui se lie aux protéines mal conformées. BiP est responsable de l'activation de la réponse UPR (voir chapitre 1.3.2). Nous avons alors mesuré les concentrations d'ARNm et de protéine de BiP dans les OL 158N et 158JP. Nos résultats montrent une augmentation significative des ARNm et de la protéine BiP dans les cellules 158JP comparées aux 158N (figure 23).

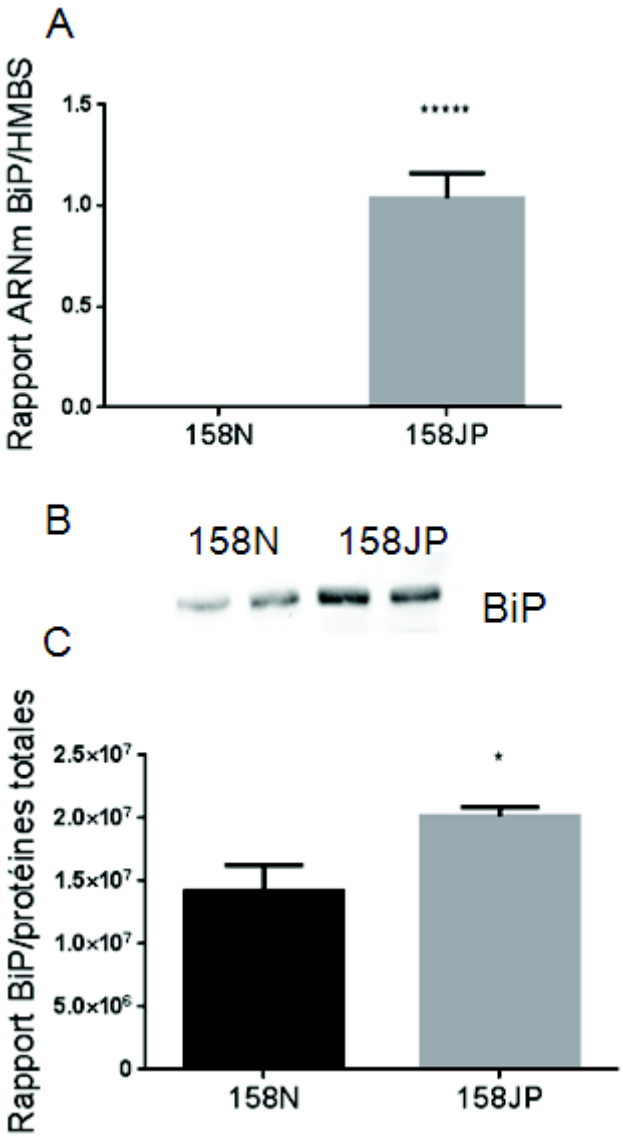

Figure 23 : Evaluation des niveaux endogènes de stress du RE dans les OL 158N et 158JP.

(A) Analyses en RT-qPCR des concentrations d'ARNm codant la protéine BiP dans les cellules 158N et 158JP (n=12, $t_{(22)}$=8,302, ****$p < 0,0001$). (B) Image du western blot et (C) semi-quantification des concentrations de la protéine BiP dans les cellules 158N et 158JP ; la concentration de protéines totales est utilisée comme contrôle (n=8, $t_{(14)}$=2,718, *$p < 0,05$). Les valeurs représentent la moyenne + SEM.

Nous avons également évalué l'expression de l'ARNm de XPB1, un marqueur des phénomènes adaptatifs dans les OL 158N et 158JP. De manière intéressante, l'expression de la forme épissée de XBP1 (XPB1s) est réduite dans les OL 158JP comparativement aux 158N, ce qui traduit un dépassement des phénomènes adaptatifs dans les cellules 158JP (figure 24).

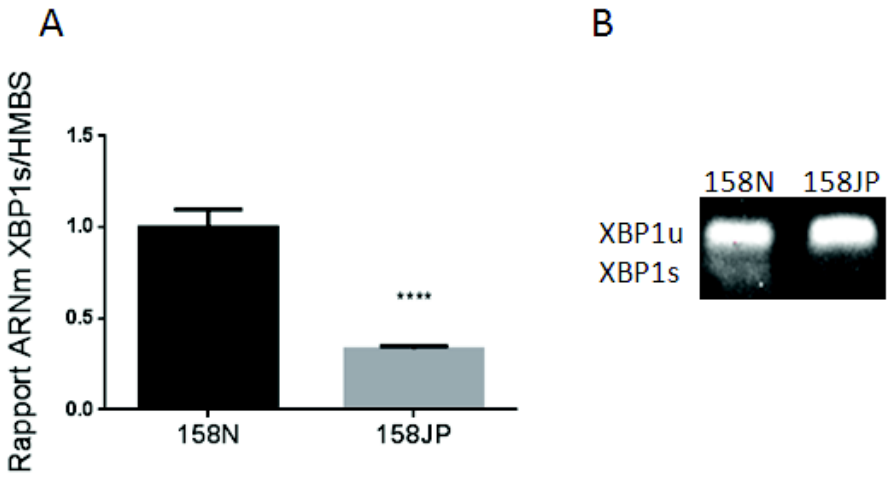

Figure 24: Evaluation quantitative (A) et quantitative (B) de l'expression de l'ARNm de XBP1s dans les cellules 158N et 158JP (n=12, $t_{(22)}$=6,687, ****$p < 0{,}0001$). Les valeurs représentent la moyenne + SEM.

En plus des marqueurs BiP et XPB1s, nous avons mesuré les niveaux d'ARNm et les concentrations protéiques de CHOP qui est considéré comme un marqueur de la voie apoptotique induite par l'UPR. De manière surprenante, nous avons trouvé que la concentration d'ARNm codant CHOP est plus faible dans les cellules 158JP comparées aux 158N (figure 25, A) alors que nous observons une augmentation de la concentration de la protéine CHOP dans les OL 158JP par rapports aux 158N (figure 25, B et C). Nous avons alors réalisé une série d'expériences pour nous assurer qu'il existe bien une corrélation

positive entre les niveaux élevés du stress du RE et d'ARNm codant CHOP. Nous avons exposé les cellules 158N et 158JP à la tunicamycine, qui est un activateur du stress du RE. Nous avons alors observé que la tunicamycine induit une diminution dose-dépendante de la viabilité des deux lignées cellulaires 158N et 158JP (figure 26). Cependant, la dose de tunicamycine nécessaire pour tuer 50% des cellules (DE_{50}) après 20h de traitement est de 0,1356 ± 0,007 pour les 158N et de 0,0020 ± 0,0001 µg/m pour les 158JP, soit une DE_{50} pour les OL 158JP environ 67 fois inférieure à la DE_{50} pour les OL 158N (figure 26). Ces données suggèrent que le niveau de stress du RE élevé de manière basale chez les OL 158JP est amplifié par la tunicamycine ce qui rend ces cellules extrêmement plus vulnérables à l'induction de l'apoptose induite par le stress du RE que les 158N contrôles. Par ailleurs, nos résultats montrent aussi une augmentation effective de la concentration d'ARNm codant CHOP dans les cellules 158N et 158JP (figure 27). De manière intéressante, l'augmentation de l'expression des ARNm codant CHOP est 4 fois plus importante dans les OL 158JP que dans les OL 158N exposés à la tunicamycine.

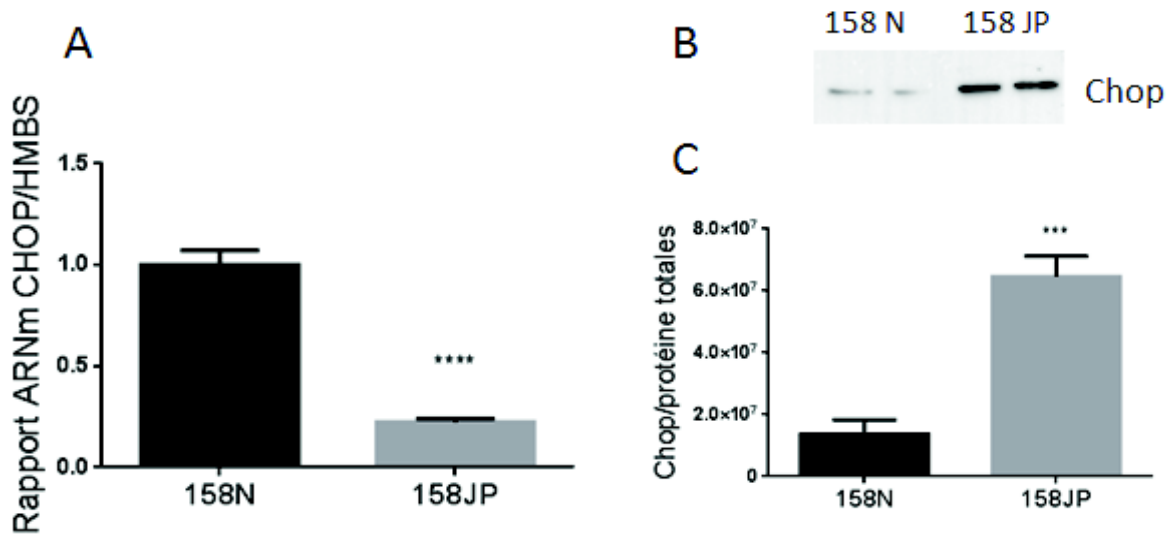

Figure 25 : Evaluation des niveaux endogènes de CHOP dans les OL 158N et 158JP.

(A) Analyses en RT-qPCR de l'expression de CHOP dans les cellules 158N et 158JP (n=12, $t_{(22)}$=10,41, ****p < 0,0001). (B) Image du western blot et (C) semi-quantification de l'expression protéique de Chop dans les cellules 158N et 158JP ; le taux de protéines totales est utilisé comme contrôle (n=8, $t_{(14)}$=9,653, ***p< 0,001). Les valeurs représentent la moyenne + SEM.

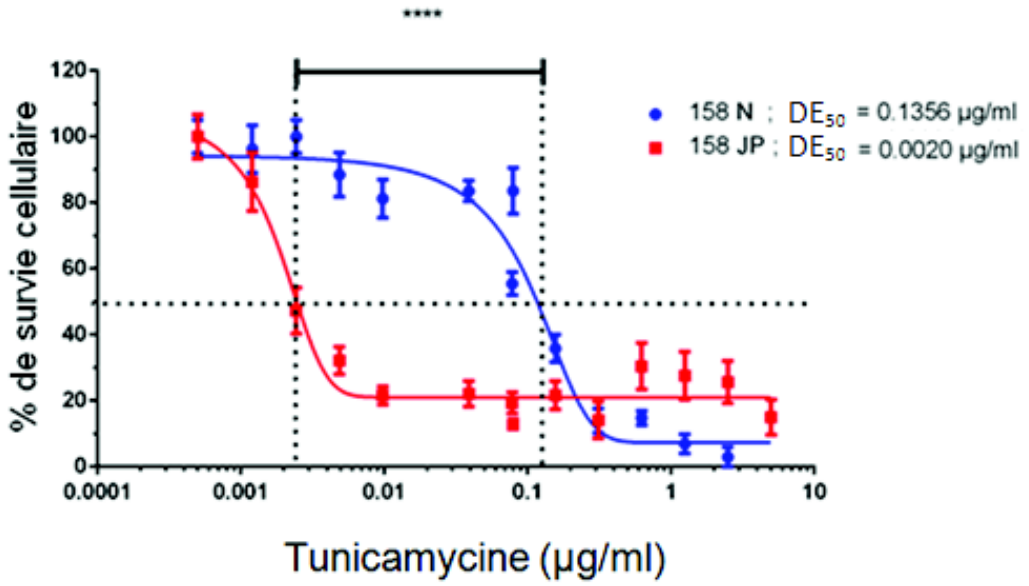

Figure 26 : Effet dose-réponse de la tunicamycine sur les cellules 158N (●) et 158 JP (■).

Le test MTT a été utilisé pour déterminer la viabilité cellulaire qui est exprimée en pourcentage du témoin (cellules non traitées). Le signal MTT évalué dans la condition témoin (absence de tunicamycine) est arbitrairement placé à 100%. La concentration de tunicamycine induisant 50% de mortalité cellulaire est définie par l'DE_{50} (µg/ml) à partir d'une modélisation mathématique. La modélisation est une courbe dose-réponse en log d'inhibiteur en fonction de la réponse à 3 variables : inhibition maximale, $t_{(297)}$=38,48, p<0.001 ; pente, $t_{(297)}$=51 ; DE_{50}, $t_{(297)}$=222. Les valeurs représentent la moyenne + SEM.

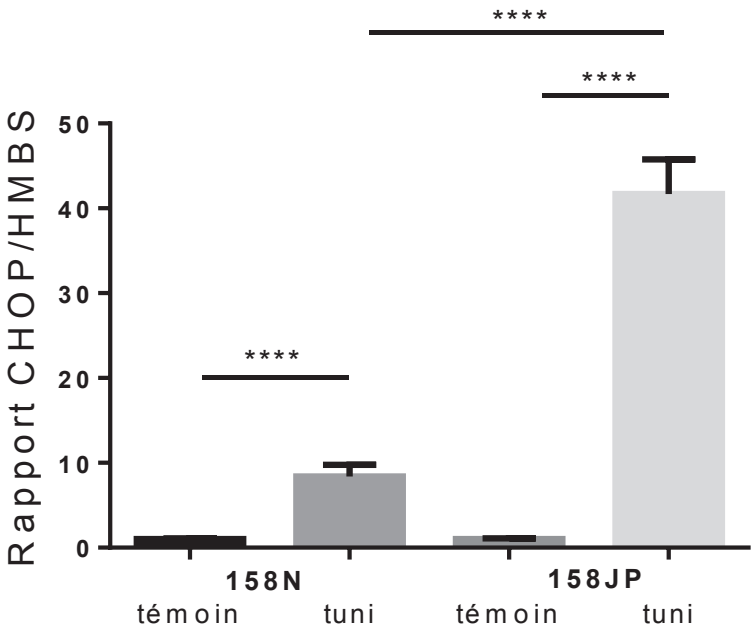

Figure 27: Effet de la tunicamycine sur la concentration des ARNm codant la protéine CHOP dans les cellules 158N et 158JP.

Les OL 158N et 158JP ont été traités avec leurs DE_{50} respectives de tunicamycine : 0,1356 et 0,002 µg/ml (n=8, ANOVA : Interaction facteur lignée x facteur traitement : $F_{(1, 28)}$=476,5, $p < 0,0001$, suivie de post hoc Tukey, ****$p < 0,0001$). Les valeurs représentent la moyenne + SEM.

Pour confirmer l'activation des voies apoptotiques induites par le stress du RE, nous avons utilisé la technique de cytométrie en flux pour mesurer l'expression de la caspase-12, décrite comme étant une caspase intervenant dans l'apoptose évoquée par le stress du RE (Nakagawa et al. 2000; Fribley et al. 2009). Nos résultats montrent un décalage de la courbe du signal fluorescent vers la droite (figure 28, A), traduisant une augmentation de 30% de l'intensité moyenne de fluorescence (IMF) de la caspase-12 dans les OL 158JP comparés aux 158N (figure 28, B).

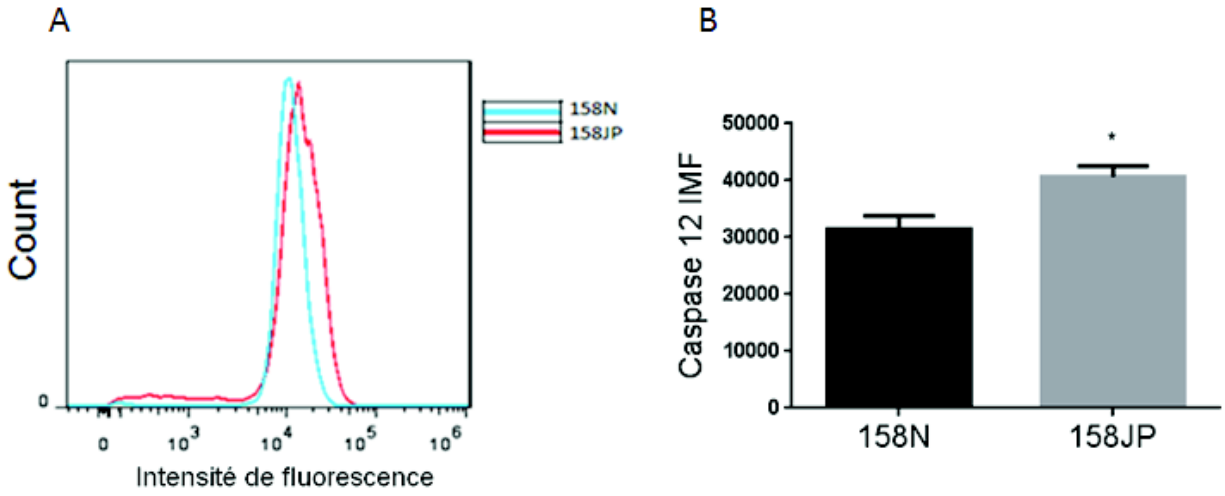

Figure 28: Evaluation qualitative (A) et quantitative (B) par cytométrie de flux de l'expression de la caspase-12 activée dans les OL 158N et 158JP.

L'intensité moyenne de fluorescence (IMF) représente la moyenne de fluorescence de 10 000 cellules comptées pour chaque expérience. Chaque valeur représente la moyenne + SEM de 3 expériences indépendantes ($t_{(4)}$=3,084, *p < 0,05).

3.2 Effet protecteur du 4-PBA, inhibiteur du stress du RE, sur la mort olygodendrocytaire induite par la mutation PLP

Nous avons testé la capacité du 4-PBA, connu pour son activité inhibitrice du stress du RE (Kubota et al. 2006; Mimori et al. 2012; Jiang et al. 2014; Kolb et al. 2015), à protéger les cellules 158JP contre la mort cellulaire induite par l'accumulation de la protéine PLP mutée. Les marqueurs du stress du RE et de l'apoptose ont été évalués après un traitement avec 500µM de 4-PBA. Nos résultats montrent une diminution significative des concentrations d'ARNm et de protéine BiP après 48h de traitement au 4-PBA (figure 29, A et B). De plus, la concentration d'ARNm du marqueur CHOP diminue également dans les cellules 158JP après un traitement à 24h et 48h (figure 29, C). Nos travaux révèlent également que le 4-PBA entraine une baisse significative de la concentration du facteur pro-apoptotique Bax et une augmentation du facteur anti-apoptotique Bcl-2 après 48h de traitement (figure 30). Par ailleurs, le test au bleu de trypan a permis de confirmer que le traitement au 4-PBA augmente d'environ 18% (17,6 ± 5,8 %) la survie des OL 158JP (figure 31).

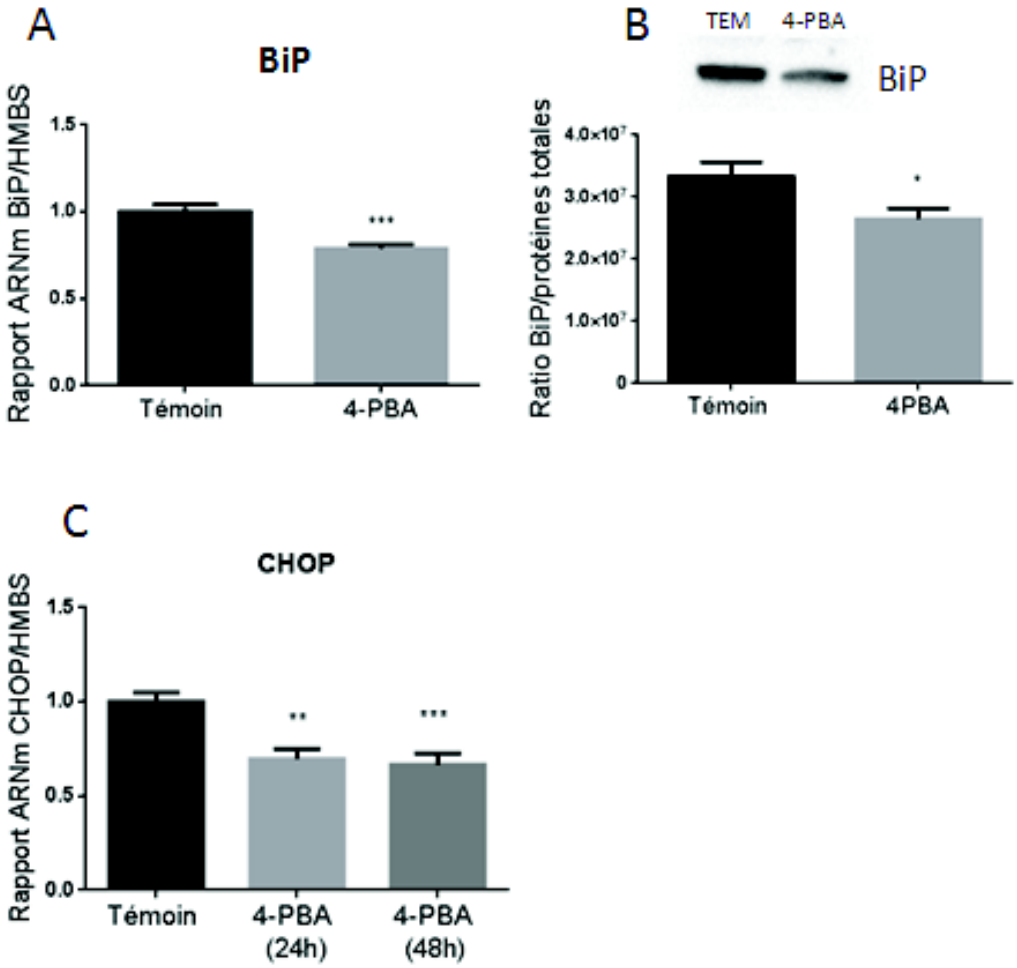

Figure 29 : Effet d'un traitement au 4-PBA sur les marqueurs du stress du RE dans les cellules 158JP. (A) Analyse RT-qPCR de l'expression de BiP après 48h de traitement au 4-PBA (500µM), (n=12, $t_{(21)}$=4,398, ***p < 0,001). (B) Image du western blot et semi-quantification de l'expression protéique de BiP dans les cellules 158JP après 48h de traitement au 4-PBA ; la concentration de protéines totales est utilisé comme contrôle (n=12, $t_{(20)}$=2,633, *p < 0,05). (C) Analyse RT-qPCR des niveaux d'ARNm codant CHOP dans les OL 158JP après 24h et 48h de traitement au 4-PBA (500µM), (n=12, ANOVA : facteur temps $F_{(2, 30)}$=10,50, p < 0,001 suivie de post hoc Tukey, **p < 0,005, ***p < 0,001) . Les valeurs représentent la moyenne + SEM.

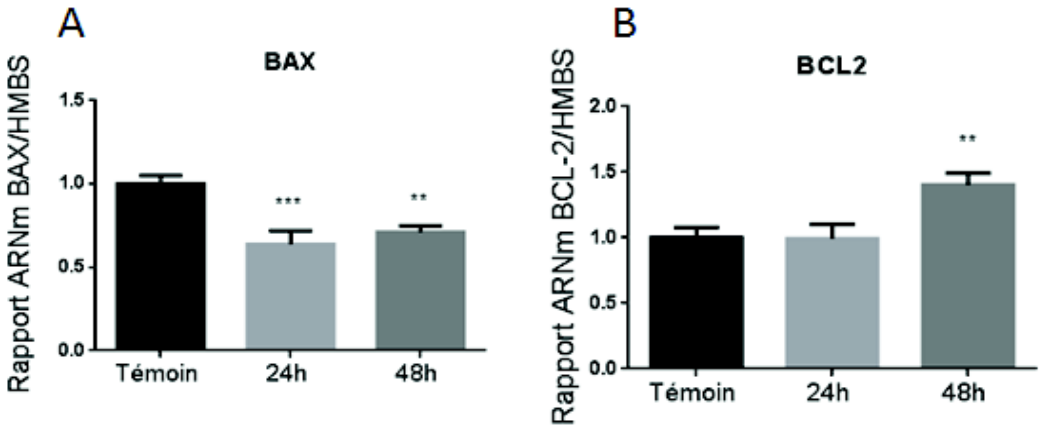

Figure 30: Effet d'un traitement au 4-PBA sur les marqueurs de l'apoptose dans les OL 158JP.

(A) Analyse RT-qPCR des concentrations d'ARNm de Bax dans les OL 158JP après 24h et 48h de traitement au 4-PBA (500µM), (n=12, ANOVA facteur temps $F_{(2, 26)}$=12,05, $p < 0,001$ suivie de post hoc Tukey, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,001$). (B) Analyse en RT-qPCR des concentrations d'ARNm de Bcl-2 dans les cellules 158JP après 24h et 48h de traitement au 4-PBA (500µM), (n=12, ANOVA facteur temps $F_{(2, 25)}$=7,043, $p < 0,005$, suivie de post hoc Tukey, ** $p < 0,005$).

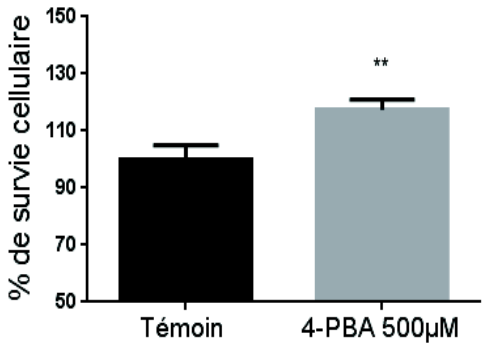

Figure 31 : Analyse par le test d'exclusion au bleu de trypan de l'effet du 4-PBA sur la survie des OL 158JP.

Le graphique montre le pourcentage de survie des OL 158JP en absence (témoin) et en présence de 4-PBA (500µM) pendant 48h (n=20, $t_{(35)}$=14,57, $^{**}p < 0,01$). Le pourcentage de survie des cellules témoins est arbitrairement placé à 100%. Les valeurs représentent la moyenne + SEM.

3.3 Effets de la rapamycine sur la survie des OL 158JP

Etant donné que la rapamycine est connue pour stimuler l'autophagie permettant d'améliorer la dégradation des protéines mal conformées (Klionsky et Emr 2000; Bove et al. 2011; Kapuy et al. 2014; Cai et al. 2016), nous avons étudié l'action de cette molécule sur la viabilité des OL 158N et 158JP. Les cellules ont été traitées avec des concentrations de rapamycine allant de 20 à 200nM pendant 6h et 24h et les mesures MTT réalisées pour chaque type cellulaire dans les conditions basales (absence de traitement) ont été arbitrairement placées à 100%. Après 6h de traitement à la rapamycine, aucune différence n'a été observée entre les cellules 158N et 158JP quelle que soit la concentration de rapamycine (figure 32, A et B). Après 24h de traitement, la viabilité des OL 158N et 158JP est diminuée à toutes les concentrations de rapamycine (figure 32, B et C). Nous avons alors voulu vérifier si

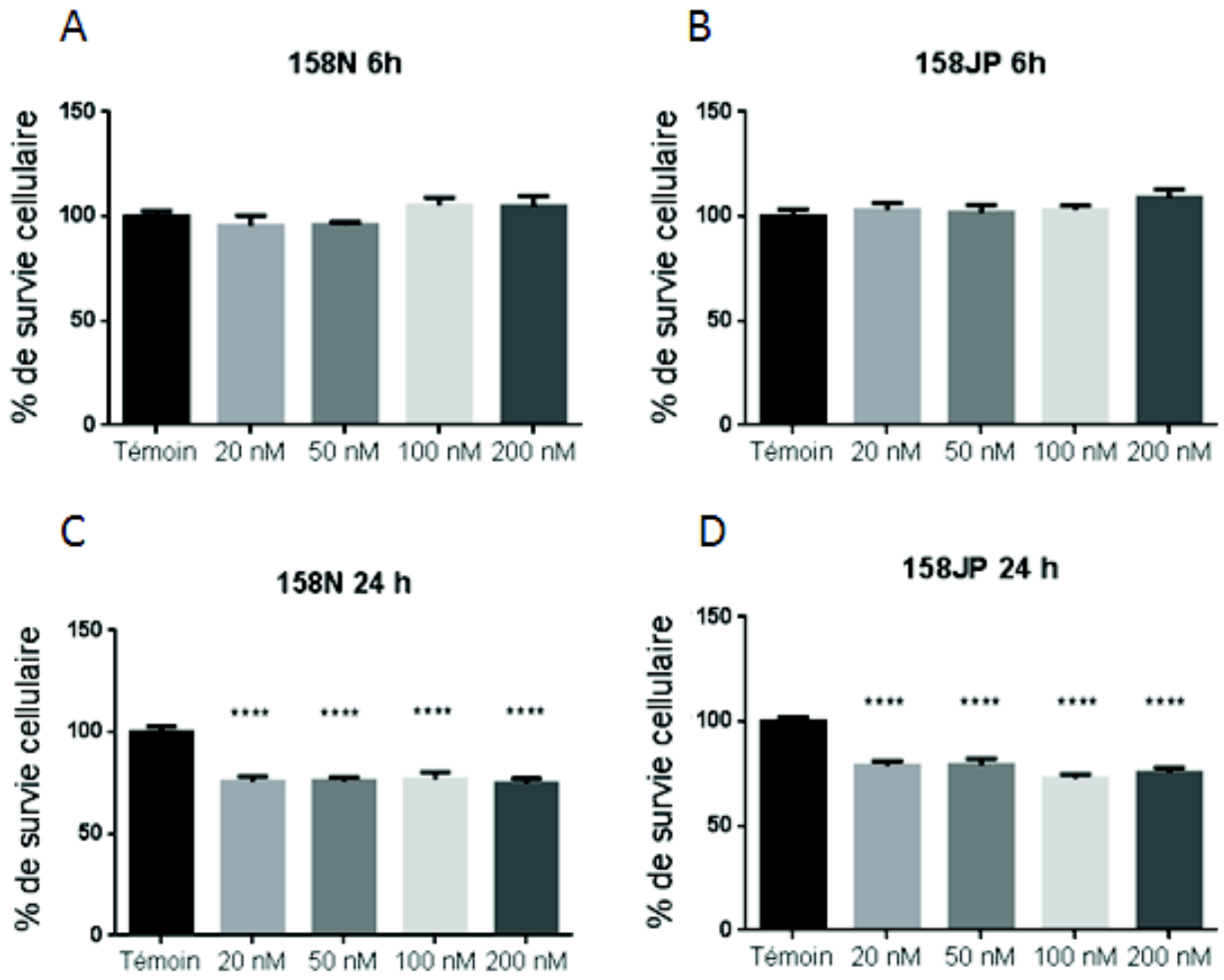

Figure 32 : Evaluation cinétique de l'effet dose-réponse de la rapamycine sur la viabilité des OL 158N (A, C) et 158JP (B, D).

Le test MTT a été utilisé pour évaluer la viabilité cellulaire exprimée en pourcentage du contrôle (cellules témoin non traitées). Les valeurs représentent la moyenne + SEM. ANOVA pour 158N 24h : facteur dose $F_{(4, 75)}$=15,96, $p < 0,0001$, n=16 ; ANOVA pour 158JP 24h: facteur dose $F_{(4, 155)}$=19,99, $p < 0,0001$, n= 32, suivie de post hoc Tukey (****$p < 0,0001$).

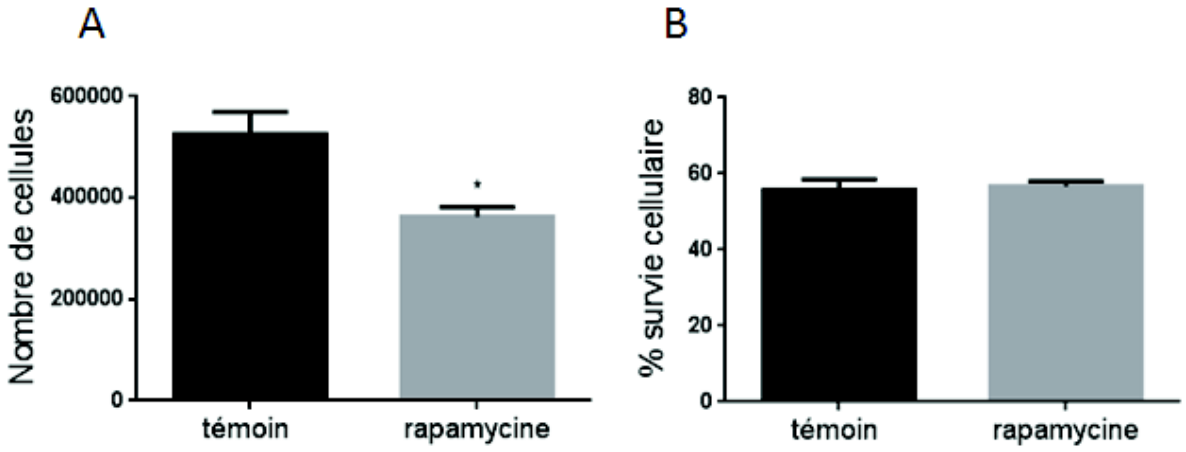

Figure 33 : Analyse par le test d'exclusion au bleu de trypan de l'effet de la rapamycine sur la survie des OL 158JP.

(A) Comptage du nombre de cellules totales présentes dans les cultures en absence (témoin) et présence de rapamycine (20nM), (n=4, $t_{(6)}$=3,456, *p < 0,05). (B) Pourcentage de survie cellulaire des 158JP en absence (témoin) et présence de rapamycine (20nM) pendant 24h. Les valeurs représentent la moyenne + SEM.

3.4 Effets des neurostéroïdes et stéroïdes neuroactifs sur la survie des OL 158JP

3.4.1 Effets de l'alloprégnanolone et de l'œstradiol

Comme nous l'avons rappelé dans l'introduction du présent manuscrit de thèse (voir chapitre 1.4.2.2), diverses études ont démontré que les neurostéroïdes et stéroïdes neuroactifs exercent des effets protecteurs sur les cellules nerveuses dans de nombreux modèles de pathologies (Melcangi et al. 2008; Garcia-Segura et Balthazart 2009; Borowicz et al. 2011). En particulier, il a été démontré que l'alloprégnanolone et l'œstradiol, qui induisent des effets anti-apoptotiques, sont capables de contrecarrer les processus de stress cellulaire dans le système nerveux (Nilsen 2008; Zampieri et al. 2009; Numakawa et al. 2011; Grimm et al. 2014; Lejri et al. 2017). Compte tenu de ces connaissances bibliographiques, nous avons d'abord focalisé nos efforts sur l'évaluation du potentiel de l'alloprégnanolone et de l'œstradiol à réduire le stress du RE et à améliorer la survie des OL 158JP.

3.4.1.1 Effet de l'œstradiol sur la survie cellulaire des cellules 158N et 158JP

L'effet de l'œstradiol sur la viabilité des cellules 158N et 158JP a été mesuré par le test MTT. Les cellules 158N et 158JP ont été traitées avec une gamme de concentrations d'œstradiol allant de 500 à 750nM pendant 3h et 24h. Le signal détecté pour chaque type cellulaire dans les conditions basales (absence de traitement) a été arbitrairement placé à 100%. De manière surprenante, le traitement à l'œstradiol ne modifie pas la survie des OL 158N et 158JP quelle que soit la concentration utilisée ou la durée de traitement (figure 34). Nous avons alors utilisé l'analyse Xcelligence permettant d'enregistrer l'activité des cellules pour vérifier si l'absence d'effet de l'œstradiol est liée à un problème de sensibilité de la

technique MTT. La méthode Xcelligence a confirmé l'absence d'effet de l'œstradiol sur la viabilité cellulaire (figure 35). De façon cohérente, le test d'exclusion au bleu de trypan n'a également montré aucun effet de l'œstradiol sur le pourcentage de cellules vivantes (figure 36).

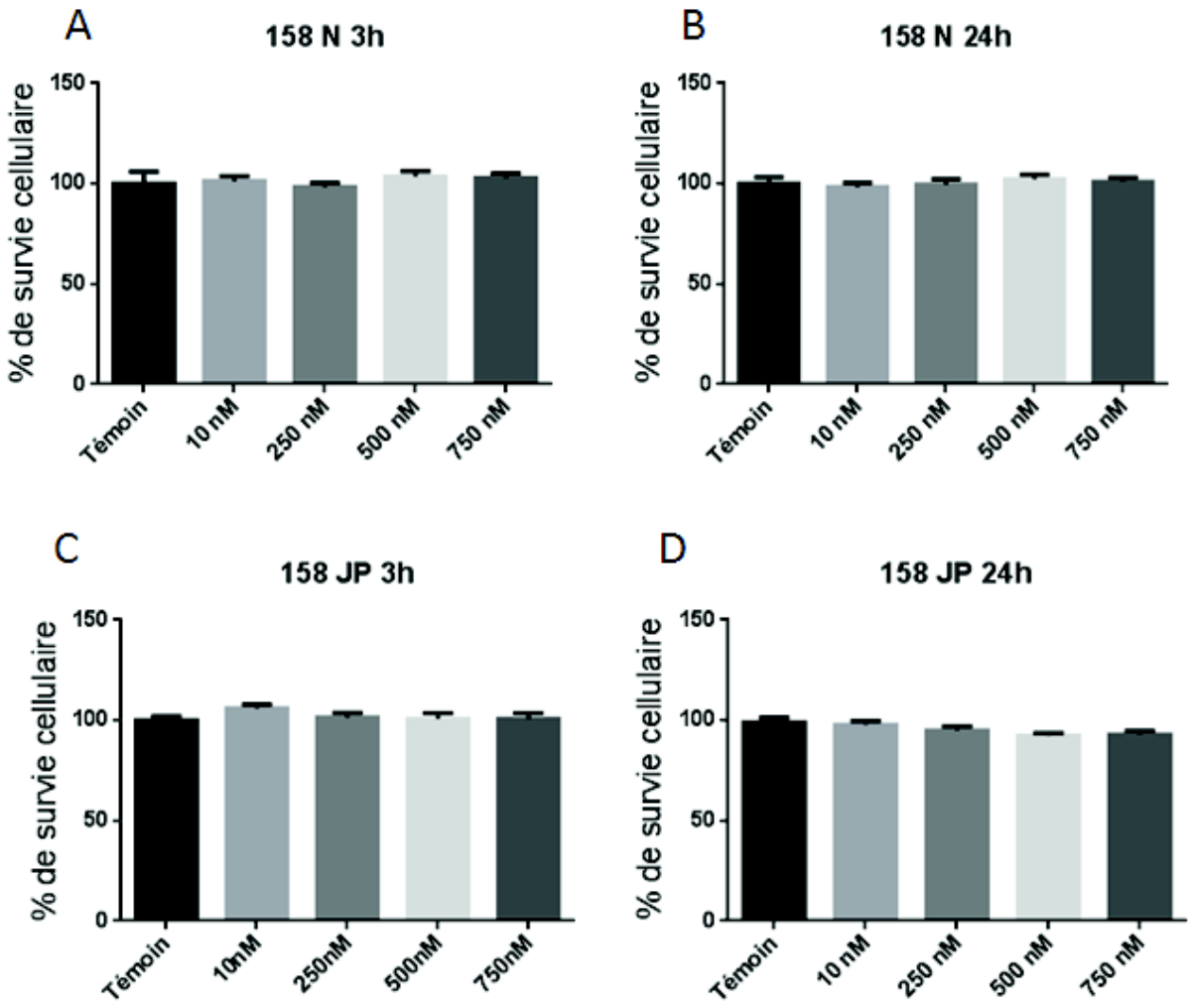

Figure 34 : Evaluation cinétique de l'effet dose-réponse de l'œstradiol sur la viabilité des OL 158N (A, B) et 158JP (C, D).

Le test MTT a été utilisé pour mesurer la viabilité cellulaire exprimée en pourcentage du contrôle (cellules témoins non traitées). Les valeurs représentent la moyenne + SEM d'au moins trois expériences indépendantes.

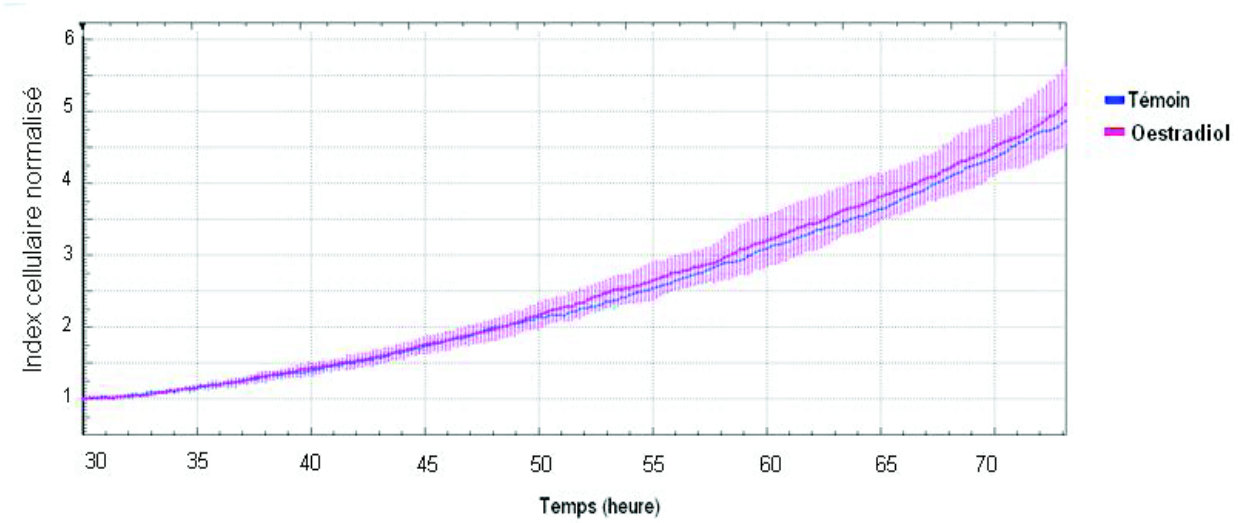

Figure 35 : Illustration de l'impédance des cellules 158JP en absence (témoin) ou en présence de 10nM d'œstradiol.

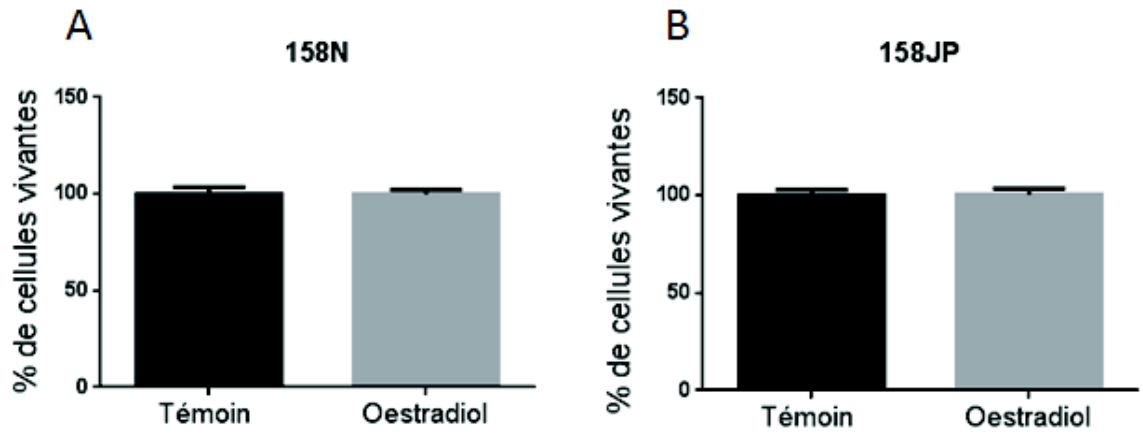

Figure 36: Analyse par le test d'exclusion au bleu de trypan de l'effet de l'œstradiol sur la survie des OL 158N et 158JP.

Le graphique montre le pourcentage de survie des OL 158N et 158JP en absence (témoin) et présence d'œstradiol (10nM) pendant 24h, n=20. Le pourcentage de survie des cellules témoins est arbitrairement placé à 100%. Les valeurs représentent la moyenne + SEM.

3.4.1.2 Effet de l'œstradiol sur le stress du RE

Bien que les approches que nous avons utilisées (MTT, Xcelligence, test d'exclusion au bleu de trypan) n'aient pas permis d'identifier l'action de l'œstradiol sur la survie des oligoendrocytes 158JP, rien ne permet d'exclure la possibilité que l'œstradiol modulerait néanmoins le stress du RE dans ces cellules et que l'action de l'œstradiol ne serait pas suffisamment importante pour impacter la survie cellulaire. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons évalué par RT-qPCR l'effet de l'œstradiol sur l'expression des ARNm codant les protéines CHOP et BiP qui sont des marqueurs du stress du RE. Nos résultats montrent que le traitement à l'œstradiol (10 ou 100nM) pendant 24h ne modifie pas les concentrations d'ARNm de CHOP et BiP dans les cellules 158JP (figure 37).

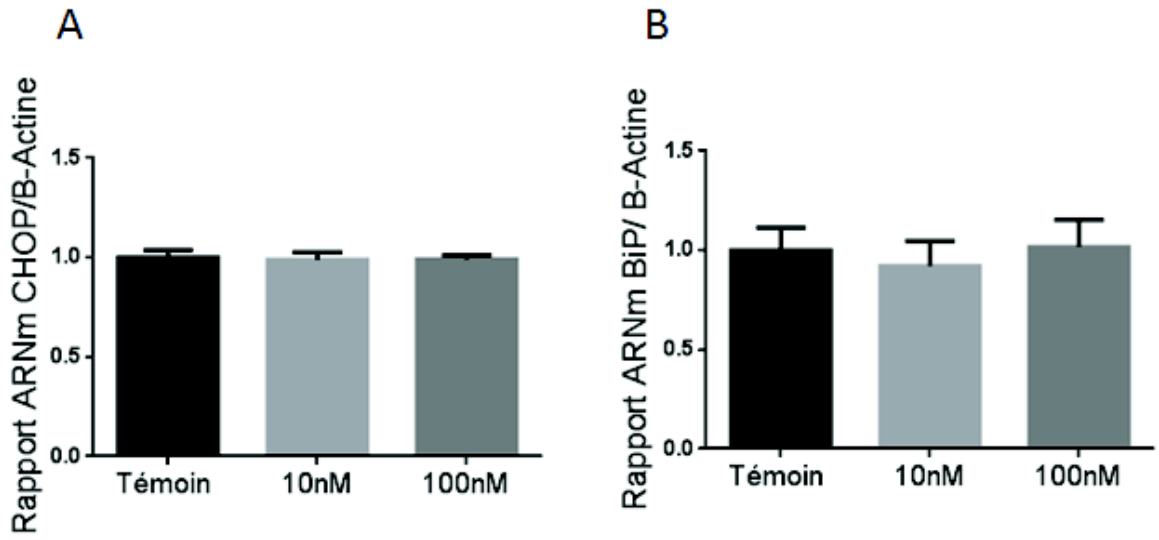

Figure 37: Effet de l'œstradiol sur les marqueurs du stress du RE dans les cellules 158JP**.**

(A) Analyse RT-qPCR de l'expression de CHOP dans les OL 158JP après 24h de traitement à l'œstradiol (10 ou 100nM), n=8. (B) Analyse RT-qPCR de l'expression de BiP dans les OL 158JP après 24h de traitement à l'œstradiol, n=8. Les valeurs représentent la moyenne + SEM.

3.4.1.3 Effet de l'alloprégnanolone sur la survie des OL 158N et 158JP

De façon similaire au travail réalisé avec l'œstradiol, l'effet de l'alloprégnanolone sur la viabilité des cellules 158N et 158JP a également été évalué grâce au test MTT. Les cellules 158N et 158JP ont été traitées avec des concentrations d'alloprégnanolone allant de 100 à 750nM pendant 3h, 6h ou 24h. Le signal détecté pour chaque type cellulaire dans les conditions basales (absence de traitement) a été arbitrairement placé à 100%. Aucun effet de l'alloprégnanolone n'est observé sur la viabilité des OL 158N et 158JP quelle que soit la concentration utilisée ou la durée de traitement (figure 38). Cette observation est confirmée par le test d'exclusion au bleu de trypan et par l'analyse Xcelligence qui ont respectivement révélé que le traitement à l'alloprégnanolone (500nM) pendant 24h ne modifie pas le pourcentage de cellules 158N et 158JP vivantes (figure 39) ou l'impédance des OL 158JP (figure 40).

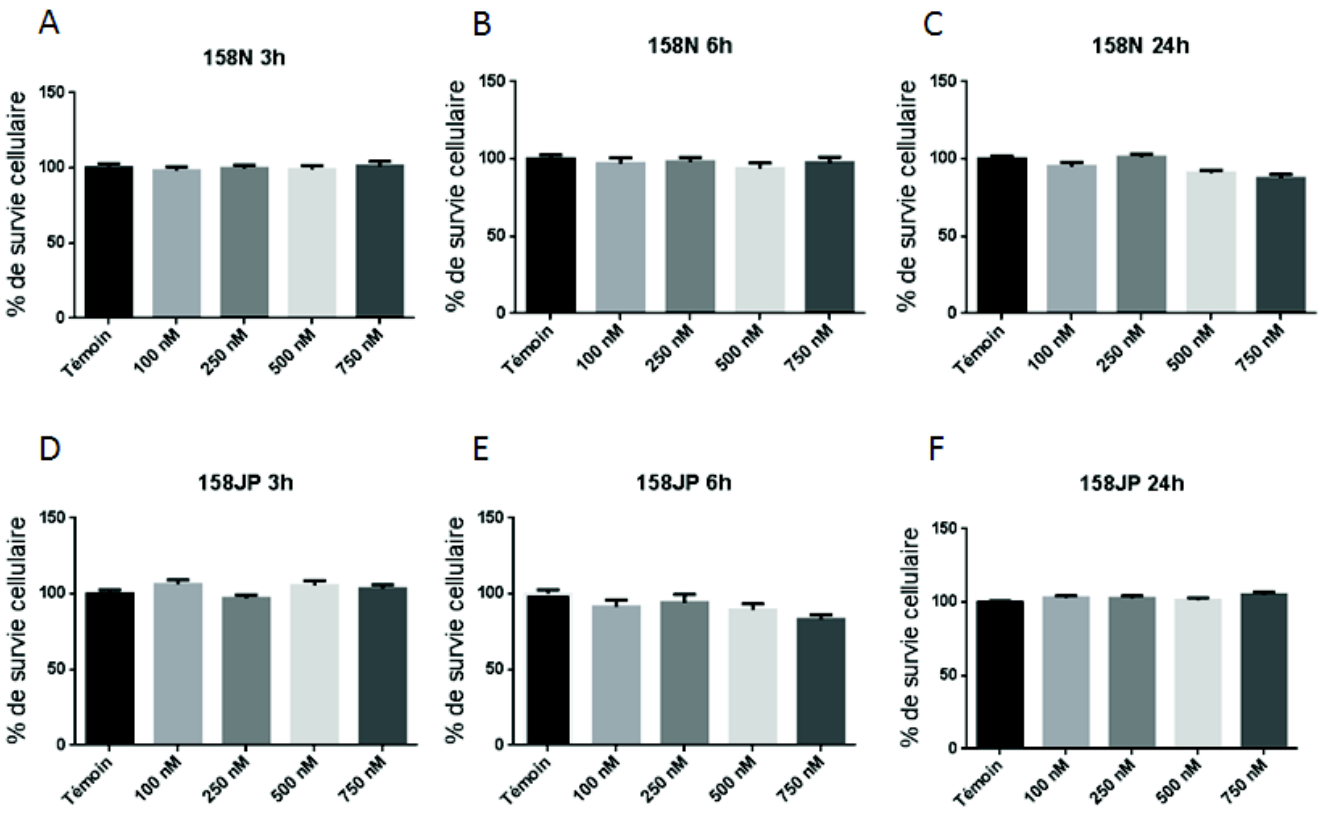

Figure 38 : Evaluation cinétique de l'effet dose-réponse de l'alloprégnanolone sur la viabilité des OL 158N (A, B, C) et 158JP (D, E, F).

Le test MTT a été utilisé pour évaluer la viabilité cellulaire exprimée en pourcentage du contrôle (cellules témoins non traitées). Les valeurs représentent la moyenne + SEM d'au moins trois expériences indépendantes.

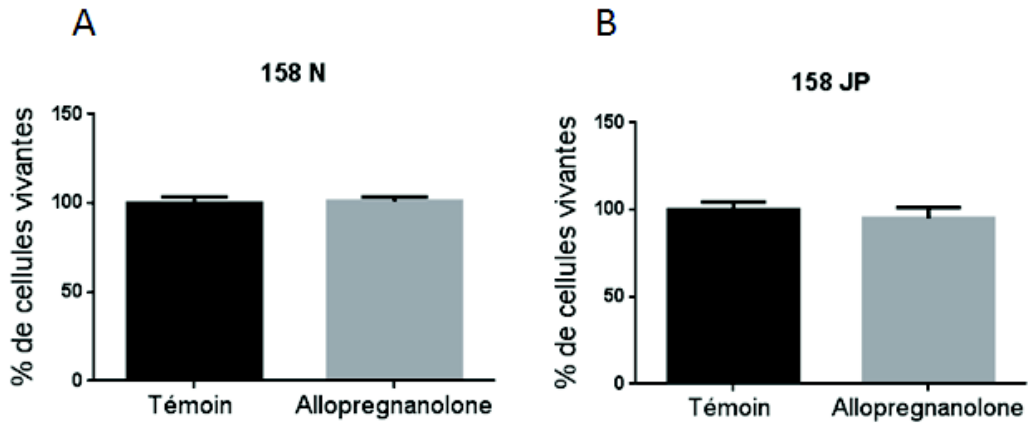

Figure 39 : Analyse par le test d'exclusion au bleu de trypan de l'effet de l'alloprégnanolone (500nM) sur la survie des OL 158N (A) et 158JP (B).

Le graphique montre le pourcentage de survie cellulaire des 158N et 158JP en absence (témoin) et présence d'alloprégnanolone (10nM) pendant 24h, n=12. Le pourcentage de survie des cellules témoins est arbitrairement placé à 100%. Les valeurs représentent la moyenne + SEM.

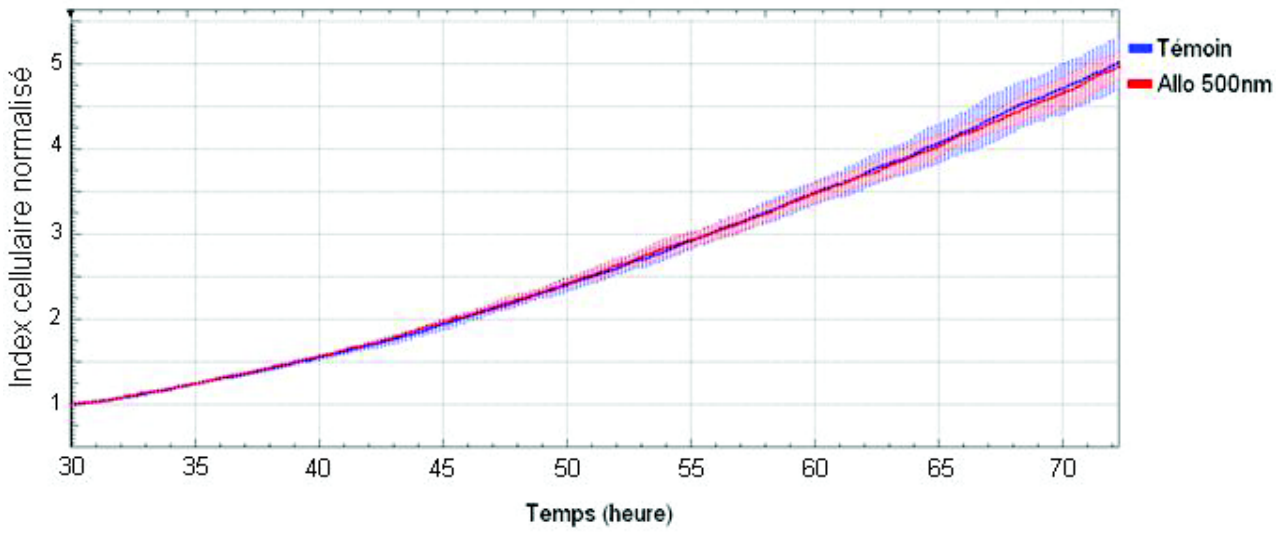

Figure 40 : Analyse de l'impédance des cellules 158JP en présence (témoin) ou en absence d'alloprégnanolone (Allo) à 500nM.

3.4.1.4 Effet de l'alloprégnanolone sur le stress du RE

La technique de RT-qPCR a été utilisée pour déterminer si l'alloprégnanolone module néanmoins le stress du RE indépendamment de l'absence d'action détectable sur la survie des OL 158JP. Tout comme l'œstradiol, l'alloprégnanolone (500nM) administré pendant 24h n'exerce aucun effet sur la concentration des ARNm codant CHOP dans les OL 158JP (figure 41).

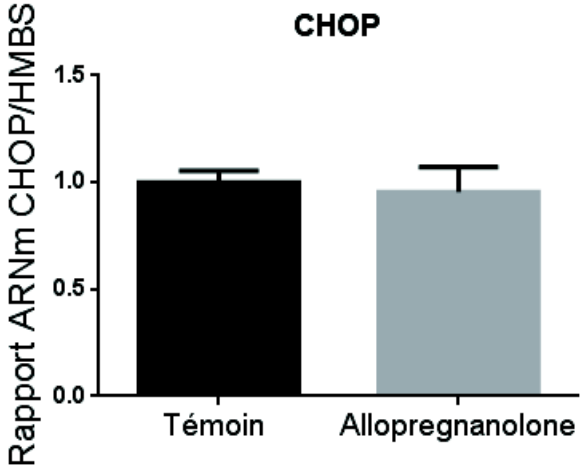

Figure 41: Analyse RT-qPCR de l'expression de CHOP dans les OL 158JP après 24h de traitement à l'alloprégnanolone (500nM), n=8. Les valeurs représentent la moyenne + SEM.

3.4.2 Effets des autres stéroïdes neuroactifs sur la survie des OL 158N et 158JP

L'alloprégnanolone et l'œstradiol n'ayant pas démontré d'effet bénéfique dans notre modèle cellulaire, nous avons effectué un screening d'autres stéroïdes neuroactifs décrits dans la littérature comme neuroprotecteurs (voir chapitre 1.4.2.2) (Pike et al. 2008; Garcia-Segura et Balthazart 2009; Aly et al. 2011; Borowicz et al. 2011; Singh et Su 2013; Grimm et al.

2014) afin de vérifier si ces stéroïdes seraient capables de moduler la survie des cellules 158N et 158JP. Ainsi, le test MTT a été utilisé pour étudier les effets de la DHEA, de la DHT, de la progestérone et de l'acétate d'ulipristal (un antagoniste des récepteurs nucléaires de la progestérone) sur la survie des OL 158N et 158JP. Nos résultats montrent qu'aucun de ces stéroïdes neuroactifs n'affecte la survie des cellules 158JP dans les gammes de concentrations et les durées de traitement utilisées (figures 42, 43, 44 et 45).

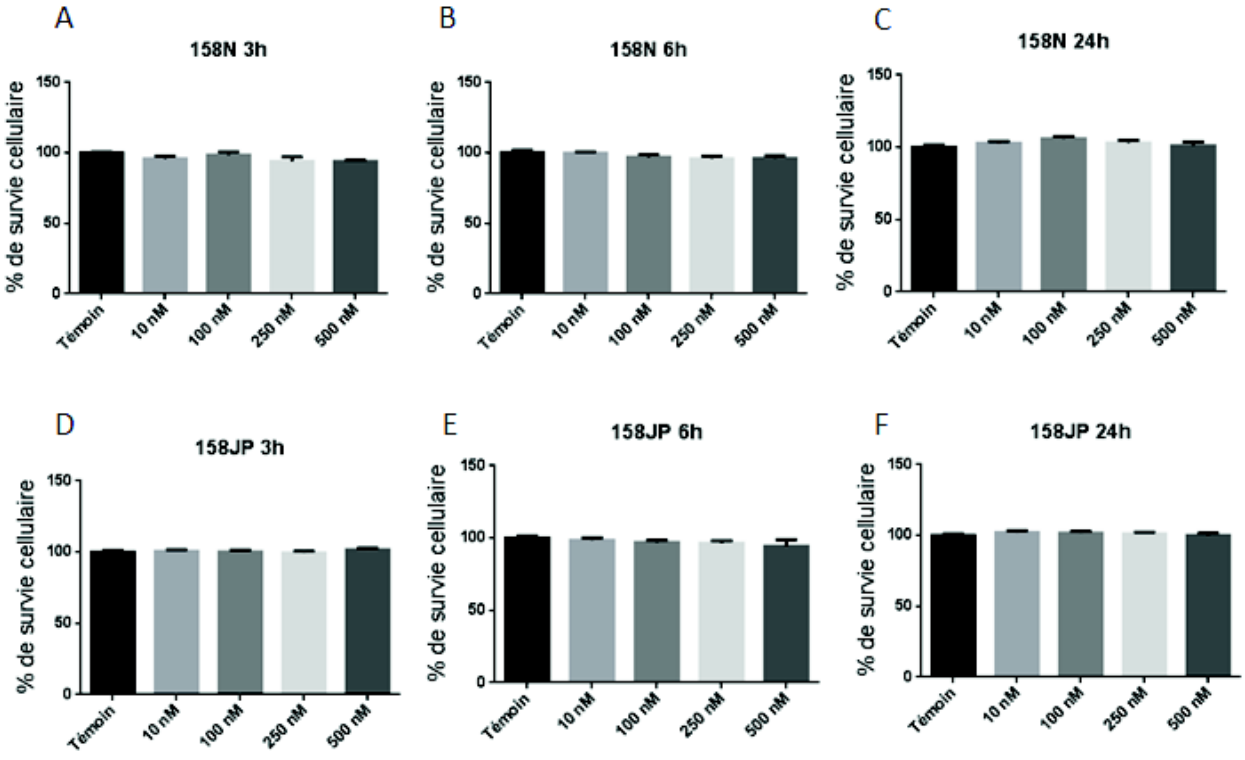

Figure 42 : Evaluation cinétique de l'effet dose-réponse de la DHEA sur la viabilité des OL 158N (A, B, C) et 158JP (D, E, F).

Le test MTT a été utilisé pour évaluer la viabilité cellulaire exprimée en pourcentage du contrôle (cellules témoins non traitées). Les valeurs représentent la moyenne + SEM d'au moins trois expériences indépendantes.

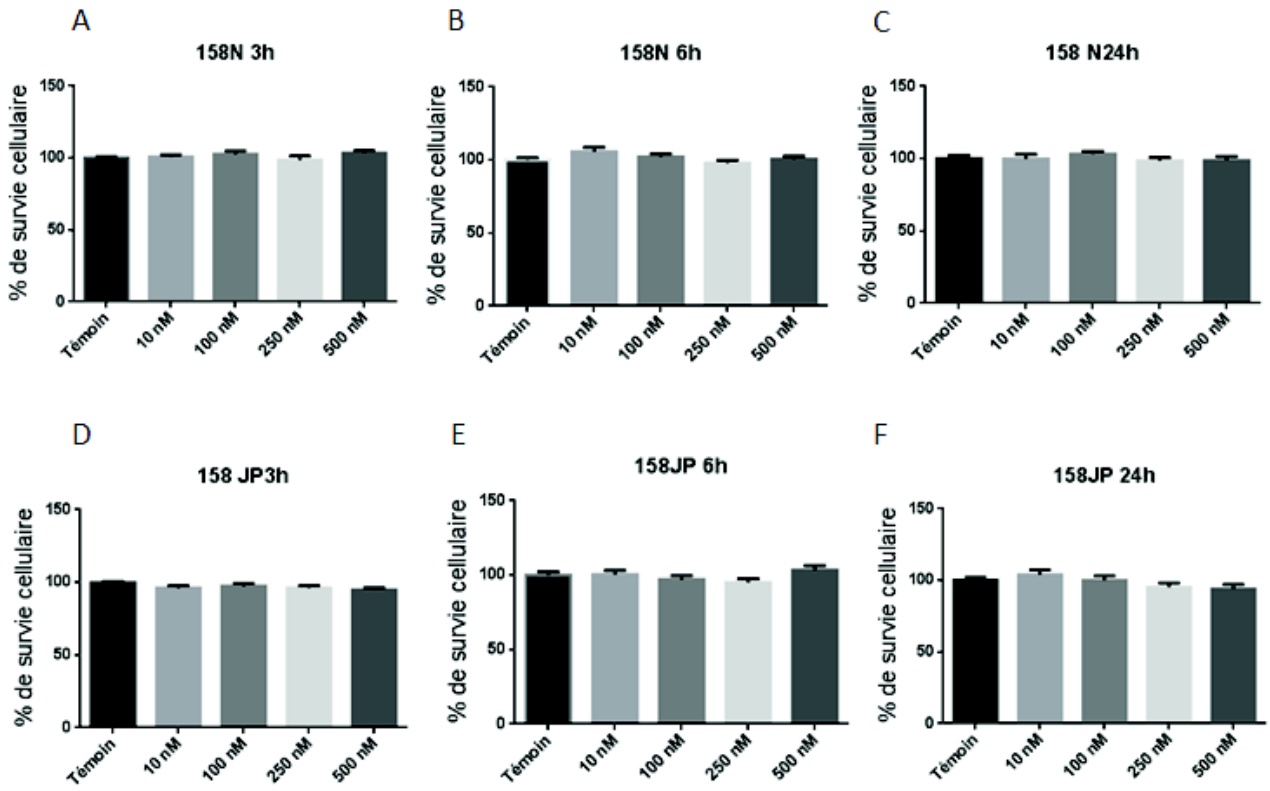

Figure 43 : Evaluation cinétique de l'effet dose-réponse de la DHT sur la viabilité des OL 158N (A, B, C) et 158JP (D, E, F).

Le test MTT a été utilisé pour évaluer la viabilité cellulaire exprimée en pourcentage du contrôle (cellules témoins non traitées). Les valeurs représentent la moyenne + SEM d'au moins trois expériences indépendantes.

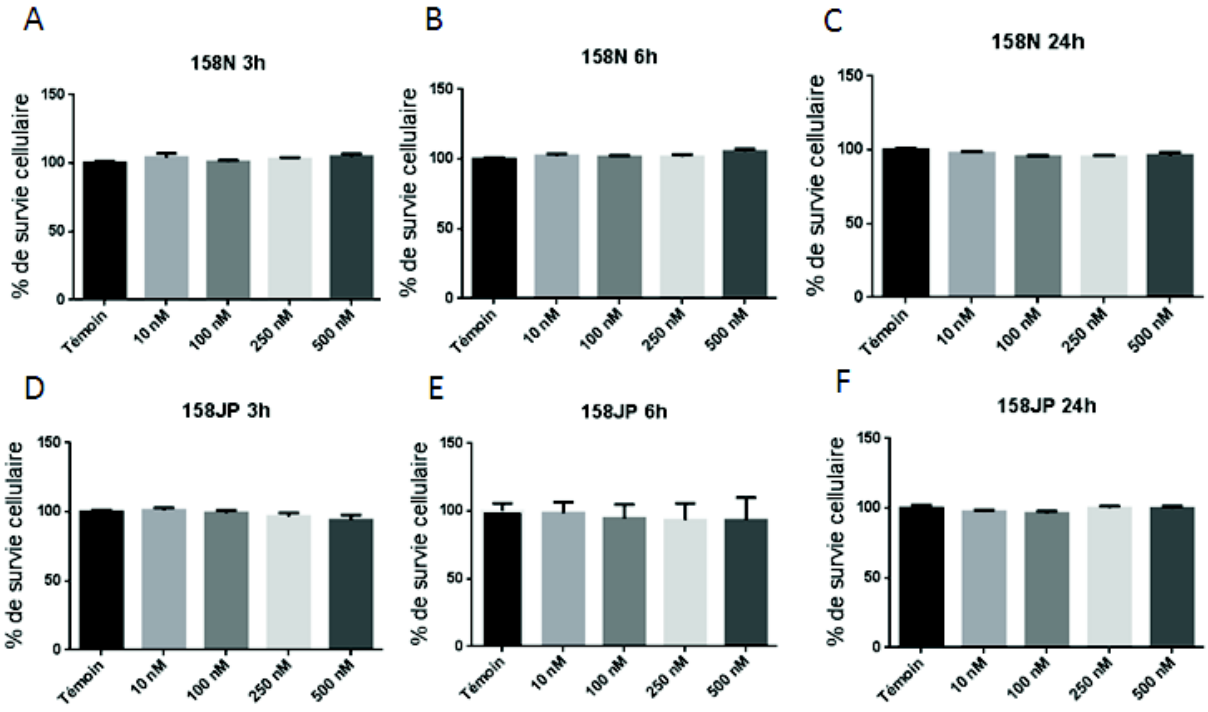

Figure 44: Etude cinétique et dose-réponse de l'effet de la progestérone sur la viabilité des OL 158N (A, B, C) et 158JP (D, E, F).

Le test MTT a été utilisé afin d'évaluer la viabilité cellulaire exprimée en pourcentage du contrôle (cellules témoins non traitées). Les valeurs représentent la moyenne + SEM d'au moins trois expériences indépendantes.

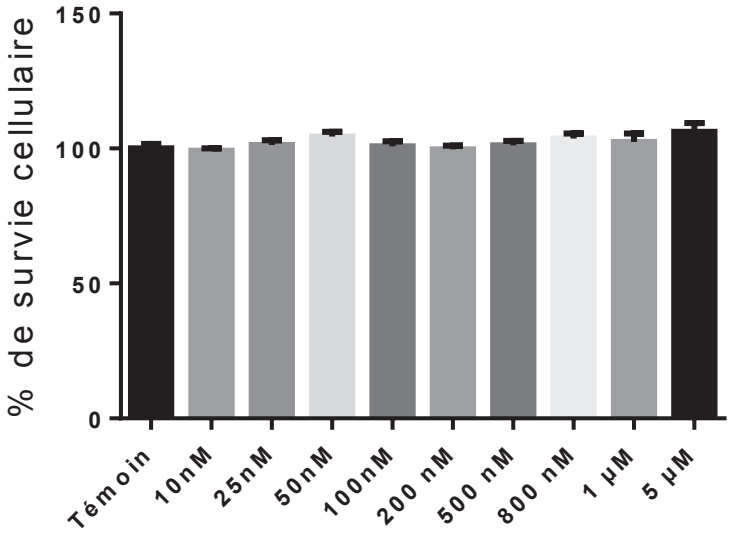

Figure 45: Etude dose-réponse d'un traitement à l'acétate d'ulipristal sur les cellules 158JP.

Le test MTT a été utilisé pour évaluer la viabilité cellulaire exprimée en pourcentage du contrôle (cellules témoins non traitées), n=24. Les valeurs représentent la moyenne + SEM d'au moins trois expériences indépendantes.

4. Discussion

Nos travaux ont combiné diverses techniques dans une approche comparative pour mettre en évidence l'existence de trois différences entre les OL témoins/normaux 158N et les OL 158JP qui représentent un modèle cellulaire pour l'étude des anomalies de la myéline induites par mutation de la PLP (Sidman et al. 1964; Knapp et al. 1986; Duncan et al. 1989; Duncan et al. 2011). En effet, (i) nos investigations réalisées avec la technique de MTT montrent que la viabilité des OL 158JP est inférieure à celle des OL 158N ; (ii) les tests au bleu de trypan ont révélé l'existence d'une forte mortalité dans les cultures d'OL 158JP comparées aux cultures d'OL 158N ; (iii) de façon importante, la combinaison des techniques de RT-qPCR, western blot et cytométrie en flux a permis de démontrer que la baisse de la viabilité cellulaire et la mort des OL 158JP induite par la mutation du gène codant la PLP résultent d'une élévation du niveau basal/endogène de stress du RE et d'apoptose survenant dans ces cellules 158JP.

Pour confirmer l'implication déterminante du stress du RE dans l'induction de l'apoptose et de la mort subséquente des OL 158JP, nos travaux ont également montré que le 4-PBA, qui agit comme une chaperonne pour diminuer l'apoptose évoquée par le stress du RE (Kubota et al. 2006; Mimori et al. 2012; Mimori et al. 2013; Jiang et al. 2014; Kolb et al. 2015), protège efficacement contre la mort cellulaire provoquée par la mutation de la PLP.

Nous avons également testé le potentiel d'autres composés à contrecarrer la mort cellulaire causée par la mutation de la PLP. Il s'agit de la rapamycine décrite comme modulant également les activités du RE (Ogata et al. 2006; Fouillet et al. 2012; Kapuy et al. 2014) et de certains neurostéroïdes connus pour exercer des effets neuroprotecteurs (Borowicz et al. 2011; Hussain et al. 2013; Grimm et al. 2014; Kashani et al. 2015). Les résultats préliminaires obtenus ne montrent pas d'effets protecteurs de ces composés contre la mort

oligodendrocytaire évoquée par la mutation du gène codant la PLP, ce qui suscite une réflexion sur le dérèglement des processus cellulaires au sein des OL 158JP et d'éventuelles perturbations de l'expression des récepteurs sensibles aux molécules informatives dans cette lignée cellulaire. Ainsi, le présent chapitre de la thèse dédiée à la discussion abordera cette réflexion sur la sensibilité des OL 158JP après avoir évoqué successivement les conséquences de la mutation PLP sur la survie cellulaire et le stress du RE ainsi que l'effet protecteur du 4-PBA contre la mort ou la mortalité élevée des OL 158JP.

4.1 Conséquence de la mutation PLP sur la survie cellulaire et l'induction du stress du RE dans les cellules 158JP

S'il a été démontré que la mutation PLP provoque des anomalies telles qu'une augmentation du stress oxydatif dans les OL 158JP (Baarine et al. 2009), l'impact de cette mutation sur la survie cellulaire n'avait jamais été démontré dans ce modèle. Les analyses MTT ont révélé que les OL 158JP ont une faible viabilité par rapport aux 158N et le test d'exclusion au bleu de trypan nous a permis de conclure à une augmentation de la mortalité des cellules 158JP comparés aux 158N. Nos données montrant une viabilité réduite et une forte mortalité des OL 158JP sont en concordance avec les travaux antérieurs qui ont utilisé des méthodes microscopiques et ultrastructurales pour démontrer que le pourcentage de mort oligodendrocytaire dans le SNC en développement est au moins 10 fois plus élevé chez les souris jimpy comparées aux souris normales (Knapp et al. 1986).

De façon cohérente, la combinaison des techniques de RT-qPCR, Western blot et de cytométrie en flux nous a permis de démontrer que l'augmentation de la mortalité des OL

158JP résulte d'une activation des mécanismes apoptotiques. Il est clairement établi que les protéines de la famille Bcl-2 déterminent de manière cruciale le basculement de la cellule vers l'apoptose en contrôlant la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe, ce qui a pour conséquence le relargage du cytochrome c dans le milieu intracellulaire, initiant la cascade des caspases qui aboutit à la destruction de la cellule (Elmore 2007; Youle et Strasser 2008; Wyllie 2010; Garcia-Saez 2012). L'équilibre entre les protéines anti-apoptotiques (Bcl-2 et Bcl-x) et les protéines pro-apoptotiques (Bax, Bak) maintient la cellule du côté de la survie cellulaire et une déstabilisation de cet équilibre engendre l'initiation de l'apoptose (Youle et Strasser 2008; Westphal et al. 2011; Shamas-Din et al. 2013; Czabotar et al. 2014). Ainsi, Le ratio Bax/Bcl-2 est communément utilisé pour évaluer les niveaux d'apoptose (Salakou et al. 2007; Zaldivar et al. 2009; Zarate et al. 2010; Alarifi et al. 2017; Azm et al. 2017; Khan et al. 2017). Nos résultats montrent une augmentation du facteur pro-apoptotique Bax et une diminution du facteur anti-apoptotique Bcl-2 se traduisant par une augmentation du ratio Bax/Bcl-2 dans les cellules 158JP. De plus, les analyses réalisées en cytométrie de flux nous ont permis de confirmer une augmentation du pourcentage de cellules apoptotiques précoces et tardives dans les cultures d'OL 158JP.

L'accumulation de la PLP dans les OL est susceptible de causer un stress du RE pouvant déterminer le basculement vers la mort cellulaire (voir chapitre 1.3.4.3). Par ailleurs, l'activation du stress du RE a été observée dans différents modèles de PMD (Southwood et al. 2002; Roboti et al. 2009; Numasawa-Kuroiwa et al. 2014). Ainsi, nous avons recherché si une augmentation des niveaux endogènes de stress du RE causée par la mutation PLP pouvait expliquer la diminution de viabilité consécutive à l'activation de l'apoptose dans notre modèle 158JP. Nos travaux révèlent que le niveau d'expression endogène de la protéine BiP, senseur du stress du RE (voir chapitre 1.3.2), est augmenté dans les OL 158JP. Ces données suggèrent

l'activation du stress du RE dans les cellules 158JP. L'activation de la réponse UPR pouvant être cytoprotectrice ou cytotoxique en fonction de l'intensité ou de la durée du stress (Hetz et Mollereau 2014), nous avons mesuré l'expression de marqueurs impliqués dans les voies adaptatives et apoptiques de l'UPR. De manière intéressante, nous avons démontré qu'il existe une diminution de la forme épissée de XBP1 dans les cellules 158JP. XBP1s étant un acteur de l'adaptation des cellules au stress du RE (Roselli et Caroni 2012), la diminution de sa présence au sein des cellules 158JP témoigne d'une baisse de la capacité de ces cellules à s'adapter au stress du RE qui est susceptible d'activer les voies apoptotiques. De manière cohérente, nous avons mis en évidence, dans les cellules 158JP, une augmentation des niveaux endogènes de CHOP et de caspase-12 dont l'augmentation est corrélée à une activation du stress du RE (Liu et al. 2015; Deng et al. 2016; Zhang et al. 2016). Une hausse de l'expression de ces deux marqueurs est conventionnellement considérée comme une preuve de l'activation des mécanismes d'apoptose induite par le stress du RE (Liu et al. 2013). Cependant, il convient de souligner qu'un débat contradictoire existe dans la littérature à propos du rôle de la protéine CHOP dans les OL. En effet, la délétion de CHOP dans un modèle de PMD empire le phénotype des animaux rsh et augmente l'apoptose des OL (Southwood et al. 2002). De plus, la surexpression de CHOP dans les cellules myélinisantes n'a aucun effet délétère sur la mort cellulaire des souris « normales » ni sur la mort cellulaire des souris rsh qui produisent une PLP mutée (Southwood et al. 2016). Ces contradictions ont conduit les auteurs à proposer un nouveau modèle nuançant le rôle attribué à CHOP dans l'apoptose induite par le stress du RE. Selon ce modèle, la réponse UPR peut être décrite comme une boucle suivant plusieurs cycles consécutifs d'activations permettant, à chaque cycle, de dégrader une proportion des protéines mal conformées. L'activation de CHOP serait une étape régulatrice déterminante pour faciliter la succession des cycles de réponse UPR qui contribuent à la dégradation des protéines mal conformées. On peut alors comprendre que

dans le modèle de Southwood et al., la délétion de CHOP empire le phénotype et augmente l'apoptose chez les souris rsh (Southwood et al. 2002; Southwood et al. 2016). De façon intéressante, le modèle de Southwood et al. permet également de comprendre que l'expression de CHOP rendrait la cellule plus vulnérable à des phénomènes délétères tels que la fuite de Ca^{2}+ hors du RE et la déplétion d'ATP qui peuvent entraîner la mort cellulaire (figure 46). Par ailleurs, les travaux de Southwood et al. (2016) suggèrent que l'absence d'effets délétères de la surexpression de CHOP dans les cellules myélinisantes serait liée à l'existence de mécanismes protecteurs spécifiques à ces cellules. A l'appui de cette hypothèse nous avons constaté que dans les OL 158JP il existe un rétrocontrôle négatif qui permet de diminuer les concentrations d'ARNm codant CHOP car la concentration protéique endogène de CHOP dans ces cellules est déjà élevée en situation basale (voir résultats pages 136 et 138). Des travaux supplémentaires seront nécessaires pour élucider complètement le rôle de CHOP dans les OL 158JP. Néanmoins, les éléments décrits ci-dessus, notamment l'hypothèse du rétrocontrôle de l'expression du gène codant CHOP dans ces cellules, suggèrent que les OL 158JP pourraient constituer un modèle pertinent pour la caractérisation du rôle et des mécanismes d'action de la protéine CHOP dans la régulation de la survie cellulaire.

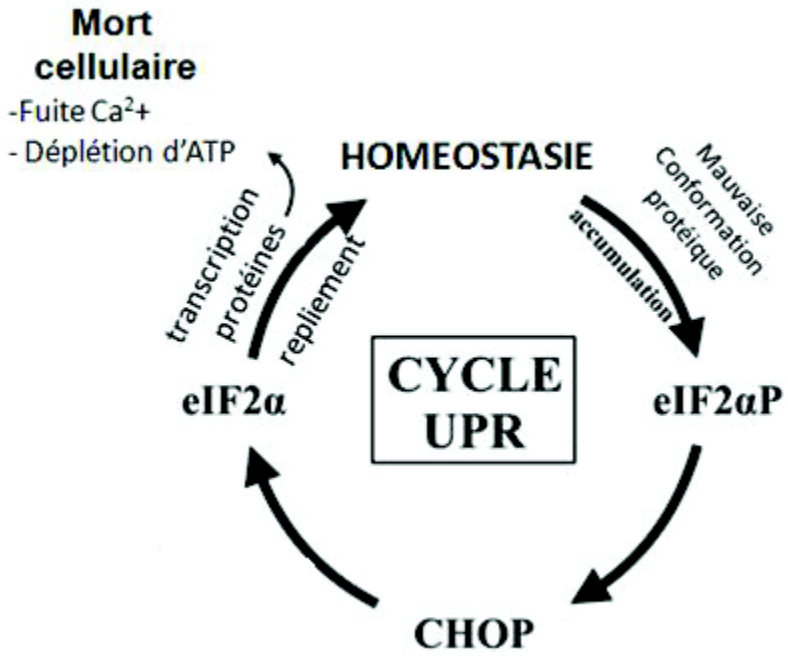

Figure 46: Schéma du cycle UPR selon Southwood et al. (2016).

L'UPR est activée par l'agrégation des protéines mal conformées. La voie PERK mène à la phosphorylation de la protéine eIF2α afin d'atténuer la synthèse protéique et à l'activation de CHOP. La protéine CHOP induit la déphosphorylation d'eIF2α permettant de relancer la synthèse protéique mais cette fonction de CHOP rend les cellules plus vulnérables aux événements tels que la fuite de Ca^2+ ou une déplétion d'ATP qui sont susceptibles d'engendrer la mort cellulaire.

Nos résultats démontrent également que les OL 158JP sont beaucoup plus vulnérables que les 158N à un traitement à la tunicamycine qui induit le stress du RE en inhibant la N-glycolysation des protéines (Shen et al. 2015; Wang et al. 2015). Ainsi, des doses extrêmement faibles de tunicamycine sont suffisantes pour induire une mortalité importante des cellules 158JP. En effet, la DE_{50} (dose efficace tuant 50% des cellules) de tunicamycine pour les OL 158JP est 67% plus faible que la DE_{50} pour les OL 158N. Ce résultat consolide l'idée que la mutation PLP prédispose les cellules 158JP à l'apoptose induite par le stress du RE. En conséquence, une légère augmentation du stress du RE (induite par des doses très faibles de tunicamycine) est suffisante pour induire une forte mortalité des OL 158JP car cette légère élévation du stress s'additionne ou s'ajoute au niveau endogène/basal de stress du RE déjà important dans les OL 158JP. La situation est différente dans les cellules contrôles 158N où les niveaux de stress sont très faibles en absence de la mutation de PLP. Dans ces cellules, des doses importantes de tunicamycine sont nécessaires pour induire un stress suffisant pour déclencher les mécanismes d'apoptose. Ces résultats suggèrent que les OL 158JP, qui souffrent d'un stress du RE endogène causé par la production d'une PLP mutante, constituent un modèle pertinent pour tester l'efficacité de molécules destinées à protéger les cellules nerveuses contre l'apoptose induite par le stress du RE.

4.2 Effet protecteur du 4-PBA sur la survie des OL 158JP

Au regard des résultats obtenus, nous avons évalué la capacité du 4-PBA à protéger les OL 158JP contre le stress du RE et l'activation consécutive des processus apoptotiques qui induisent une augmentation de la mort cellulaire dans les OL 158JP. Les effets bénéfiques du 4-PBA sur ces mécanismes ont été démontrés dans des modèles expérimentaux qui ne sont pas relevants pour la PMD mais impliquent une agrégation protéique (voir chapitre 1.4.1.1) (Gardian et al. 2005; Kubota et al. 2006; Cuadrado-Tejedor et al. 2013; Upagupta et al. 2017).

Une étude antérieure a également montré que le 4-PBA stimule la différenciation des cellules 158JP et 158N et augmente l'expression et/ou l'activité de différentes enzymes ou transporteurs (CNpase, le transporteur peroxisomal abcd2, ACOX1 et catalase) (Baarine et al. 2009) mais l'effet protecteur du 4-PBA contre la mort oligodendrocytaire évoquée par le stress du RE n'a jamais été démontré. Nous avons observé qu'un traitement au 4-PBA diminue significativement les niveaux intracellulaires des marqueurs du stress du RE BiP et CHOP. Cette diminution est corrélée a une baisse du ratio apoptotique Bax/Bcl-2. De manière intéressante, un traitement de 24h au 4-PBA provoque une diminution du facteur pro-apoptotique Bax sans induire de changement dans les niveaux intracellulaires du facteur anti-apoptotique Bcl-2. Après 48h de traitement, une augmentation significative de Bcl-2 est observée de manière concomitante à la diminution de Bax. Cet effet est accompagné d'une augmentation effective du pourcentage de cellules vivantes dans les cultures traitées au 4-PBA. Il est intéressant de noter que le traitement au 4-PBA diminue l'expression de CHOP parallèlement à l'augmentation de la survie des OL 158JP. Ces données suggèrent que l'inhibition de CHOP exerce un effet bénéfique dans notre modèle. A l'appui de cette hypothèse, certaines investigations antérieures ont également révélé que le neuroprotecteur valproate, qui inhibe l'expression de CHOP, est aussi capable de protéger les OL et les axones contre la dégénérescence après lésion de la moelle épinière (Penas et al. 2011).

Le mécanisme d'action par lequel le 4-PBA agit sur le stress du RE est attribué à sa capacité à se comporter comme une chaperonne chimique (voir chapitre 1.4.1.1). Ainsi, dans notre modèle, l'interaction entre le 4-PBA et la PLP permettrait de réduire son agrégation au sein du RE. Le 4-PBA possède également une activité inhibitrice des HDACs (Miller et al. 2011) qui laisse penser que son effet bénéfique pourrait passer par la régulation des gènes contrôlant le stress du RE, l'apoptose et/ou la survie cellulaire (Kolb et al. 2015).

4.3 Inefficacité de la rapamycine dans la protection des OL 158JP contre la mort cellulaire

Il a été démontré que la rapamycine exerce un effet cytoprotecteur sur le stress du RE en stimulant le mécanisme d'autophagie (voir chapitre 1.4.1.2) (Kapuy et al. 2014). En fait, la rapamycine diminue indirectement le niveau de stress du RE en augmentant la capacité des cellules à dégrader les agrégats protéiques (Ogata et al. 2006; Rashid et al. 2015; Cai et al. 2016). Contre toute attente, le traitement à la rapamycine a provoqué un effet négatif sur la viabilité des cellules 158JP évaluée par la technique MTT. L'approche complémentaire utilisant le test d'exclusion au bleu de trypan nous a permis de comprendre qu'en réalité la rapamycine n'exerce pas d'effet cytotoxique (anti-survie) sur les OL 158JP mais entraine un ralentissement de la prolifération cellulaire qui se traduit par une diminution du nombre de cellules présentes dans les cultures d'OL 158JP. A l'appui de cette idée, certains travaux antérieurs ont également décrit un effet inhibiteur de la rapamycine sur la prolifération cellulaire (Fingar et al. 2004; Cuyas et al. 2014). Dans tous les cas, il demeure que la stimulation pharmacologique de l'autophagie que la rapamycine est supposée induire ne permet pas d'améliorer la survie des OL 158JP. Cette observation laisse penser que la dégradation de la PLP mutée par les vésicules d'autophagie pourrait être moins efficace que celle de la PLP normale. Une étude antérieure, qui indique que l'autophagie ne dégrade qu'une faible proportion de PLP mutée, démontre que la majorité de la PLP est en fait éliminée par la voie ubiquitine-protéasome (Karim et al. 2010). L'ensemble de ces données suggère donc que la trop faible proportion de PLP mutée éventuellement dégradée par l'autophagie induite par la rapamycine ne suffirait pas pour réduire le niveau de stress du RE évoqué par l'accumulation intracellulaire de PLP pour *in fine* améliorer la survie des OL 158JP.

4.4 Absence d'effet des stéroïdes neuroactifs sur la survie des OL 158JP

Les nombreuses données de la littérature qui démontrent les effets protecteurs des neurostéroïdes et stéroïdes neuroactifs sur les cellules nerveuses nous ont incités à tester la capacité de ces stéroïdes à protéger les OL 158JP contre la mort induite par la PLP mutée (voir chapitre 1.4.2.2). Par ailleurs, une augmentation des taux de stéroïdes neuroactifs tels que la pregnénolone, la progestérone et la DHEA a été observée dans le cerveau des souris jimpy, suggérant que la régulation de la neurostéroïdogenèse pourrait représenter un processus endogène de protection contre la dysmyélinisation (Le Goascogne et al. 2000). Etant donné que l'alloprégnanolone et l'œstradiol sont particulièrement connus pour leurs effets neuroprotecteurs, anti-apoptotiques et/ou modulateurs du stress du RE (Nilsen et al. 2006; Xilouri et Papazafiri 2006; Fu et al. 2014; Kooptiwut et al. 2014; Qian et al. 2015; Lejri et al. 2017) nous avons dans un premier temps concentré nos efforts sur ces stéroïdes. De façon surprenante, les résultats montrent que l'alloprégnanolone et l'œstradiol n'exercent ni d'effets délétères, ni d'actions bénéfiques sur la survie des OL 158JP ou contre le stress du RE. En conséquence, nous avons étendu notre recherche à d'autres stéroïdes neuroactifs tels que la DHEA, la DHT et la progestérone. A l'instar de l'alloprégnanolone et de l'œstradiol, aucune de ces molécules n'a pu contrecarrer la mort des OL 158JP induite par la PLP mutée. Certains travaux antérieurs suggèrent que les stéroïdes anti-progestatifs pourraient exercer un effet protecteur et réducteur de l'apoptose dans un modèle murin de PMD (Prukop et al. 2014). Nous avons aussi testé la capacité de l'acétate d'ulipristal, un antagoniste du récepteur nucléaire de la progestérone, à prévenir la mort cellulaire évoquée par la mutation PLP dans les OL 158JP. L'acétate d'ulipristal n'exerce également aucun effet bénéfique ou délétère sur les OL 158JP. Ces résultats suscitent une interrogation concernant l'expression des récepteurs

stéroïdiens capables de relayer les effets des neurostéroïdes dans les OL 158JP. De manière intéressante, une perte de l'expression des récepteurs κ-opioides par les OL a été observé chez les souris jimpy suggérant que la mutation PLP pourrait également perturber l'expression d'autres récepteurs cellulaires tels que les récepteurs stéroïdiens (Knapp et al. 2009). Ainsi, l'absence ou les anomalies de ces récepteurs chez les OL 158JP pourraient éventuellement expliquer le fait que ces cellules ne répondent pas efficacement aux stéroïdes neuroactifs testés.

5. Conclusion et perspectives

L'ensemble des résultats de cette thèse démontre une corrélation positive entre la mort cellulaire accélérée et les niveaux endogènes élevés de stress du RE et d'apoptose chez les OL 158JP qui sont porteurs de la mutation du gène plp1. La thèse démontre également que le 4-PBA, une molécule chaperonne modulatrice du stress du RE, protège efficacement les OL 158JP contre la mort en réduisant les niveaux cellulaires des marqueurs du stress du RE (BiP, CHOP) et de l'apoptose (ratio Bax/Bcl-2). Ces observations réalisées *in vitro* ouvrent des perspectives intéressantes pour le développement de stratégies protectrices contre la mort cellulaire induite par la mutation de plp1 en utilisant des composés capable de mimer ou d'améliorer davantage les effets du 4-PBA. Pour confirmer cette hypothèse, la première perspective de notre travail sera de vérifier si les effets bénéfiques du 4-PBA sont reproduits *in vivo* chez les souris jimpy porteuses de la mutation PLP. Nous utiliserons donc une combinaison d'approches comportementales, histopathologiques, biochimiques et moléculaires pour vérifier si l'administration de 4-PBA in vivo permet de réduire/corriger la sévérité des symptômes neurologiques des souris jimpy, d'améliorer leur survie (la durée de vie d'une souris jimpy dépasse rarement 30 jours) et de rétablir des niveaux tissulaires normaux des marqueurs de la myéline, du stress du RE et de l'apoptose dans le SNC de ces souris.

La rapamycine qui n'a pas montré d'efficacité dans la protection des OL 158JP contre la mort cellulaire est un modulateur indirect du stress du RE. D'autres molécules capables de moduler directement ou de manière ciblée la réponse UPR ont été identifiées, notamment le GSK2656157 qui inhibe la voie PERK impliquée dans l'apoptose induite par le stress du RE (Axten et al. 2013) et le Guanabenz qui stimule la capacité des protéines chaperonnes à restaurer la conformation des protéines (Tsaytler et al. 2011). Ces molécules seront donc testées dans un premier temps in vitro afin de déterminer leur capacité à protéger les OL

158JP contre la mort cellulaire. Si ces expériences sont concluantes, nous évaluerons également in vivo les effets bénéfiques éventuels du GSK2656157 et du Guanabenz chez les souris jimpy. Notre perspective d'étude avec le GSK2656157 et le Guanabenz est aussi confortée par des données récentes qui démontrent que ces composés régulent positivement la distribution intracellulaire de PLP et la morphologie des OL dérivés de cellules souches de patients PMD (Nevin et al. 2017).

Compte tenu de l'absence surprenante des effets des stéroïdes neuroactifs sur la survie des OL 158JP, une autre perspective de notre travail sera de vérifier l'existence de récepteurs stéroïdiens fonctionnels sur ces cellules. Nous utiliserons des approches moléculaires, biochimiques et immunohistochimiques pour vérifier la présence de divers récepteurs stéroïdiens nucléaires et membranaires sur les OL 158JP et 158N non différenciés mais également différenciés par des traitements au dibutyryl cAMP (dbcAMP) et au 4-PBA (Ghandour et al. 2002; Baarine et al. 2009). Dans l'hypothèse ou certains récepteurs aux stéroïdes seraient mis en évidence dans les OL 158JP et 158N, des analyses pharmacologiques utilisant des agonistes et antagonistes sélectifs de ces récepteurs permettront de vérifier leur fonctionnalité.

Enfin, les lignées d'OL 158N et 158JP que nous avons utilisées sont des cellules immortalisées avec toutes les limites que cela implique. Nous envisagerons donc comme perspective de tester les effets des molécules sur des cultures primaires d'OL réalisées à partir du SNC des souris jimpy, même s'il faut reconnaitre que cette approche sera plus lourde que l'utilisation des lignées cellulaires qui est plus facile et plus rapide pour cribler plusieurs composés à potentiel protecteur contre la mort cellulaire ou oligodendrocytaire.

A terme, nos travaux permettront de proposer des pistes prometteuses pour le développement de stratégies thérapeutiques efficaces contre la PMD et les pathologies de la myéline.

Références

Akwa, Y., H. V. Allain, D. Bentue-Ferrer, C. Berr, N. Bordet, H. Geerts, A. Nieoullon, B. Onteniente et M. Vercelletto (2005). "Neuroprotection and neurodegenerative diseases - From biology to clinical practice." Alz Dis Assoc Dis **19**(4): 226-239.

Al-Saktawi, K., M. McLaughlin, M. Klugmann, A. Schneider, J. A. Barrie, M. C. McCulloch, P. Montague, D. Kirkham, K. A. Nave et I. R. Griffiths (2003). "Genetic background determines phenotypic severity of the Plp rumpshaker mutation." J Neurosci Res **72**(1): 12-24.

Alarifi, S., H. Ali, S. Alkahtani et M. S. Alessia (2017). "Regulation of apoptosis through bcl-2/bax proteins expression and DNA damage by nano-sized gadolinium oxide." Int J Nanomed **12**: 4541-4551.

Aly, H. F., F. M. Metwally et H. H. Ahmed (2011). "Neuroprotective effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) in rat model of Alzheimer's disease." Acta Biochim Pol **58**(4): 513-520.

Amiguet, P., M. V. Gardinier, J. P. Zanetta et J. M. Matthieu (1992). "Purification and Partial Structural and Functional-Characterization of Mouse Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein." J Neurochem **58**(5): 1676-1682.

Anderson, T. J., A. Schneider, J. A. Barrie, M. Klugmann, M. C. McCulloch, D. Kirkham, E. Kyriakides, K. A. Nave et I. R. Griffiths (1998). "Late-onset neurodegeneration in mice with increased dosage of the proteolipid protein gene." J Comp Neurol **394**(4): 506-519.

Ando, S., Y. Tanaka, Y. Toyoda et K. Kon (2003). "Turnover of myelin lipids in aging brain." Neurochem Res **28**(1): 5-13.

Axten, J. M., S. P. Romeril, A. Shu, J. Ralph, J. R. Medina, Y. H. Feng, W. H. H. Li, S. W. Grant, D. A. Heerding, E. Minthorn, T. Mencken, N. Gaul, A. Goetz, T. Stanley, A. M. Hassell, R. T. Gampe, C. Atkins et R. Kumar (2013). "Discovery of GSK2656157: An Optimized PERK Inhibitor Selected for Preclinical Development." Acs Med Chem Lett **4**(10): 964-968.

Azm, S. A. N., M. Vafa, M. Sharifzadeh, M. Safa, A. Barati et A. Mirshafiey (2017). "Effects of M2000 (D-Mannuronic Acid) on Learning, Memory Retrieval, and Associated Determinants in a Rat Model of Alzheimer's Disease." Am J Alzheimers Dis **32**(1): 12-21.

Baarine, M., K. Ragot, E. C. Genin, H. El Hajj, D. Trompier, P. Andreoletti, M. S. Ghandour, F. Menetrier, M. Cherkaoui-Malki, S. Savary et G. Lizard (2009). "Peroxisomal and mitochondrial status of two murine oligodendrocytic cell lines (158N, 158JP): potential models for the study of peroxisomal disorders associated with dysmyelination processes." J Neurochem **111**(1): 119-131.

Barkovich, A. J., B. O. Kjos, D. E. Jackson et D. Norman (1988). "Normal Maturation of the Neonatal and Infant Brain - Mr Imaging at 1.5 T." Radiology **166**(1): 173-180.

Baron, W. et D. Hoekstra (2010). "On the biogenesis of myelin membranes: Sorting, trafficking and cell polarity." FEBS letters **584**(9): 1760-1770.

Bartzokis, G. (2004). "Age-related myelin breakdown: a developmental model of cognitive decline and Alzheimer's disease." Neurobiol Aging **25**(1): 5-18.

Bartzokis, G. (2011). "Alzheimer's disease as homeostatic responses to age-related myelin breakdown." Neurobiol Aging **32**(8): 1341-1371.

Bauer, N. G., C. Richter-Landsberg et C. Ffrench-Constant (2009). "Role of the Oligodendroglial Cytoskeleton in Differentiation and Myelination." Glia **57**(16): 1691-1705.

Baulieu, E. E. (1991). "Neurosteroids - a New Function in the Brain." Biol Cell **71**(1-2): 3-10.

Baulieu, E. E., P. Robel et M. Schumacher (2001). "Neurosteroids: Beginning of the story." Int Rev Neurobiol **46**: 1-32.

Baumann, N. et D. Pham-Dinh (2001). "Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system." Physiol Rev **81**(2): 871-927.

Baumann, O. et B. Walz (2001). "Endoplasmic reticulum of animal cells and its organization into structural and functional domains." Int Rev Cytol **205**: 149-214.

Beato, M. et J. Klug (2000). "Steroid hormone receptors: an update." Hum Reprod Update **6**(3): 225-236.

Beck, C. R., C. M. B. Carvalho, L. Banser, T. Gambin, D. Stubbolo, B. Yuan, K. Sperle, S. M. McCahan, M. Henneke, P. Seeman, J. Y. Garbern, G. M. Hobson et J. R. Lupski (2015). "Complex Genomic Rearrangements at the PLP1 Locus Include Triplication and Quadruplication." Plos Genet **11**(3).

Benedetti, F., M. Absinta, M. A. Rocca, D. Radaelli, S. Poletti, A. Bernasconi, S. Dallaspezia, E. Pagani, A. Falini, M. Copetti, C. Colombo, G. Comi, E. Smeraldi et M. Filippi (2011). "Tract-specific white matter structural disruption in patients with bipolar disorder." Bipolar Disord **13**(4): 414-424.

Bercury, K. K. et W. B. Macklin (2015). "Dynamics and Mechanisms of CNS Myelination." Dev Cell **32**(4): 447-458.

Bertolotti, A., Y. H. Zhang, L. M. Hendershot, H. P. Harding et D. Ron (2000). "Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response." Nat Cell Biol **2**(6): 326-332.

Bjartmar, C., J. Battistuta, N. Terada, E. Dupree et B. D. Trapp (2002). "N-acetylaspartate is an axon-specific marker of mature white matter in vivo: A biochemical and immunohistochemical study on the rat optic nerve." Ann Neurol **51**(1): 51-58.

Boespflug-Tanguy, O., P. Labauge, A. Fogli et C. Vaurs-Barriere (2008). "Genes involved in leukodystrophies: A glance at glial functions." Curr Neurol Neurosci **8**(3): 217-229.

Boggs, J. M. (2006). "Myelin basic protein: a multifunctional protein." Cell Mol Life Sci **63**(17): 1945-1961.

Boiko, T., M. N. Rasband, S. R. Levinson, J. H. Caldwell, G. Mandel, J. S. Trimmer et G. Matthews (2001). "Compact myelin dictates the differential targeting of two sodium channel isoforms in the same axon." Neuron **30**(1): 91-104.

Boison, D., H. Bussow, D. Durso, H. W. Muller et W. Stoffel (1995). "Adhesive Properties of Proteolipid Protein Are Responsible for the Compaction of Cns Myelin Sheaths." J Neurosci **15**(8): 5502-5513.

Bongarzone, E. R., E. Jacobs, V. Schonmann et A. T. Campagnoni (2001). "Classic and soma-restricted proteolipids are targeted to different subcellular compartments in oligodendrocytes." J Neurosci Res **65**(6): 477-484.

Bonkowsky, J. L., C. Nelson, J. L. Kingston, F. M. Filloux, M. B. Mundorff et R. Srivastava (2010). "The burden of inherited leukodystrophies in children." Neurology **75**(8): 718-725.

Borowicz, K. K., B. Piskorska, M. Banach et S. J. Czuczwar (2011). "Neuroprotective actions of neurosteroids." Front Endocrinol **2**: 50.

Boucher, S. E. M., M. A. Cypher, L. R. Carlock et R. P. Skoff (2002). "Proteolipid protein gene modulates viability and phenotype of neurons." J Neurosci **22**(5): 1772-1783.

Bove, J., M. Martinez-Vicente et M. Vila (2011). "Fighting neurodegeneration with rapamycin: mechanistic insights." Nat Rev Neurosci **12**(8): 437-452.

Brunner, C., H. Lassmann, T. V. Waehneldt, J. M. Matthieu et C. Linington (1989). "Differential Ultrastructural-Localization of Myelin Basic-Protein, Myelin Oligodendroglial Glycoprotein, and 2',3'-Cyclic Nucleotide 3'-Phosphodiesterase in the Cns of Adult-Rats." J Neurochem **52**(1): 296-304.

Bugiani, M., S. Al Shahwan, E. Lamantea, A. Bizzi, E. Bakhsh, I. Moroni, M. R. Balestrini, G. Uziel et M. Zeviani (2006). "GJA12 mutations in children with recessive hypomyelinating leukoencephalopathy." Neurology **67**(2): 273-279.

Burrows, J. A. J., L. K. Willis et D. H. Perlmutter (2000). "Chemical chaperones mediate increased secretion of mutant alpha 1-antitrypsin (alpha 1-AT) Z: A potential pharmacological strategy for prevention of liver injury and emphysema in alpha 1-AT deficiency." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(4): 1796-1801.

Butt, A. M., M. Ibrahim, F. M. Ruge et M. Berry (1995). "Biochemical subtypes of oligodendrocyte in the anterior medullary velum of the rat as revealed by the monoclonal antibody Rip." Glia **14**(3): 185-197.

Cai, J., Y. C. Qi, X. M. Hu, M. Tan, Z. J. Liu, J. S. Zhang, Q. Li, M. Sander et M. Qiu (2005). "Generation of oligodendrocyte precursor cells from mouse dorsal spinal cord independent of Nkx6 regulation and Shh signaling." Neuron **45**(1): 41-53.

Cai, Y., J. Arikkath, L. Yang, M. L. Guo, P. Periyasamy et S. Buch (2016). "Interplay of endoplasmic reticulum stress and autophagy in neurodegenerative disorders." Autophagy **12**(2): 225-244.

Cailloux, F., F. Gauthier-Barichard, C. Mimault, V. Isabelle, V. Courtois, G. Giraud, B. Dastugue, O. Boespflug-Tanguy et C. E. N. B. Dysmye (2000). "Genotype-phenotype correlation in inherited brain myelination defects due to proteolipid protein gene mutations." Eur J Hum Genet **8**(11): 837-845.

Cambi, F., X. M. Tang, P. Cordray, P. R. Fain, L. D. Keppen et D. F. Barker (1996). "Refined genetic mapping and proteolipid protein mutation analysis in X-linked pure hereditary spastic paraplegia." Neurology **46**(4): 1112-1117.

Campagnoni, A. T., T. M. Pribyl, C. W. Campagnoni, K. Kampf, S. Amurumarjee, C. F. Landry, V. W. Handley, S. L. Newman, B. Garbay et K. Kitamura (1993). "Structure and Developmental Regulation of Golli-Mbp, a 105-Kilobase Gene That Encompasses the Myelin Basic-Protein Gene and Is Expressed in Cells in the Oligodenrocyte Lineage in the Brain." J Biol Chem **268**(7): 4930-4938.

Campagnoni, C. W., B. Garbay, P. Micevych, T. Pribyl, K. Kampf, V. W. Handley et A. T. Campagnoni (1992). "Dm20 Messenger-Rna Splice Product of the Myelin Proteolipid Protein Gene Is Expressed in the Murine Heart." J Neurosci Res **33**(1): 148-155.

Carnegie, P. R. (1971). "Amino acid sequence of the encephalitogenic basic protein from human myelin." Biochem J **123**(1): 57-67.

Cerghet, M., D. A. Bessert, K. A. Nave et R. P. Skoff (2001). "Differential expression of apoptotic markers in jimpy and in Plp overexpressors: evidence for different apoptotic pathways." J Neurocytol **30**(9-10): 841-855.

Chan, J. R., P. M. Rodriguez-Waitkus, B. K. Ng, P. Liang et M. Glaser (2000). "Progesterone synthesized by Schwann cells during myelin formation regulates neuronal gene expression." Mol Biol Cell **11**(7): 2283-2295.

Chapman, H., R. R. Waclaw, Z. L. Pei, M. Nakafuku et K. Campbell (2013). "The homeobox gene Gsx2 controls the timing of oligodendroglial fate specification in mouse lateral ganglionic eminence progenitors." Development **140**(11): 2289-2298.

Charalampopoulos, L., C. Tsatsanis, E. Dermitzaki, V. I. Alexaki, E. Castanas, A. N. Margioris et A. Gravanis (2004). "Dehydroepiandrosterone and allopregnanolone protect sympathoadrenal medulla cells against apoptosis via antiapoptotic Bcl-2 proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(21): 8209-8214.

Cuadrado-Tejedor, M., A. L. Ricobaraza, R. Torrijo, R. Franco et A. Garcia-Osta (2013). "Phenylbutyrate is a Multifaceted Drug that Exerts Neuroprotective Effects and Reverses the Alzheimer's Disease-like Phenotype of a Commonly Used Mouse Model." Curr Pharm Design **19**(28): 5076-5084.

Cunnea, P., A. N. Mhaille, S. McQuaid, M. Farrell, J. McMahon et U. FitzGerald (2011). "Expression profiles of endoplasmic reticulum stress-related molecules in demyelinating lesions and multiple sclerosis." Mult Scler J **17**(7): 808-818.

Cuyas, E., B. Corominas-Faja, J. Joven et J. A. Menendez (2014). "Cell cycle regulation by the nutrient-sensing mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway." Methods Mol Biol **1170**: 113-144.

Czabotar, P. E., G. Lessene, A. Strasser et J. M. Adams (2014). "Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy." Nat Rev Mol Cell Bio **15**(1): 49-63.

Dai, R. Y., S. K. Chen, D. M. Yan, R. Chen, Y. P. Liu, C. Y. Duan, J. Li, T. He et H. Li (2010). "PI3K/Akt Promotes GRP78 Accumulation and Inhibits Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Apoptosis in HEK293 Cells." Folia Biol-Prague **56**(2): 37-46.

Dautigny, A., M. G. Mattei, D. Morello, P. M. Alliel, D. Pham-Dinh, L. Amar, D. Arnaud, D. Simon, J. F. Mattei, J. L. Guenet et et al. (1986). "The structural gene coding for myelin-associated proteolipid protein is mutated in jimpy mice." Nature **321**(6073): 867-869.

Davis, K. L., D. G. Stewart, J. I. Friedman, M. Buchsbaum, P. D. Harvey, P. R. Hof, J. Buxbaum et V. Haroutunian (2003). "White matter changes in schizophrenia - Evidence for myelin-related dysfunction." Arch Gen Psychiat **60**(5): 443-456.

de Castro, F. et A. Bribian (2005). "The molecular orchestra of the migration of oligodendrocyte precursors during development." Brain Res Rev **49**(2): 227-241.

de Castro, F., A. Bribian et M. C. Ortega (2013). "Regulation of oligodendrocyte precursor migration during development, in adulthood and in pathology." Cell Mol Life Sci **70**(22): 4355-4368.

de Seze, J., L. Kremer et N. Collongues (2016). "Neuromyelitis optica spectrum disorder (NMOSD): A new concept." Rev Neurol-France **172**(4-5): 256-262.

Deng, H. D., P. Kuang, H. M. Cui, L. Chen, Q. Luo, J. Fang, Z. C. Zuo, J. L. Deng, X. Wang et L. Zhao (2016). "Sodium fluoride (NaF) induces the splenic apoptosis via endoplasmic reticulum (ER) stress pathway in vivo and in vitro." Aging-Us **8**(12): 3552-3567.

Dhaunchak, A. S., D. R. Colman et K. A. Nave (2011). "Misalignment of PLP/DM20 Transmembrane Domains Determines Protein Misfolding in Pelizaeus-Merzbacher Disease." J Neurosci **31**(42): 14961-14971.

Dietrich, J. (2010). "Chemotherapy Associated Central Nervous System Damage." Adv Exp Med Biol **678**: 77-85.

Dietschy, J. M. et S. D. Turley (2004). "Cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal." J Lipid Res **45**(8): 1375-1397.

Duncan, I. D., J. P. Hammang, S. Goda et R. H. Quarles (1989). "Myelination in the Jimpy Mouse in the Absence of Proteolipid Protein." Glia **2**(3): 148-154.

Duncan, I. D., Y. Kondo et S. C. Zhang (2011). "The Myelin Mutants as Models to Study Myelin Repair in the Leukodystrophies." Neurotherapeutics **8**(4): 607-624.

Duplan, E., E. Giaime, J. Viotti, J. Sevalle, O. Corti, A. Brice, H. Ariga, L. Qi, F. Checler et C. A. da Costa (2013). "ER-stress-associated functional link between Parkin and DJ-1 via a transcriptional cascade involving the tumor suppressor p53 and the spliced X-box binding protein XBP-1." J Cell Sci **126**(9): 2124-2133.

Edgar, J. M., M. McLaughlin, D. Yool, S. C. Zhang, J. H. Fowler, P. Montague, J. A. Barrie, M. C. McCulloch, I. D. Duncan, J. Garbern, K. A. Nave et I. R. Griffiths (2004). "Oligodendroglial modulation of fast axonal transport in a mouse model of hereditary spastic paraplegia." J Cell Biol **166**(1): 121-131.

Elmore, S. (2007). "Apoptosis: A review of programmed cell death." Toxicol Pathol **35**(4): 495-516.

Eylar, E. H., S. Brostoff, G. Hashim, J. Caccam et P. Burnett (1971). "Basic A1 protein of the myelin membrane. The complete amino acid sequence." J Biol Chem **246**(18): 5770-5784.

Feldmann, A., C. Winterstein, R. White, J. Trotter et E. M. Kramer-Albers (2009). "Comprehensive Analysis of Expression, Subcellular Localization, and Cognate Pairing of SNARE Proteins in Oligodendrocytes." J Neurosci Res **87**(8): 1760-1772.

Feutz, A. C., D. Pham-Dinh, B. Allinquant, M. Miehe et M. S. Ghandour (2001). "An immortalized jimpy oligodendrocyte cell line: defects in cell cycle and cAMP pathway." Glia **34**(4): 241-252.

Fingar, D. C., C. J. Richardson, A. R. Tee, L. Cheatham, C. Tsou et J. Blenis (2004). "mTOR controls cell cycle progression through its cell growth effectors S6K1 and 4E-BP1/eukaryotic translation initiation factor 4E." Mol Cell Biol **24**(1): 200-216.

Flamment, M., E. Hajduch, P. Ferre et F. Foufelle (2012). "New insights into ER stress-induced insulin resistance." Trends Endocrin Met **23**(8): 381-390.

Fogarty, M., W. D. Richardson et N. Kessaris (2005). "A subset of oligodendrocytes generated from radial glia in the dorsal spinal cord." Development **132**(8): 1951-1959.

Folch, J. et M. Lees (1951). "Proteolipides, a new type of tissue lipoproteins; their isolation from brain." J Biol Chem **191**(2): 807-817.

Folch, J., M. Lees et G. H. Sloane Stanley (1957). "A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues." J Biol Chem **226**(1): 497-509.

Fornari, E., P. Maeder, R. Meuli, J. Ghika et M. G. Knyazeva (2012). "Demyelination of superficial white matter in early Alzheimer's disease: a magnetization transfer imaging study." Neurobiol Aging **33**(2).

Fouillet, A., C. Levet, A. Virgone, M. Robin, P. Dourlen, J. Rieusset, E. Belaidi, M. Ovize, M. Touret, S. Nataf et B. Mollereau (2012). "ER stress inhibits neuronal death by promoting autophagy." Autophagy **8**(6): 915-926.

Fribley, A., K. Zhang et R. J. Kaufman (2009). "Regulation of apoptosis by the unfolded protein response." Methods Mol Biol **559**: 191-204.

Frye, C. A., C. J. Koonce et A. A. Walf (2014). "Novel receptor targets for production and action of allopregnanolone in the central nervous system: a focus on pregnane xenobiotic receptor." Front Cell Neurosci **8**: 8-106.

Fu, Z. Q., F. Zou, H. Deng, H. Y. Zhou et L. J. Liu (2014). "Estrogen protects SGC7901 cells from endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis by the Akt pathway." Oncol Lett **7**(2): 560-564.

Fujita, E., Y. Kouroku, A. Isoai, H. Kumagai, A. Misutani, C. Matsuda, Y. K. Hayashi et T. Momoi (2007). "Two endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) systems for the novel variant of the mutant dysferlin: ubiquitin/proteasome ERAD(I) and autophagy/lysosome ERAD(II)." Hum Mol Genet **16**(6): 618-629.

Fujita, N., A. Kemper, J. Dupree, H. Nakayasu, U. Bartsch, M. Schachner, N. Maeda, K. Suzuki, K. Suzuki et B. Popko (1998). "The cytoplasmic domain of the large myelin-associated glycoprotein isoform is needed for proper CNS but not peripheral nervous system myelination." J Neurosci **18**(6): 1970-1978.

Gago, N., Y. Akwa, N. Sananes, R. Guennoun, E. E. Baulieu, M. El-Etr et M. Schumacher (2001). "Progesterone and the oligodendroglial lineage: Stage-dependent biosynthesis and metabolism." Glia **36**(3): 295-308.

Gago, N., M. El-Etr, N. Sananes, F. Cadepond, D. Samuel, V. Avellana-Adalid, A. Baron-Van Evercooren et M. Schumacher (2004). "3 alpha,5 alpha-tetrahydroprogesterone (allopregnanolone) and gamma-aminobutyric acid: Autocrine/paracrine interactions in the control of neonatal PSA-NCAM(+) progenitor proliferation." J Neurosci Res **78**(6): 770-783.

Garbern, J. Y. (2007). "Pelizaeus-Merzbacher disease: Genetic and cellular pathogenesis." Cell Mol Life Sci **64**(1): 50-65.

Garbern, J. Y., D. A. Yool, G. J. Moore, I. B. Wilds, M. W. Faulk, M. Klugmann, K. A. Nave, E. A. Sistermans, M. S. van der Knaap, T. D. Bird, M. E. Shy, J. A. Kamholz et I. R. Griffiths (2002). "Patients lacking the major CNS myelin protein, proteolipid protein 1, develop length-dependent axonal degeneration in the absence of demyelination and inflammation." Brain **125**: 551-561.

Garcia-Saez, A. J. (2012). "The secrets of the Bcl-2 family." Cell Death Differ **19**(11): 1733-1740.

Garcia-Segura, L. M. et J. Balthazart (2009). "Steroids and neuroprotection: New advances." Front Neuroendocrin **30**(2): V-Ix.

Gardian, G., S. E. Browne, D. K. Choi, P. Klivenyi, J. Gregorio, J. K. Kubilus, H. Ryu, B. Langley, R. R. Ratan, R. J. Ferrante et M. F. Beal (2005). "Neuroprotective effects of phenylbutyrate in the N171-82Q transgenic mouse model of Huntington's disease." J Biol Chem **280**(1): 556-563.

Gardinier, M. V. et W. B. Macklin (1988). "Myelin Proteolipid Protein Gene-Expression in Jimpy and Jimpymsd Mice." J Neurochem **51**(2): 360-369.

Gardner, B. M. et P. Walter (2011). "Unfolded Proteins Are Ire1-Activating Ligands That Directly Induce the Unfolded Protein Response." Science **333**(6051): 1891-1894.

Ghandour, M. S., A. C. Feutz, W. Jalabi, O. Taleb, D. Bessert, M. Cypher, L. Carlock et R. P. Skoff (2002). "Trafficking of PLP/DM20 and cAMP signaling in immortalized jimpy oligodendrocytes." Glia **40**(3): 300-311.

Ghoumari, A. M., C. Ibanez, M. El-Etr, P. Leclerc, B. Eychenne, B. W. O'Malley, E. E. Baulieu et M. Schumacher (2003). "Progesterone and its metabolites increase myelin basic protein expression in organotypic slice cultures of rat cerebellum." J Neurochem **86**(4): 848-859.

Gotoh, T., S. Oyadomari, K. Mori et M. Mori (2002). "Nitric oxide-induced apoptosis in RAW 264.7 macrophages is mediated by endoplasmic reticulum stress pathway involving ATF6 and CHOP." J Biol Chem **277**(14): 12343-12350.

Gow, A., V. L. Friedrich et R. A. Lazzarini (1994). "Many Naturally-Occurring Mutations of Myelin Proteolipid Protein Impair Its Intracellular-Transport." J Neurosci Res **37**(5): 574-583.

Gow, A., C. M. Southwood et R. A. Lazzarini (1998). "Disrupted proteolipid protein trafficking results in oligodendrocyte apoptosis in an animal model of Pelizaeus-Merzbacher disease." J Cell Biol **140**(4): 925-934.

Gravel, M., F. Robert, V. Kottis, I. E. Gallouzi, J. Pelletier et P. E. Braun (2009). "2 ',3 '-Cyclic Nucleotide 3 '-Phosphodiesterase: A Novel RNA-Binding Protein That Inhibits Protein Synthesis." J Neurosci Res **87**(5): 1069-1079.

Greer, J. M. et M. B. Lees (2002). "Myelin proteolipid protein - the first 50 years." Int J Biochem Cell B **34**(3): 211-215.

Griffin, L. D., W. Gong, L. Verot et S. H. Mellon (2004). "Niemann-Pick type C disease involves disrupted neurosteroidogenesis and responds to allopregnanolone." Nat Med **10**(7): 704-711.

Griffiths, I., M. Klugmann, T. Anderson, D. Yool, C. Thomson, M. H. Schwab, A. Schneider, F. Zimmermann, M. McCulloch, N. Nadon et K. A. Nave (1998). "Axonal swellings and degeneration in mice lacking the major proteolipid of myelin." Science **280**(5369): 1610-1613.

Griffiths, I. R., L. S. Mitchell, K. Mcphilemy, S. Morrison, E. Kyriakides et J. A. Barrie (1989). "Expression of Myelin Protein Genes in Schwann-Cells." J Neurocytol **18**(3): 345-352.

Griffiths, I. R., I. Scott, M. C. Mcculloch, J. A. Barrie, K. Mcphilemy et B. M. Cattanach (1990). "Rumpshaker Mouse - a New X-Linked Mutation Affecting Myelination - Evidence for a Defect in Plp Expression." J Neurocytol **19**(2): 273-283.

Grimm, A., A. G. Mensah-Nyagan et A. Eckert (2016). "Alzheimer, mitochondria and gender." Neurosci Biobehav R **67**: 89-101.

Grimm, A., K. Schmitt, U. E. Lang, A. G. Mensah-Nyagan et A. Eckert (2014). "Improvement of neuronal bioenergetics by neurosteroids: Implications for age-related neurodegenerative disorders." Biochim Biophys Acta **1842**(12): 2427-2438.

Guennoun, R., Y. Benmessahel, B. Delespierre, M. Gouezou, K. M. Rajkowski, E. Baulieu et M. Schumacher (2001). "Progesterone stimulates Krox-20 gene expression in Schwann cells." Mol Brain Res **90**(1): 75-82.

Guerriero, C. J. et J. L. Brodsky (2012). "The Delicate Balance between Secreted Protein Folding and Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation in Human Physiology." Physiol Rev **92**(2): 537-576.

Gupta, S., A. Deepti, S. Deegan, F. Lisbona, C. Hetz et A. Samali (2010). "HSP72 Protects Cells from ER Stress-induced Apoptosis via Enhancement of IRE1 alpha-XBP1 Signaling through a Physical Interaction." PLoS biology **8**(7).

Gurtler, A., N. Kunz, M. Gomolka, S. Hornhardt, A. A. Friedl, K. McDonald, J. E. Kohn et A. Posch (2013). "Stain-Free technology as a normalization tool in Western blot analysis." Anal Biochem **433**(2): 105-111.

Harauz, G. et J. M. Boggs (2013). "Myelin management by the 18.5-kDa and 21.5-kDa classic myelin basic protein isoforms." J Neurochem **125**(3): 334-361.

Hardy, T. A. et D. H. Miller (2014). "Balo's concentric sclerosis." Lancet Neurol **13**(7): 740-746.

Harrison, P. J. et D. R. Weinberger (2005). "Schizophrenia genes, gene expression, and neuropathology: on the matter of their convergence." Mol Psychiatr **10**(1): 40-68.

Harsan, L., W. Jalabi, D. Grucker et M. S. Ghandour (2004). "New insights on neuronal alterations in jimpy mutant brain." Neurochem Res **29**(5): 943-952.

Hatahet, F. et L. W. Ruddock (2009). "Protein Disulfide Isomerase: A Critical Evaluation of Its Function in Disulfide Bond Formation." Antioxid Redox Sign **11**(11): 2807-2850.

Heim, P., M. Claussen, B. Hoffmann, E. Conzelmann, J. Gartner, K. Harzer, D. H. Hunneman, W. Kohler, G. Kurlemann et A. Kohlschutter (1997). "Leukodystrophy incidence in Germany." Am J Med Genet **71**(4): 475-478.

Hetz, C., F. Martinon, D. Rodriguez et L. H. Glimcher (2011). "The Unfolded Protein Response: Integrating Stress Signals through the Stress Sensor Ire1 Alpha." Physiol Rev **91**(4): 1219-1243.

Hetz, C. et B. Mollereau (2014). "Disturbance of endoplasmic reticulum proteostasis in neurodegenerative diseases." Nat Rev Neurosci **15**(4): 233-249.

Hetz, C., M. Russelakis-Carneiro, K. Maundrell, J. Castilla et C. Soto (2003). "Caspase-12 and endoplasmic reticulum stress mediate neurotoxicity of pathological prion protein." Embo J **22**(20): 5435-5445.

Hetz, C., M. Russelakis-Carneiro, S. Walchli, S. Carboni, E. Vial-Knecht, K. Maundrell, J. Castilla et C. Soto (2005). "The disulfide isomerase Grp58 is a protective factor against prion neurotoxicity." J Neurosci **25**(11): 2793-2802.

Hobson, G. M. et J. Y. Garbern (2012). "Pelizaeus-Merzbacher Disease, Pelizaeus-Merzbacher-Like Disease 1, and Related Hypomyelinating Disorders." Semin Neurol **32**(1): 62-67.

Hobson, G. M. et J. Kamholz. (1999, 2013). "PLP1-Related Disorders." Retrieved 2017, from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1182/.

Hodes, M. E., C. A. Blank, V. M. Pratt, J. Morales, J. Napier et S. R. Dlouhy (1997). "Nonsense mutation in exon 3 of the proteolipid protein gene (PLP) in a family with an unusual form of Pelizaeus-Merzbacher disease." Am J Med Genet **69**(2): 121-125.

Hodes, M. E., W. E. Demyer, V. M. Pratt, M. K. Edwards et S. R. Dlouhy (1995). "Girl with Signs of Pelizaeus-Merzbacher Disease Heterozygous for a Mutation in Exon-2 of the Proteolipid Protein Gene." Am J Med Genet **55**(4): 397-401.

Hoozemans, J. J. M., E. S. van Haastert, P. Eikelenboom, R. A. I. de Vos, J. M. Rozemuller et W. Scheper (2007). "Activation of the unfolded protein response in Parkinson's disease." Biochem Bioph Res Co **354**(3): 707-711.

Hoozemans, J. J. M., E. S. van Haastert, D. A. T. Nijholt, A. J. M. Rozemuller, P. Eikelenboom et W. Scheper (2009). "The Unfolded Protein Response Is Activated in Pretangle Neurons in Alzheimer's Disease Hippocampus." Am J Pathol **174**(4): 1241-1251.

Hoozemans, J. J. M., R. Veerhuis, E. S. Van Haastert, J. M. Rozemuller, F. Baas, P. Eikelenboom et W. Scheper (2005). "The unfolded protein response is activated in Alzheimer's disease." Acta Neuropathol **110**(2): 165-172.

Hudson, L. D., C. Puckett, J. Berndt, J. Chan et S. Gencic (1989). "Mutation of the Proteolipid Protein Gene Plp in a Human X Chromosome-Linked Myelin Disorder." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(20): 8128-8131.

Hughes, E. G. et B. Appel (2016). "The cell biology of CNS myelination." Curr Opin Neurobiol **39**: 93-100.

Hurst, S., J. Garbern, A. Trepanier et A. Gow (2006). "Quantifying the carrier female phenotype in Pelizaeus-Merzbacher disease." Genet Med **8**(6): 371-378.

Hussain, R., A. M. Ghoumari, B. Bielecki, J. Steibel, N. Boehm, P. Liere, W. B. Macklin, N. Kumar, R. Habert, S. Mhaouty-Kodja, F. Tronche, R. Sitruk-Ware, M. Schumacher et M. S. Ghandour (2013). "The neural androgen receptor: a therapeutic target for myelin repair in chronic demyelination." Brain **136**: 132-146.

Huttemann, M., Z. Zhang, C. Mullins, D. Bessert, I. Lee, K. A. Nave, S. Appikatla et R. P. Skoff (2009). "Different proteolipid protein mutants exhibit unique metabolic defects." Asn Neuro **1**(3).

Ikeda, M., M. I. Hossain, L. Zhou, M. Horie, K. Ikenaka, A. Horii et H. Takebayashi (2016). "Histological detection of dynamic glial responses in the dysmyelinating Tabby-jimpy mutant brain." Anat Sci Int.

Inden, M., Y. Kitamura, H. Takeuchi, T. Yanagida, K. Takata, Y. Kobayashi, T. Taniguchi, K. Yoshimoto, M. Kaneko, Y. Okuma, T. Taira, H. Ariga et S. Shimohama (2007). "Neurodegeneration of mouse nigrostriatal dopaminergic system induced by repeated oral administration of

rotenone is prevented by 4-phenylbutyrate, a chemical chaperone." J Neurochem **101**(6): 1491-1504.

Inoue, K. (2005). "PLP1-related inherited dysmyelinating disorders: Pelizaeus-Merzbacher disease and spastic paraplegia type 2." Neurogenetics **6**(1): 1-16.

Inoue, K., H. Osaka, V. C. Thurston, J. T. R. Clarke, A. Yoneyama, L. Rosenbarker, T. D. Bird, M. E. Hodes, L. G. Shaffer et J. R. Lupski (2002). "Genomic rearrangements resulting in PLP1 deletion occur by non-homologous end-joining and cause different dysmyelinating phenotypes in males and females." Am J Hum Genet **71**(4): 509-509.

Inoue, K., H. Tanaka, F. Scaglia, A. Araki, L. G. Shaffer et J. R. Lupski (2001). "Compensating for central nervous system dysmyelination: Females with a proteolipid protein gene duplication and sustained clinical improvement." Ann Neurol **50**(6): 747-754.

Irwin, R. W., C. M. Solinsky et R. D. Brinton (2014). "Frontiers in therapeutic development of allopregnanolone for Alzheimer's disease and other neurological disorders." Front Cell Neurosci **8** :203.

Jacob, M. H. V. M., D. D. Janner, A. S. D. Araujo, M. P. Jahn, L. C. R. Kucharski, T. B. Moraes, C. S. Dutra, M. F. M. Ribeiro et A. Bello-Klein (2011). "Dehydroepiandrosterone improves hepatic antioxidant reserve and stimulates Akt signaling in young and old rats." J Steroid Biochem **127**(3-5): 331-336.

Jacobs, E. C., E. R. Bongarzone, C. W. Campagnoni et A. T. Campagnoni (2004). "Embryonic expression of the soma-restricted products of the myelin proteolipid gene in motor neurons and muscle." Neurochem Res **29**(5): 997-1002.

Jahn, O., S. Tenzer et H. B. Werner (2009). "Myelin Proteomics: Molecular Anatomy of an Insulating Sheath." Mol Neurobiol **40**(1): 55-72.

Jeske, D. J. et J. M. Dietschy (1980). "Regulation of rates of cholesterol synthesis in vivo in the liver and carcass of the rat measured using [3H]water." J Lipid Res **21**(3): 364-376.

Jiang, H. B., S. Q. Xiong et X. B. Xia (2014). "Chemical chaperone 4-phenylbutyrate prevents endoplasmic reticulum stress induced by T17M rhodopsin." Cell Biosci **4**.

Johns, T. G. et C. C. A. Bernard (1999). "The structure and function of myelin oligodendrocyte glycoprotein." J Neurochem **72**(1): 1-9.

Jung, M., I. Sommer, M. Schachner et K. A. Nave (1996). "Monoclonal antibody O10 defines a conformationally sensitive cell-surface epitope of proteolipid protein (PLP): Evidence that PLP misfolding underlies dysmyelination in mutant mice." J Neurosci **16**(24): 7920-7929.

Kagawa, T., K. Ikenaka, Y. Inoue, S. Kuriyama, T. Tsujii, J. Nakao, K. Nakajima, J. Aruga, H. Okano et K. Mikoshiba (1994). "Glial-Cell Degeneration and Hypomyelination Caused by Overexpression of Myelin Proteolipid Protein Gene." Neuron **13**(2): 427-442.

Kantor, L., H. P. Harding, D. Ron, R. Schiffmann, C. R. Kaneski, S. R. Kimball et O. Elroy-Stein (2005). "Heightened stress response in primary fibroblasts expressing mutant eIF2B genes from CACH/VWM leukodystrophy patients." Hum Genet **118**(1): 99-106.

Kantor, L., D. Pinchasi, M. Mintz, Y. Hathout, A. Vanderver et O. Elroy-Stein (2008). "A Point Mutation in Translation Initiation Factor 2B Leads to a Continuous Hyper Stress State in Oligodendroglial-Derived Cells." Plos One **3**(11).

Kapuy, O., P. K. Vinod et G. Banhegyi (2014). "mTOR inhibition increases cell viability via autophagy induction during endoplasmic reticulum stress - An experimental and modeling study." Febs Open Bio **4**: 704-713.

Karim, S. A., J. A. Barrie, M. C. McCulloch, M. Montague, J. M. Edgar, D. Kirkham, T. J. Anderson, K. A. Nave, I. R. Griffiths et M. Mclaughlin (2007). "PLP overexpression perturbs myelin protein composition and myelination in a mouse model of Pelizaeus-Merzbacher disease." Glia **55**(4): 341-351.

Karim, S. A., J. A. Barrie, M. C. Mcculloch, P. Montague, J. M. Edgar, D. L. Iden, T. J. Anderson, K. A. Nave, I. R. Griffiths et M. McLaughlin (2010). "PLP/DM20 Expression and Turnover in a Transgenic Mouse Model of Pelizaeus-Merzbacher Disease." Glia **58**(14): 1727-1738.

Kashani, I. R., A. Hedayatpour, P. Pasbakhsh, L. Kafami, B. Khallaghi et F. Malek (2015). "Progesterone Enhanced Remyelination in the Mouse Corpus Callosum after Cuprizone Induced Demyelination." Iran J Med Sci **40**(6): 507-514.

Katayama, T., K. Imaizumi, A. Honda, T. Yoneda, T. Kudo, M. Takeda, K. Mori, R. Rozmahel, P. Fraser, P. St George-Hyslop et M. Tohyama (2001). "Disturbed activation of endoplasmic reticulum stress transducers by familial Alzheimer's disease-linked presenilin-1 mutations." J Biol Chem **276**(46): 43446-43454.

Kerner, A. L. et J. H. Carson (1984). "Effect of the Jimpy Mutation on Expression of Myelin Proteins in Heterozygous and Hemizygous Mouse-Brain." J Neurochem **43**(6): 1706-1715.

Kessaris, N., M. Fogarty, P. Iannarelli, M. Grist, M. Wegner et W. D. Richardson (2006). "Competing waves of oligodendrocytes in the forebrain and postnatal elimination of an embryonic lineage." Nat neurosci **9**(2): 173-179.

Khan, M. S., T. Ali, M. N. Abid, M. H. Jo, A. Khan, M. W. Kim, G. H. Yoon, E. W. Cheon, S. U. Rehman et M. O. Kim (2017). "Lithium ameliorates lipopolysaccharide-induced neurotoxicity in the cortex and hippocampus of the adult rat brain." Neurochem Int **108**: 343-354.

Kimonides, V. G., N. H. Khatibi, C. N. Svendsen, M. V. Sofroniew et J. Herbert (1998). "Dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA-sulfate (DHEAS) protect hippocampal neurons against excitatory amino acid-induced neurotoxicity." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(4): 1852-1857.

Klionsky, D. J. et S. D. Emr (2000). "Cell biology - Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation." Science **290**(5497): 1717-1721.

Klugmann, M., M. H. Schwab, A. Puhlhofer, A. Schneider, F. Zimmermann, I. R. Griffiths et K. A. Nave (1997). "Assembly of CNS myelin in the absence of proteolipid protein." Neuron **18**(1): 59-70.

Knapp, P. E., V. V. Adjan et K. F. Hauser (2009). "Cell-specific loss of kappa-opioid receptors in oligodendrocytes of the dysmyelinating jimpy mouse." Neurosci Lett **451**(2): 114-118.

Knapp, P. E., S. Ismaili, K. F. Hauser et M. S. Ghandour (1999). "Abnormal Ca2+ regulation in oligodendrocytes from the dysmyelinating jimpy mouse." Brain Res **847**(2): 332-337.

Knapp, P. E., R. P. Skoff et D. W. Redstone (1986). "Oligodendroglial Cell-Death in Jimpy Mice - an Explanation for the Myelin Deficit." J Neurosci **6**(10): 2813-2822.

Koenig, H. L., M. Schumacher, B. Ferzaz, A. N. Dothi, A. Ressouches, R. Guennoun, I. Jungtestas, P. Robel, Y. Akwa et E. E. Baulieu (1995). "Progesterone Synthesis and Myelin Formation by Schwann-Cells." Science **268**(5216): 1500-1503.

Koeppen, A. H. (2005). "A brief history of Pelizaeus-Merzbacher disease and proteolipid protein." J Neurol Sci **228**(2): 198-200.

Koeppen, A. H., N. A. Ronca, E. A. Greenfield et M. B. Hans (1987). "Defective Biosynthesis of Proteolipid Protein in Pelizaeus-Merzbacher Disease." Ann Neurol **21**(2): 159-170.

Kolb, P. S., E. A. Ayaub, W. Zhou, V. Yum, J. G. Dickhout et K. Ask (2015). "The therapeutic effects of 4-phenylbutyric acid in maintaining proteostasis." Int J Biochem Cell B **61**: 45-52.

Kooptiwut, S., P. Mahawong, W. Hanchang, N. Semprasert, S. Kaewin, T. Limjindaporn et P. T. Yenchitsomanus (2014). "Estrogen reduces endoplasmic reticulum stress to protect against glucotoxicity induced-pancreatic beta-cell death." J Steroid Biochem **139**: 25-32.

Kubota, K., Y. Niinuma, M. Kaneko, Y. Okuma, M. Sugai, T. Omura, M. Uesugi, T. Uehara, T. Hosoi et Y. Nomura (2006). "Suppressive effects of 4-phenylbutyrate on the aggregation of Pael receptors and endoplasmic reticulum stress." J Neurochem **97**(5): 1259-1268.

Labombarda, F., S. L. Gonzalez, A. Lima, P. Roig, R. Guennoun, M. Schumacher et A. F. De Nicola (2009). "Effects of Progesterone on Oligodendrocyte Progenitors, Oligodendrocyte Transcription Factors, and Myelin Proteins Following Spinal Cord Injury." Glia **57**(8): 884-897.

Lambert, J. J., D. Belelli, D. R. Peden, A. W. Vardy et J. A. Peters (2003). "Neurosteroid modulation of GABAA receptors." Prog Neurobiol **71**(1): 67-80.

Le Goascogne, C., B. Eychenne, M. C. Tonon, F. Lachapelle, N. Baumann et P. Robel (2000). "Neurosteroid progesterone is up-regulated in the brain of jimpy and shiverer mice." Glia **29**(1): 14-24.

Lee, A. G. (2001). "Myelin: Delivery by raft." Curr Biol **11**(2): R60-R62.

Lee, A. S. (2005). "The ER chaperone and signaling regulator GRP78/BiP as a monitor of endoplasmic reticulum stress." Methods **35**(4): 373-381.

Lee, E. S., H. K. Moon, Y. H. Park, J. Garbern et G. M. Hobson (2004). "A case of complicated spastic paraplegia 2 due to a point mutation in the proteolipid protein 1 gene." J Neurol Sci **224**(1-2): 83-87.

Lee, J., M. Gravel, R. L. Zhang, P. Thibault et P. E. Braun (2005). "Process outgrowth in oligodendrocytes is mediated by CNP, a novel microtubule assembly myelin protein." J Cell Biol **170**(4): 661-673.

Leegwater, P. A. J., G. Vermeulen, A. A. M. Konst, S. Naidu, J. Mulders, A. Visser, P. Kersbergen, D. Mobach, D. Fonds, C. G. M. van Berkel, R. J. L. F. Lemmers, R. R. Frants, C. B. M. Oudejans, R. B. H. Schutgens, J. C. Pronk et M. S. van der Knaap (2001). "Subunits of the translation initiation factor eIF2B are mutant in leukoencephalopathy with vanishing white matter." Nat Genet **29**(4): 383-388.

Lei, K. et R. J. Davis (2003). "JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(5): 2432-2437.

Lejri, I., A. Grimm, M. Miesch, P. Geoffroy, A. Eckert et A. G. Mensah-Nyagan (2017). "Allopregnanolone and its analog BR 297 rescue neuronal cells from oxidative stress-induced death through bioenergetic improvement." Biochim Biophys Acta **1863**(3): 631-642.

Lessig, J. et B. Fuchs (2009). "Plasmalogens in Biological Systems: Their Role in Oxidative Processes in Biological Membranes, their Contribution to Pathological Processes and Aging and Plasmalogen Analysis." Curr Med Chem **16**(16): 2021-2041.

Li, S. Y., C. L. Moore, A. Dobretsova et P. A. Wight (2002). "Myelin proteolipid protein (Plp) intron 1 DNA is required to temporally regulate Plp gene expression in the brain." J Neurochem **83**(1): 193-201.

Lin, W. S., H. P. Harding, D. Ron et B. Popko (2005). "Endoplasmic reticulum stress modulates the response of myelinating oligodendrocytes to the immune cytokine interferon-gamma." J Cell Biol **169**(4): 603-612.

Liu, D., M. R. Zhang et H. C. Yin (2013). "Signaling Pathways Involved in Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Neuronal Apoptosis." Int J Neurosci **123**(3): 155-162.

Liu, L. R., C. Liu, Y. T. Lu, L. N. Liu et Y. Jiang (2015). "ER stress related factor ATF6 and caspase-12 trigger apoptosis in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy." Int J Clin Exp Patho **8**(6): 6960-6966.

Liu, S. Y., W. Wang, Z. Y. Cai, L. F. Yao, Z. W. Chen, C. Y. Wang, B. Zhao et K. S. Li (2013). "Polymorphism - 116C/G of Human X-box-Binding Protein 1 Promoter is Associated with Risk of Alzheimer's Disease." Cns Neurosci Ther **19**(4): 229-234.

Lockhart, E. M., D. S. Warner, R. D. Pearlstein, D. H. Penning, S. Mehrabani et R. M. Boustany (2002). "Allopregnanolone attenuates N-methyl-D-aspartate-induced excitotoxicity and apoptosis in the human NT2 cell line in culture." Neurosci Lett **328**(1): 33-36.

Love, S. (2006). "Demyelinating diseases." J Clin Pathol **59**(11): 1151-1159.

Lubetzki, C., C. Demerens et B. Zalc (1997). "Axonal signals and myelinogenesis in the central nervous system." M S-Med Sci **13**(10): 1097-1105.

Luoma, J. I., B. G. Kelley et P. G. Mermelstein (2011). "Progesterone inhibition of voltage-gated calcium channels is a potential neuroprotective mechanism against excitotoxicity." Steroids **76**(9): 845-855.

Malagelada, C., Z. H. Jin, V. Jackson-Lewis, S. Przedborski et L. A. Greene (2010). "Rapamycin Protects against Neuron Death in In Vitro and In Vivo Models of Parkinson's Disease." J Neurosci **30**(3): 1166-1175.

Marciniak, S. J., C. Y. Yun, S. Oyadomari, I. Novoa, Y. H. Zhang, R. Jungreis, K. Nagata, H. P. Harding et D. Ron (2004). "CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum." Gene Dev **18**(24): 3066-3077.

Marin-Husstege, M., M. Muggironi, D. Raban, R. P. Skoff et P. Casaccia-Bonnefil (2004). "Oligodendrocyte progenitor proliferation and maturation is differentially regulated by male and female sex steroid hormones." Dev Neurosci-Basel **26**(2-4): 245-254.

Martinez, J. A., Z. Q. Zhang, S. I. Svetlov, R. L. Hayes, K. K. Wang et S. F. Larner (2010). "Calpain and caspase processing of caspase-12 contribute to the ER stress-induced cell death pathway in differentiated PC12 cells." Apoptosis **15**(12): 1480-1493.

Martins-de-Souza, D., W. F. Gattaz, A. Schmitt, C. Rewerts, S. Marangoni, J. C. Novello, G. Maccarrone, C. W. Turck et E. Dias (2009). "Alterations in oligodendrocyte proteins, calcium homeostasis and new potential markers in schizophrenia anterior temporal lobe are revealed by shotgun proteome analysis." J Neural Transm **116**(3): 275-289.

McCarthy, D. P., M. H. Richards et S. D. Miller (2012). "Mouse Models of Multiple Sclerosis: Experimental Autoimmune Encephalomyelitis and Theiler's Virus-Induced Demyelinating Disease." Methods Mol Biol **900**: 381-401.

McCullough, K. D., J. L. Martindale, L. O. Klotz, T. Y. Aw et N. J. Holbrook (2001). "Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bc12 and perturbing the cellular redox state." Mol Cell Biol **21**(4): 1249-1259.

Mehnert, J. M. et W. K. Kelly (2007). "Histone deacetylase inhibitors: Biology and mechanism of action." Cancer J **13**(1): 23-29.

Melcangi, R. C., I. Azcoitia, M. Ballabio, I. Cavarretta, L. C. Gonzalez, E. Leonelli, V. Magnaghi, S. Veiga et L. M. Garcia-Segura (2003). "Neuroactive steroids influence peripheral myelination: a promising opportunity for preventing or treating age-dependent dysfunctions of peripheral nerves." Prog Neurobiol **71**(1): 57-66.

Melcangi, R. C., L. M. Garcia-Segura et A. G. Mensah-Nyagan (2008). "Neuroactive steroids: State of the art and new perspectives." Cell Mol Life Sci **65**(5): 777-797.

Melcangi, R. C., V. Magnaghi, I. Cavarretta, I. Zucchi, P. Bovolin, D. D'Urso et L. Martini (1999). "Progesterone derivatives are able to influence peripheral myelin protein 22 and P-0 gene expression: Possible mechanisms of action." J Neurosci Res **56**(4): 349-357.

Mensah-Nyagan, A. G., J. L. Do-Rego, D. Beaujean, V. Luu-The, G. Pelletier et H. Vaudry (1999). "Neurosteroids: Expression of steroidogenic enzymes and regulation of steroid biosynthesis in the central nervous system." Pharmacol Rev **51**(1): 63-81.

Merzbacher, L. (1910). "Eine eigenarige familiar-hereditare Erkrankungsform (Aplasia axialis extra-corticalis congenita)." Z Neurol Psychiatr. **3**: 1–138.

Miller, A., M. Korem, R. Almog et Y. Galboiz (2005). "Vitamin B12, demyelination, remyelination and repair in multiple sclerosis." J Neurol Sci **233**(1-2): 93-97.

Miller, A. C., S. Cohen, M. Stewart, R. Rivas et P. Lison (2011). "Radioprotection by the histone deacetylase inhibitor phenylbutyrate." Radiat Environ Bioph **50**(4): 585-596.

Mimori, S., H. Ohtaka, Y. Koshikawa, K. Kawada, M. Kaneko, Y. Okuma, Y. Nomura, Y. Murakami et H. Hamana (2013). "4-Phenylbutyric acid protects against neuronal cell death by primarily acting as a chemical chaperone rather than histone deacetylase inhibitor." Bioorg Med Chem Lett **23**(21): 6015-6018.

Mimori, S., Y. Okuma, M. Kaneko, K. Kawada, T. Hosoi, K. Ozawa, Y. Nomura et H. Hamana (2012). "Protective Effects of 4-Phenylbutyrate Derivatives on the Neuronal Cell Death and Endoplasmic Reticulum Stress." Biol Pharm Bull **35**(1): 84-90.

Montag, D., K. P. Giese, U. Bartsch, R. Martini, Y. Lang, H. Bluthmann, J. Karthigasan, D. A. Kirschner, E. S. Wintergerst, K. A. Nave, J. Zielasek, K. V. Toyka, H. P. Lipp et M. Schachner (1994). "Mice Deficient for the Myelin-Associated Glycoprotein Show Subtle Abnormalities in Myelin." Neuron **13**(1): 229-246.

Morello, D., A. Dautigny, D. Phamdinh et P. Jolles (1986). "Myelin Proteolipid Protein (Plp and Dm-20) Transcripts Are Deleted in Jimpy Mutant Mice." Embo J **5**(13): 3489-3493.

Mori, S. et C. P. Leblond (1970). "Electron microscopic identification of three classes of oligodendrocytes and a preliminary study of their proliferative activity in the corpus callosum of young rats." J Comp Neurol **139**(1): 1-28.

Morishima, N., K. Nakanishi, H. Takenouchi, T. Shibata et Y. Yasuhiko (2002). "An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis - Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12." J Biol Chem **277**(37): 34287-34294.

Nagan, N. et R. A. Zoeller (2001). "Plasmalogens: biosynthesis and functions." Prog Lipid Res **40**(3): 199-229.

Nakagawa, T. et J. Y. Yuan (2000). "Cross-talk between two cysteine protease families: Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis." J Cell Biol **150**(4): 887-894.

Nakagawa, T., H. Zhu, N. Morishima, E. Li, J. Xu, B. A. Yankner et J. Y. Yuan (2000). "Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta." Nature **403**(6765): 98-103.

Nave, K. A. et O. Boespflug-Tanguy (1996). "X-linked developmental defects of myelination: From mouse mutants to human genetic diseases." Neuroscientist **2**(1): 33-43.

Nave, K. A., C. Lai, F. E. Bloom et R. J. Milner (1986). "Jimpy Mutant Mouse - a 74-Base Deletion in the Messenger-Rna for Myelin Proteolipid Protein and Evidence for a Primary Defect in Rna Splicing." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(23): 9264-9268.

Nave, K. A., C. Lai, F. E. Bloom et R. J. Milner (1987). "Splice Site Selection in the Proteolipid Protein (Plp) Gene Transcript and Primary Structure of the Dm-20 Protein of Central-Nervous-System Myelin." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(16): 5665-5669.

Nevin, Z. S., D. C. Factor, R. T. Karl, P. Douvaras, J. Laukka, M. S. Windrem, S. A. Goldman, V. Fossati, G. M. Hobson et P. J. Tesar (2017). "Modeling the Mutational and Phenotypic Landscapes of Pelizaeus-Merzbacher Disease with Human iPSC-Derived Oligodendrocytes." Am J Hum Genet **100**(4): 617-634.

Nilsen, J. (2008). "Estradiol and neurodegenerative oxidative stress." Front Neuroendocrin **29**(4): 463-475.

Nilsen, J., S. H. Chen, R. W. Irwin, S. Iwamoto et R. D. Brinton (2006). "Estrogen protects neuronal cells from amyloid beta-induced apoptosis via regulation of mitochondrial proteins and function." Bmc Neurosci **7**.

Nishikawa, S., J. L. Brodsky et K. Nakatsukasa (2005). "Roles of molecular chaperones in endoplasmic reticulum (ER) quality control and ER-associated degradation (ERAD)." J Biochem **137**(5): 551-555.

Noiva, R. (1999). "Protein disulfide isomerase: The multifunctional redox chaperone of the endoplasmic reticulum." Semin Cell Dev Biol **10**(5): 481-493.

Numakawa, T., T. Matsumoto, Y. Numakawa, M. Richards, S. Yamawaki et H. Kunugi (2011). "Protective Action of Neurotrophic Factors and Estrogen against Oxidative Stress-Mediated Neurodegeneration." J Toxicol **2011**: 405194.

Numasawa-Kuroiwa, Y., Y. Okada, S. Shibata, N. Kishi, W. Akamatsu, M. Shoji, A. Nakanishi, M. Oyama, H. Osaka, K. Inoue, K. Takahashi, S. Yamanaka, K. Kosaki, T. Takahashi et H. Okano (2014). "Involvement of ER Stress in Dysmyelination of Pelizaeus-Merzbacher Disease with PLP1 Missense Mutations Shown by iPSC-Derived Oligodendrocytes." Stem Cell Rep **2**(5): 648-661.

Numata, Y., L. Gotoh, A. Iwaki, K. Kurosawa, J. Takanashi, K. Deguchi, T. Yamamoto, H. Osaka et K. Inoue (2014). "Epidemiological, clinical, and genetic landscapes of hypomyelinating leukodystrophies." J Neurol **261**(4): 752-758.

Ogata, M., S. I. Hino, A. Saito, K. Morikawa, S. Kondo, S. Kanemoto, T. Murakami, M. Taniguchi, I. Tanii, K. Yoshinaga, S. Shiosaka, J. A. Hammarback, F. Urano et K. Imaizumi (2006). "Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress." Mol Cell Biol **26**(24): 9220-9231.

Ohler, B., I. Revenko et C. Husted (2001). "Atomic force microscopy of nonhydroxy galactocerebroside nanotubes and their self-assembly at the air-water interface, with applications to myelin." J Struct Biol **133**(1): 1-9.

Ono, K., M. Ikemoto, T. Kawarabayashi, M. Ikeda, T. Nishinakagawa, M. Hosokawa, M. Shoji, M. Takahashi et M. Nakashima (2009). "A chemical chaperone, sodium 4-phenylbutyric acid, attenuates the pathogenic potency in human alpha-synuclein A30P+A53T transgenic mice." Parkinsonism Relat D **15**(9): 649-654.

Ono, K., Y. Yasui, U. Rutishauser et R. H. Miller (1997). "Focal ventricular origin and migration of oligodendrocyte precursors into the chick optic nerve." Neuron **19**(2): 283-292.

Orentas, D. M., J. E. Hayes, K. L. Dyer et R. H. Miller (1999). "Sonic hedgehog signaling is required during the appearance of spinal cord oligodendrocyte precursors." Development **126**(11): 2419-2429.

Panfoli, I., M. Bruschi, L. Santucci, D. Calzia, S. Ravera, A. Petretto et G. Candiano (2014). "Myelin proteomics: the past, the unexpected and the future." Expert Rev Proteomic **11**(3): 345-354.

Pang, Y. F., J. Dong et P. Thomas (2013). "Characterization, Neurosteroid Binding and Brain Distribution of Human Membrane Progesterone Receptors delta and epsilon (mPR delta and mPR epsilon) and mPR delta Involvement in Neurosteroid Inhibition of Apoptosis." Endocrinology **154**(1): 283-295.

Patte-Mensah, C., L. Meyer, O. Taleb et A. G. Mensah-Nyagan (2014). "Potential role of allopregnanolone for a safe and effective therapy of neuropathic pain." Prog Neurobiol **113**: 70-78.

Pelizaeus, F. (1885). "Uber eine eigenthuiche Form spastischer Lahmung mit Cerebralerschinungen auf hereditarer Grundlage (Multiple Sklerose)." Arch Psychiatr Nervenkr. **16**: 698–710.

Penas, C., E. Verdu, E. Asensio-Pinilla, M. S. Guzman-Lenis, M. Herrando-Grabulosa, X. Navarro et C. Casas (2011). "Valproate Reduces Chop Levels and Preserves Oligodendrocytes and Axons after Spinal Cord Injury." Neuroscience **178**: 33-44.

Pérez-Cerdá, F., M. V. Sánchez-Gómez et C. Matute (2015). "Pío del Río Hortega and the discovery of the oligodendrocytes." Front Neuroanat **9**.

Pette, M., K. Fujita, B. Kitze, J. N. Whitaker, E. Albert, L. Kappos et H. Wekerle (1990). "Myelin Basic Protein-Specific Lymphocyte-T Lines from Ms Patients and Healthy-Individuals." Neurology **40**(11): 1770-1776.

Phamdinh, D., M. G. Mattei, J. L. Nussbaum, G. Roussel, P. Pontarotti, N. Roeckel, I. H. Mather, K. Artzt, K. F. Lindahl et A. Dautigny (1993). "Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein Is a Member of a Subset of the Immunoglobulin Superfamily Encoded within the Major Histocompatibility Complex." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(17): 7990-7994.

Phillips, R. J. (1954). "Jimpy, a new totally sexlinked gene in the house mouse." Z Indukt Abstamm Vererbungsl **86**(3): 322-326.

Pike, C. J., T. V. V. Nguyen, M. Ramsden, M. Z. Yao, M. P. Murphy et E. R. Rosario (2008). "Androgen cell signaling pathways involved in neuroprotective actions." Horm Behav **53**(5): 693-705.

Pizzini, F., A. S. Fatemi, P. B. Barker, L. M. Nagae-Poetscher, A. Horska, A. W. Zimmerman, H. W. Moser, G. Bibat et S. Naidu (2003). "Proton MR spectroscopic imaging in Pelizaeus-Merzbacher disease." Am J Neuroradiol **24**(8): 1683-1689.

Podbielska, M., N. L. Banik, E. Kurowska et E. L. Hogan (2013). "Myelin recovery in multiple sclerosis: the challenge of remyelination." Brain Sci **3**(3): 1282-1324.

Poliak, S. et E. Peles (2003). "The local differentiation of myelinated axons at nodes of Ranvier." Nat Rev Neurosci **4**(12): 968-980.

Privat, A., C. Jacque, J. M. Bourre, P. Dupouey et N. Baumann (1979). "Absence of the Major Dense Line in Myelin of the Mutant Mouse Shiverer." Neurosci Lett **12**(1): 107-112.

Pronsato, L., R. Boland et L. Milanesi (2012). "Testosterone exerts antiapoptotic effects against H2O2 in C2C12 skeletal muscle cells through the apoptotic intrinsic pathway." J Endocrinol **212**(3): 371-381.

Prukop, T., D. B. Epplen, T. Nientiedt, S. P. Wichert, R. Fledrich, R. M. Stassart, M. J. Rossner, J. M. Edgar, H. B. Werner, K. A. Nave et M. W. Sereda (2014). "Progesterone Antagonist Therapy in a Pelizaeus-Merzbacher Mouse Model." Am J Hum Genet **94**(4): 533-546.

Qi, X., T. Hosoi, Y. Okuma, M. Kaneko et Y. Nomura (2004). "Sodium 4-phenylbutyrate protects against cerebral ischemic injury." Mol Pharmacol **66**(4): 899-908.

Qian, X. W., H. Cao, Q. Ma, Q. S. Wang, W. He, P. S. Qin, B. Ji, K. M. Yuan, F. H. Yang, X. H. Liu, Q. Q. Lian et J. Li (2015). "Allopregnanolone attenuates A beta(25-35)-induced neurotoxicity in PC12 cells by reducing oxidative stress." Int J Clin Exp Med **8**(8): 13610-13615.

Quarles, P. M. et H. Richard (1999). Myelin Formation, Structure and Biochemistry. Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects. 6th edition., Lippincott-Raven.

Quarles, R. H. (2007). "Myelin-associated glycoprotein (MAG): past, present and beyond." J Neurochem **100**(6): 1431-1448.

Rajagopalan, S., Y. H. Xu et M. B. Brenner (1994). "Retention of Unassembled Components of Integral Membrane-Proteins by Calnexin." Science **263**(5145): 387-390.

Rao, R. V., H. M. Ellerby et D. E. Bredesen (2004). "Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program." Cell Death Differ **11**(4): 372-380.

Rashid, H. O., R. K. Yadav, H. R. Kim et H. J. Chae (2015). "ER stress: Autophagy induction, inhibition and selection." Autophagy **11**(11): 1956-1977.

Raskind, W. H., C. A. Williams, L. D. Hudson et T. D. Bird (1991). "Complete Deletion of the Proteolipid Protein Gene (Plp) in a Family with X-Linked Pelizaeus-Merzbacher Disease." Am J Hum Genet **49**(6): 1355-1360.

Readhead, C., B. Popko, N. Takahashi, H. D. Shine, R. A. Saavedra, R. L. Sidman et L. Hood (1987). "Expression of a Myelin Basic-Protein Gene in Transgenic Shiverer Mice - Correction of the Dysmyelinating Phenotype." Cell **48**(4): 703-712.

Readhead, C., A. Schneider, I. Griffiths et K. A. Nave (1994). "Premature Arrest of Myelin Formation in Transgenic Mice with Increased Proteolipid Protein Gene Dosage." Neuron **12**(3): 583-595.

Ricobaraza, A., M. Cuadrado-Tejedor, A. Perez-Mediavilla, D. Frechilla, J. Del Rio et A. Garcia-Osta (2009). "Phenylbutyrate Ameliorates Cognitive Deficit and Reduces Tau Pathology in an Alzheimer's Disease Mouse Model." Neuropsychopharmacol **34**(7): 1721-1732.

Roboti, P., E. Swanton et S. High (2009). "Differences in endoplasmic-reticulum quality control determine the cellular response to disease-associated mutants of proteolipid protein." J Cell Sci **122**(21): 3942-3953.

Ron, D. et P. Walter (2007). "Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response." Nat Rev Mol Cell Bio **8**(7): 519-529.

Roselli, F. et P. Caroni (2012). "Life-or-Death Decisions upon Axonal Damage." Neuron **73**(3): 405-407.

Rosenberger, T. A., J. Oki, A. D. Purdon, S. I. Rapoport et E. J. Murphy (2002). "Rapid synthesis and turnover of brain microsomal ether phospholipids in the adult rat." J Lipid Res **43**(1): 59-68.

Rosenbluth, J., Z. Liu, D. Guo et R. Schiff (1994). "Inhibition of Cns Myelin Development in-Vivo by Implantation of Anti-Galc Hybridoma Cells." J Neurocytol **23**(11): 699-707.

Rosenbluth, J., K. A. Nave, A. Mierzwa et R. Schiff (2006). "Subtle myelin defects in PLP-null mice." Glia **54**(3): 172-182.

Rowitch, D. H. et A. R. Kriegstein (2010). "Developmental genetics of vertebrate glial-cell specification." Nature **468**(7321): 214-222.

Roy, A., A. Ghosh, A. Jana, X. J. Liu, S. Brahmachari, H. E. Gendelman et K. Pahan (2012). "Sodium Phenylbutyrate Controls Neuroinflammatory and Antioxidant Activities and Protects Dopaminergic Neurons in Mouse Models of Parkinson's Disease." Plos One **7**(6).

Rubenstein, R. C., M. E. Egan et P. L. Zeitlin (1997). "In vitro pharmacologic restoration of CFTR-mediated chloride transport with sodium 4-phenylbutyrate in cystic fibrosis epithelial cells containing Delta F508-CFTR." J Clin Invest **100**(10): 2457-2465.

Rudner, J., V. Jendrossek et C. Belka (2002). "New insights in the role of Bcl-2 Bcl-2 and the endoplasmic reticulum." Apoptosis **7**(5): 441-447.

Saher, G., B. Brugger, C. Lappe-Siefke, W. Mobius, R. Tozawa, M. C. Wehr, F. Wieland, S. Ishibashi et K. A. Nave (2005). "High cholesterol level is essential for myelin membrane growth." Nat neurosci **8**(4): 468-475.

Salakou, S., D. Kardamakis, A. C. Tsamandas, V. Zolota, E. Apostolakis, V. Tzelepi, P. Papathanasopoulos, D. S. Bonikos, T. Papapetropoulos, T. Petsas et D. Dougenis (2007). "Increased Bax/Bcl-2 ratio up-regulates caspase-3 and increases apoptosis in the thymus of patients with myasthenia gravis." In Vivo **21**(1): 123-132.

Salzer, J. L. (2003). "Polarized domains of myelinated axons." Neuron **40**(2): 297-318.

Sarret, C., P. Combes, P. Micheau, A. Gelot, O. Boespflug-Tanguy et C. Vaurs-Barriere (2010). "Novel Neuronal Proteolipid Protein Isoforms Encoded by the Human Myelin Proteolipid Protein 1 Gene." Neuroscience **166**(2): 522-538.

Sarret, C., J. J. Lemaire, D. Tonduti, A. Sontheimer, J. Coste, B. Pereira, F. Feschet, B. Roche et O. Boespflug-Tanguy (2016). "Time-course of myelination and atrophy on cerebral imaging in 35 patients with PLP1-related disorders." Dev Med Child Neurol **58**(7): 706-713.

Saugier-Veber, P., A. Munnich, D. Bonneau, J. M. Rozet, M. Lemerrer, R. Gil et O. Boespflugtanguy (1994). "X-Linked Spastic Paraplegia and Pelizaeus-Merzbacher Disease Are Allelic Disorders at the Proteolipid Protein Locus." Nat Genet **6**(3): 257-262.

Sayeed, I., S. Parvez, B. Wali, D. Siemen et D. G. Stein (2009). "Direct inhibition of the mitochondrial permeability transition pore: A possible mechanism for better neuroprotective effects of allopregnanolone over progesterone." Brain Res **1263**: 165-173.

Schaeffer, V., L. Meyer, C. Patte-Mensah et A. G. Mensah-Nyagan (2010). "Progress in dorsal root ganglion neurosteroidogenic activity: Basic evidence and pathophysiological correlation." Prog Neurobiol **92**(1): 33-41.

Schaerenwiemers, N., P. Vanderbijl et M. E. Schwab (1995). "The Udp-Galactose-Ceramide Galactosyltransferase - Expression Pattern in Oligodendrocytes and Schwann-Cells during Myelination and Substrate Preference for Hydroxyceramide." J Neurochem **65**(5): 2267-2278.

Schnaar, R. L., R. Gerardy-Schahn et H. Hildebrandt (2014). "Sialic Acids in the Brain: Gangliosides and Polysialic Acid in Nervous System Development, Stability, Disease, and Regeneration." Physiol Rev **94**(2): 461-518.

Schneider, A., P. Montague, I. Griffiths, M. Fanarraga, P. G. E. Kennedy, P. Brophy et K. A. Nave (1992). "Uncoupling of Hypomyelination and Glial-Cell Death by a Mutation in the Proteolipid Protein Gene." Nature **358**(6389): 758-761.

Scolding, N. J., S. Frith, C. Linington, B. P. Morgan, A. K. Campbell et D. A. S. Compston (1989). "Myelin-Oligodendrocyte Glycoprotein (Mog) Is a Surface Marker of Oligodendrocyte Maturation." J Neuroimmunol **22**(3): 169-176.

Seitelberger, F. (1995). "Neuropathology and Genetics of Pelizaeus-Merzbacher Disease." Brain Pathol **5**(3): 267-273.

Shaffer, A. L., M. Shapiro-Shelef, N. N. Iwakoshi, A. H. Lee, S. B. Qian, H. Zhao, X. Yu, L. M. Yang, B. K. Tan, A. Rosenwald, E. M. Hurt, E. Petroulakis, N. Sonenberg, J. W. Yewdell, K. Calame, L. H. Glimcher et L. M. Staudt (2004). "XBP1, downstream of Blimp-1, expands the secretory apparatus and other organelles, and increases protein synthesis in plasma cell differentiation." Immunity **21**(1): 81-93.

Shamas-Din, A., J. Kale, B. Leber et D. W. Andrews (2013). "Mechanisms of Action of Bcl-2 Family Proteins." Csh Perspect Biol **5**(4).

Shamu, C. E. et P. Walter (1996). "Oligomerization and phosphorylation of the Ire1p kinase during intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus." Embo J **15**(12): 3028-3039.

Sheikh, K. A., J. Sun, Y. J. Liu, H. Kawai, T. O. Crawford, R. L. Proia, J. W. Griffin et R. L. Schnaar (1999). "Mice lacking complex gangliosides develop Wallerian degeneration and myelination defects." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(13): 7532-7537.

Shen, J. S., X. Chen, L. Hendershot et R. Prywes (2002). "ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of golgi localization signals." Dev Cell **3**(1): 99-111.

Shen, M. Z., L. Wang, M. W. Quo, Q. Xue, C. Hu, X. Li, L. Fan et X. M. Wang (2015). "A novel endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis model using tunicamycin in primary cultured neonatal rat cardiomyocytes." Mol Med Rep **12**(4): 5149-5154.

Shimura, H., N. Hattori, S. Kubo, Y. Mizuno, S. Asakawa, S. Minoshima, N. Shimizu, K. Iwai, T. Chiba, K. Tanaka et T. Suzuki (2000). "Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase." Nat Genet **25**(3): 302-305.

Sidman, R. L., M. M. Dickie et S. H. Appel (1964). "Mutant mice (quacking and jimpy) with deficient myelination in the central nervous system." Science **144**(3616): 309-311.

Sie, L. T. L., M. S. vanderKnaap, G. vanWezelMeijler et J. Valk (1997). "MRI assessment of myelination of motor and sensory pathways in the brain of preterm and term-born infants." Neuropediatrics **28**(2): 97-105.

Simons, M., E. M. Kramer, P. Macchi, S. Rathke-Hartlieb, J. Trotter, K. A. Nave et J. B. Schulz (2002). "Overexpression of the myelin proteolipid protein leads to accumulation of cholesterol and proteolipid protein in endosomes/lysosomes: implications for Pelizaeus-Merzbacher disease." J Cell Biol **157**(2): 327-336.

Simons, M. et J. Trotter (2007). "Wrapping it up: the cell biology of myelination." Curr Opin Neurobiol **17**(5): 533-540.

Singh, M. et C. Su (2013). "Progesterone and neuroprotection." Horm Behav **63**(2): 284-290.

Skoff, R. P. (1995). "Programmed Cell-Death in the Dysmyelinating Mutants." Brain Pathol **5**(3): 283-288.

Skoff, R. P., D. A. Bessert, M. Cerghet, M. J. Franklin, U. K. Rout, K. A. Nave, L. Carlock, M. S. Ghandour et D. R. Armant (2004). "The myelin proteolipid protein gene modulates apoptosis in neural and non-neural tissues." Cell Death Differ **11**(12): 1247-1257.

Smith, P. K., R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson et D. C. Klenk (1985). "Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid." Anal Biochem **150**(1): 76-85.

Solly, S. K., J. L. Thomas, M. Monge, C. Demerens, C. Lubetzki, M. V. Gardinier, J. M. Matthieu et B. Zalc (1996). "Myelin/oligodendrocyte glycoprotein (MOG) expression is associated with myelin deposition." Glia **18**(1): 39-48.

Southwood, C. et A. Gow (2001). "Molecular pathways of oligodendrocyte apoptosis revealed by mutations in the proteolipid protein gene." Microsc Res Techniq **52**(6): 700-708.

Southwood, C. M., J. Garbern, W. Jiang et A. Gow (2002). "The unfolded protein response modulates disease severity in Pelizaeus-Merzbacher disease." Neuron **36**(4): 585-596.

Southwood, X. C., B. Fykkolodziej, K. J. Maheras, D. M. Garshott, M. Estill, A. M. Fribley et A. Gow (2016). "Overexpression of CHOP in Myelinating Cells Does Not Confer a Significant Phenotype under Normal or Metabolic Stress Conditions." J Neurosci **36**(25): 6803-6819.

Spalice, A., T. Popolizio, P. Parisi, T. Scarabino et P. Iannetti (2000). "Proton MR spectroscopy in connatal Pelizaeus-Merzbacher disease." Pediatr Radiol **30**(3): 171-175.

Spilman, P., N. Podlutskaya, M. J. Hart, J. Debnath, O. Gorostiza, D. Bredesen, A. Richardson, R. Strong et V. Galvan (2010). "Inhibition of mTOR by Rapamycin Abolishes Cognitive Deficits and Reduces Amyloid-beta Levels in a Mouse Model of Alzheimer's Disease." Plos One **5**(3).

Steenweg, M. E., A. Vanderver, S. Blaser, A. Bizzi, T. J. de Koning, G. M. S. Mancini, W. N. van Wieringen, F. Barkhof, N. I. Wolf et M. S. van der Knaap (2010). "Magnetic resonance imaging pattern recognition in hypomyelinating disorders." Brain **133**: 2971-2982.

Sugimori, M., M. Nagao, C. M. Parras, H. Nakatani, M. Lebel, F. Guillemot et M. Nakafuku (2008). "Ascl1 is required for oligodendrocyte development in the spinal cord." Development **135**(7): 1271-1281.

Svennerholm, L., K. Bostrom, P. Fredman, J. E. Mansson, B. Rosengren et B. M. Rynmark (1989). "Human-Brain Gangliosides - Developmental-Changes from Early Fetal Stage to Advanced Age." Biochim Biophys Acta **1005**(2): 109-117.

Svenstrup, K., G. Giraud, O. Boespflug-Tanguy, E. R. Danielsen, C. Thomsen, K. Rasmussen, I. Law, A. Vogel, J. Stokholm, C. Crone, L. E. Hjermind et J. E. Nielsen (2010). "Hereditary spastic paraplegia caused by the PLP1 'rumpshaker mutation'." J Neurol Neurosur Ps **81**(6): 666-672.

Szuchet, S., J. A. Nielsen, G. Lovas, M. S. Domowicz, J. M. de Velasco, D. Maric et L. D. Hudson (2011). "The genetic signature of perineuronal oligodendrocytes reveals their unique phenotype." Eur J Neurosci **34**(12): 1906-1922.

Tait, S., F. Gunn-Moore, J. M. Collinson, J. Huang, C. Lubetzki, L. Pedraza, D. L. Sherman, D. R. Colman et P. J. Brophy (2000). "An oligodendrocyte cell adhesion molecule at the site of assembly of the paranodal axo-glial junction." J Cell Biol **150**(3): 657-666.

Takanashi, J. (2015). "Neurochemistry of Hypomyelination Investigated with MR Spectroscopy." Magn Reson Med Sci **14**(2): 85-91.

Takanashi, J., K. Sugita, Y. Tanabe, K. Nagasawa, K. Inoue, H. Osaka et Y. Kohno (1999). "MR-revealed myelination in the cerebral corticospinal tract as a marker for Pelizaeus-Merzbacher's disease with proteolipid protein gene duplication." Am J Neuroradiol **20**(10): 1822-1828.

Tatar, C. L., S. Appikatla, D. A. Bessert, A. S. Paintlia, I. Singh et R. P. Skoff (2010). "Increased Plp1 gene expression leads to massive microglial cell activation and inflammation throughout the brain." Asn Neuro **2**(4).

Taube, J. R., K. Sperle, L. Banser, P. Seeman, B. C. V. Cavan, J. Y. Garbern et G. M. Hobson (2014). "PMD patient mutations reveal a long-distance intronic interaction that regulates PLP1/DM20 alternative splicing." Hum Mol Genet **23**(20): 5464-5478.

Tekki-Kessaris, N., R. Woodruff, A. C. Hall, W. Gaffield, S. Kimura, C. D. Stiles, D. H. Rowitch et W. D. Richardson (2001). "Hedgehog-dependent oligodendrocyte lineage specification in the telencephalon." Development **128**(13): 2545-2554.

Thaxton, C. et M. A. Bhat (2009). "Myelination and Regional Domain Differentiation of the Axon." Results Probl Cell Differ **48**: 1-28.

Thomas, P. et Y. F. Pang (2012). "Membrane Progesterone Receptors: Evidence for Neuroprotective, Neurosteroid Signaling and Neuroendocrine Functions in Neuronal Cells." Neuroendocrinology **96**(2): 162-171.

Todorovic, S. M. et V. Jevtovic-Todorovic (2011). "T-type voltage-gated calcium channels as targets for the development of novel pain therapies." Brit J Pharmacol **163**(3): 484-495.

Trapp, B. D., L. Bernier, S. B. Andrews et D. R. Colman (1988). "Cellular and Subcellular-Distribution of 2',3'-Cyclic Nucleotide 3'-Phosphodiesterase and Its Messenger-Rna in the Rat Central Nervous-System." J Neurochem **51**(3): 859-868.

Trapp, B. D. et R. H. Quarles (1982). "Presence of the myelin-associated glycoprotein correlates with alterations in the periodicity of peripheral myelin." J Cell Biol **92**(3): 877-882.

Tsai, H. H., E. Frost, V. To, S. Robinson, C. ffrench-Constant, R. Geertman, R. M. Ransohoff et R. H. Miller (2002). "The chemokine receptor CXCR2 controls positioning of oligodendrocyte precursors in developing spinal cord by arresting their migration." Cell **110**(3): 373-383.

Tsaytler, P., H. P. Harding, D. Ron et A. Bertolotti (2011). "Selective Inhibition of a Regulatory Subunit of Protein Phosphatase 1 Restores Proteostasis." Science **332**(6025): 91-94.

Ueda, H., M. Inoue, A. Yoshida, K. Mizuno, H. Yamamoto, J. Maruo, K. Matsuno et S. Mita (2001). "Metabotropic neurosteroid/sigma-receptor involved in stimulation of nociceptor endings of mice." J Pharmacol Exp Ther **298**(2): 703-710.

Ueda, H., J. M. Levine, R. H. Miller et B. D. Trapp (1999). "Rat optic nerve oligodendrocytes develop in the absence of viable retinal ganglion cell axons." J Cell Biol **146**(6): 1365-1374.

Upagupta, C., R. E. Carlisle et J. G. Dickhout (2017). "Analysis of the potency of various low molecular weight chemical chaperones to prevent protein aggregation." Biochem Bioph Res Co **486**: 163-170.

Valastyan, J. S. et S. Lindquist (2014). "Mechanisms of protein-folding diseases at a glance." Dis Model Mech **7**(1): 9-14.

Valera, S., M. Ballivet et D. Bertrand (1992). "Progesterone Modulates a Neuronal Nicotinic Acetylcholine-Receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(20): 9949-9953.

Vallstedt, A., J. M. Klos et J. Ericson (2005). "Multiple dorsoventral origins of oligodendrocyte generation in the spinal cord and hindbrain." Neuron **45**(1): 55-67.

van der Knapp, M. S., G. C. S. Scheper et J. C. Pronk (2006). "Vanishing white matter disease." Lancet Neurol **5**(5): 413-423.

van der Voorn, J. P., B. van Kollenburg, G. Bertrand, K. Van Haren, G. C. Scheper, J. M. Powers et M. S. van der Knaap (2005). "The unfolded protein response in vanishing white matter disease." J Neuropathol Exp Neurol **64**(9): 770-775.

van Kollenburg, B., J. van Dijk, J. Garbern, A. A. M. Thomas, G. C. Scheper, J. M. Powers et M. S. van der Knaap (2006). "Glia-specific activation of all pathways of the unfolded protein response in vanishing white matter disease." J Neuropath Exp Neurol **65**(7): 707-715.

Vargas, W. M., L. Bengston, N. W. Gilpin, B. W. Whitcomb et H. N. Richardson (2014). "Alcohol Binge Drinking during Adolescence or Dependence during Adulthood Reduces Prefrontal Myelin in Male Rats." J Neurosci **34**(44): 14777-14782.

Vaurs-Barriere, C., K. Wong, T. D. Weibel, M. Abu-Asab, M. D. Weiss, C. R. Kaneski, T. H. Mixon, S. Bonavita, I. Creveaux, J. D. Heiss, M. Tsokos, E. Goldin, R. H. Quarles, O. Boespflug-Tanguy et R. Schiffmann (2003). "Insertion of mutant proteolipid protein results in missorting of myelin proteins." Ann Neurol **54**(6): 769-780.

Vela, J. M., I. Dalmau, L. Acarin, B. Gonzalez et B. Castellano (1995). "Microglial Cell Reaction in the Gray and White-Matter in Spinal-Cords from Jimpy Mice - an Enzyme-Histochemical Study at the Light and Electron-Microscope Level." Brain Res **694**(1-2): 287-298.

Vela, J. M., I. Dalmau, B. Gonzalez et B. Castellano (1996). "The microglial reaction in spinal cords of jimpy mice is related to apoptotic oligodendrocytes." Brain Res **712**(1): 134-142.

Verlinsky, Y., S. Rechitsky, K. Laziuk, C. Librach, R. Genovese et A. Kuliev (2006). "Preimplantation genetic diagnosis for Pelizaeus-Merzbacher disease with testing for age-related aneuploidies." Reprod Biomed Online **12**(1): 83-88.

Voeltz, G. K., M. M. Rolls et T. A. Rapoport (2002). "Structural organization of the endoplasmic reticulum." Embo Rep **3**(10): 944-950.

Wang, C. S., C. E. Marx, A. L. Morrow, W. A. Wilson et S. D. Moore (2007). "Neurosteroid modulation of GABAergic neurotransmission in the central amygdala: A role for NMDA receptors." Neurosci Lett **415**(2): 118-123.

Wang, E., N. Dimova, K. Sperle, Z. Huang, L. Lock, M. C. McCulloch, J. M. Edgar, G. M. Hobson et F. Cambi (2008). "Deletion of a splicing enhancer disrupts PLP1/DM20 ratio and myelin stability." Exp Neurol **214**(2): 322-330.

Wang, F. M., Y. J. Chen et H. J. Ouyang (2011). "Regulation of unfolded protein response modulator XBP1s by acetylation and deacetylation." Biochem J **433**: 245-252.

Wang, H., R. Q. Sun, X. Y. Zeng, X. Zhou, S. P. Li, E. J. Jo, J. C. Molero et J. M. Ye (2015). "Restoration of Autophagy Alleviates Hepatic ER Stress and Impaired Insulin Signalling Transduction in High Fructose-Fed Male Mice." Endocrinology **156**(1): 169-181.

Wang, H. P., X. Wang, Z. J. Ke, A. L. Comer, M. Xu, J. A. Frank, Z. Zhang, X. L. Shi et J. Luo (2015). "Tunicamycin-induced unfolded protein response in the developing mouse brain." Toxicol Appl Pharm **283**(3): 157-167.

Waxman, S. G. et J. M. Ritchie (1993). "Molecular dissection of the myelinated axon." Ann Neurol **33**(2): 121-136.

Webb, A., P. Clark, J. Skepper, A. Compston et A. Wood (1995). "Guidance of Oligodendrocytes and Their Progenitors by Substratum Topography." J Cell Sci **108**: 2747-2760.

Wei, M. C., W. X. Zong, E. H. Y. Cheng, T. Lindsten, V. Panoutsakopoulou, A. J. Ross, K. A. Roth, G. R. MacCregor, C. B. Thompson et S. J. Korsmeyer (2001). "Proapoptotic BAX and BAK: A requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death." Science **292**(5517): 727-730.

Wek, R. C. et D. R. Cavener (2007). "Translational control and the unfolded protein response." Antioxid Redox Signal **9**(12): 2357-2371.

Westphal, D., G. Dewson, P. E. Czabotar et R. M. Kluck (2011). "Molecular biology of Bax and Bak activation and action." Biochim Biophys Acta **1813**(4): 521-531.

Wight, P. A. et A. Dobretsova (2004). "Where, when and how much: regulation of myelin proteolipid protein gene expression." Cell Mol Life Sci **61**(7-8): 810-821.

Willard, H. F. et J. R. Riordan (1985). "Assignment of the Gene for Myelin Proteolipid Protein to the X-Chromosome - Implications for X-Linked Myelin Disorders." Science **230**(4728): 940-942.

Wolf, N. I., E. A. Sistermans, M. Cundall, G. M. Hobson, A. P. Davis-Williams, R. Palmer, P. Stubbs, S. Davies, M. Endziniene, Y. Wu, W. K. Chong, S. Malcolm, R. Surtees, J. Y. Garbern et K. J. Woodward (2005). "Three or more copies of the proteolipid protein gene PLP1 cause severe Pelizaeus-Merzbacher disease." Brain **128**: 743-751.

Wood, P. L., T. Smith, L. Pelzer et D. B. Goodenowe (2011). "Targeted metabolomic analyses of cellular models of pelizaeus-merzbacher disease reveal plasmalogen and myo-inositol solute carrier dysfunction." Lipids Health Dis **10**: 102.

Wu, G. F. et E. Alvarez (2011). "The Immunopathophysiology of Multiple Sclerosis." Neurol Clin **29**(2): 257-278.

Wyllie, A. H. (2010). ""Where, O Death, Is Thy Sting?" A Brief Review of Apoptosis Biology." Mol Neurobiol **42**(1): 4-9.

Xia, J. et L. Wang (2013). "Pelizaeus-Merzbacher disease: Molecular diagnosis and therapy." Intractable Rare Dis Res **2**(3): 103-105.

Xilouri, M. et P. Papazafiri (2006). "Anti-apoptotic effects of allopregnanolone on P19 neurons." Eur J Neurosci **23**(1): 43-54.

Yang, L. J. S., C. B. Zeller, N. L. Shaper, M. Kiso, A. Hasegawa, R. E. Shapiro et R. L. Schnaar (1996). "Gangliosides are neuronal ligands for myelin-associated glycoprotein." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(2): 814-818.

Yao, K., J. F. Wu, J. F. Zhang, J. M. Bo, Z. Hong et H. B. Zu (2016). "Protective Effect of DHT on Apoptosis Induced by U18666A via PI3K/Akt Signaling Pathway in C6 Glial Cell Lines." Cell Mol Neurobiol **36**(5): 801-809.

Yin, X. H., R. C. Baek, D. A. Kirschner, A. Peterson, Y. Fujii, K. A. Nave, W. B. Macklin et B. D. Trapp (2006). "Evolution of a neuroprotective function of central nervous system myelin." J Cell Biol **172**(3): 469-478.

Yoo, Y. E. et C. P. Ko (2012). "Dihydrotestosterone Ameliorates Degeneration in Muscle, Axons and Motoneurons and Improves Motor Function in Amyotrophic Lateral Sclerosis Model Mice." Plos One **7**(5).

Yool, D. A., J. M. Edgar, P. Montague et S. Malcolm (2000). "The proteolipid protein gene and myelin disorders in man and animal models." Hum Mol Genet **9**(6): 987-992.

Yoshida, Y. et K. Tanaka (2010). "Lectin-like ERAD players in ER and cytosol." Biochim Biophys Acta **1800**(2): 172-180.

Youle, R. J. et A. Strasser (2008). "The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death." Nat Rev Mol Cell Bio **9**(1): 47-59.

Zaldivar, V., M. L. Magri, S. Zarate, G. Jaita, G. Eijo, D. Radl, J. Ferraris, D. Pisera et A. Seilicovich (2009). "Estradiol Increases the Bax/Bcl-2 Ratio and Induces Apoptosis in the Anterior Pituitary Gland." Neuroendocrinology **90**(3): 292-300.

Zamarbide, M., E. Martinez-Pinilla, A. Ricobaraza, T. Aragon, R. Franco et A. Perez-Mediavilla (2013). "Phenyl Acyl Acids Attenuate the Unfolded Protein Response in Tunicamycin-Treated Neuroblastoma Cells." Plos One **8**(8).

Zampieri, S., S. H. Mellon, T. D. Butters, M. Nevyjel, D. F. Covey, B. Bembi et A. Dardis (2009). "Oxidative stress in NPC1 deficient cells: protective effect of allopregnanolone." J Cell Mol Med **13**(9B): 3786-3796.

Zarate, S., V. Zaldivar, G. Jaita, L. Magri, D. Radl, D. Pisera et A. Seilicovich (2010). "Role of Estrogens in Anterior Pituitary Gland Remodeling during the Estrous Cycle." Front Horm Res **38**: 25-31.

Zeman, W., W. Demyer et H. F. Falls (1964). "Pelizaeus-Merzbacher disease. A study in nosology." J Neuropath Exp Neurol **23**: 334-354.

Zhang, J. et Q. Liu (2015). Cholesterol metabolism and homeostasis in the brain. Protein Cell. **6:** 254-264.

Zhang, Q., J. N. Liu, S. L. Chen, J. Liu, L. J. Liu, G. R. Liu, F. Wang, W. X. Jiang, C. X. Zhang, S. Y. Wang et X. Yuan (2016). "Caspase-12 is involved in stretch-induced apoptosis mediated endoplasmic reticulum stress." Apoptosis **21**(4): 432-442.

Zhou, Y., S. Simpson, J. C. Charlesworth, I. van der Mei, R. M. Lucas, A. L. Ponsonby, B. V. Taylor et A. I. Grp (2017). "Variation within MBP gene predicts disease course in multiple sclerosis." Brain Behav **7**(4).

Zhu, J., X. Hua, D. Li, J. Zhang et Q. Xia (2015). "Rapamycin Attenuates Mouse Liver Ischemia and Reperfusion Injury by Inhibiting Endoplasmic Reticulum Stress." Transpl Proc **47**(6): 1646-1652.

Annexe :
Article soumis

Protective effect of 4-Phenylbutyrate against proteolipid protein mutation-induced endoplasmic reticulum stress and oligodendroglial cell death

Anne-Sophie Wilding, Christine Patte-Mensah, Omar Taleb, Susana Brun, Véronique Kemmel*, Ayikoé-Guy Mensah-Nyagan*$

Biopathologie de la Myéline, Neuroprotection et Stratégies Thérapeutiques, INSERM U1119, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS), Université de Strasbourg.

*Equal contribution as last authors

$ Corresponding author

$ Corresponding author contact information: Ayikoé-Guy Mensah-Nyagan

E-Mail: gmensah@unistra.fr

Tel: +33 (0)3 68 85 31 24 or 25

Fax: +33 (0)3 68 85 35 70

Highlights

158JP oligodendrocytes haboring PLP mutation are less viable than normal 158N cells

Basal levels of ER stress and apoptosis markers are higher in 158JP than 158N cells

158JP cells are more vulnerable to tunicamycin-evoked ER-stress than 158N cells

ER stress pivotally determines PLP mutation-induced 158JP oligodendrocyte death

4-PBA which reduces BiP level and Bax/Bcl2 ratio protects 158JP cells against death

Abstract

Proteolipid protein (PLP) mutation causes oligodendrocyte degeneration and myelin disorders including Pelizaeus-Merzbacher Disease (PMD). As the pathophysiological mechanisms involved in PMD are poorly known, the development of therapies remains difficult. To elucidate the pathogenic pathways, an immortalized oligodendroglial cell line (158JP) expressing PLP mutation has been generated. Previous investigations revealed that 158JP oligodendrocytes exhibit several abnormalities including aberrant PLP insertion into the plasma membrane, cAMP, plasmalogen and cell cycle deficits. However, further clarifications of abnormal PLP-induced oligodendrocyte degeneration are required in order to identify relevant mechanisms to target for efficient protection against oligodendrocyte death. Because PLP overexpression may lead to its accumulation inside the endoplasmic reticulum (ER) and cause ER-stress, we explored whether ER-stress may pivotally determine 158JP cell survival/death. Viability assays, RT-qPCR, western blot and flow cytometry were combined to compare cell survival, ER-stress and apoptotic markers in 158JP and control (158N) oligodendrocytes. We observed a significant decreased viability/survival of 158JP compared to 158N cells. Consistently, ER-stress markers (BiP, caspase-12) increased in 158JP (+30%) compared to the controls. mRNA and protein ratios of apoptotic modulators (Bax/Bcl2) are higher in 158JP oligodendrocytes which are also more vulnerable than 158N cells to tunicamycin-induced ER-stress. Interestingly, 4-Phenylbutyrate (ER-stress inhibitor), which decreased Bip level and Bax/Bcl2 ratio in 158JP cells, significantly increased their survival. Our results, which show a direct link between the viability and endogenous levels of ER-stress and apoptotic markers in 158JP cells, also suggest that 4-Phenylbutyrate-based strategy may contribute to develop effective strategies against oligodendrocyte dysfunctions/death and myelin disorders.

Keywords: Oligodendrocytes; myelin disorders; Pelizaeus-Merzbacher; reticulum endoplasmic stress; apoptosis; 4-phenylbutyrate.

Highlights

158JP oligodendrocytes haboring PLP mutation are less viable than normal 158N cells

Basal levels of ER stress and apoptosis markers are higher in 158JP than 158N cells

158JP cells are more vulnerable to tunicamycin-evoked ER-stress than 158N cells

ER stress pivotally determines PLP mutation-induced 158JP oligodendrocyte death

4-PBA which reduces BiP level and Bax/Bcl2 ratio protects 158JP cells against death

Abbreviations

4-PBA: 4-Phenylbutyrate

DMEM: Dubelcco's modified eagle medium

EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid

ER: endoplasmic reticulum

FITC: fluorescein isothiocyanate

MTT: 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium-bromide

PLP: myelin proteolipid protein

PMD: Pelizaeus-Merzbacher disease

1. Introduction

Because PLP represents the major myelin protein in the central nervous system (CNS), the mutation of this protein induces various myelin disorders including leukodystrophies that are characterized by motor impairment associated with muscle disorders and cognitive dysfunctions. In general, the severity of these diseases depends on the types of PLP mutations. For instance, it is well known that the leukodystrophy designated Pelizaeus-Merzbacher disease (PMD) results from 3 different types of mutations (duplications, deletions, point mutations) of the gene PLP1 located on the X chromosome: the gene deletions cause the less severe phenotype while the duplication and point mutation generate the most severe cases, probably due to a toxic gain of function (Garbern, 2007). PLP gene is the site of genetic lesion in the mutant mouse jimpy (JP) carrying an X-linked recessive genetic disorder that exclusively affects the formation of myelin in the CNS of affected male mice with clinical symptoms similar to those occurring in PMD (Duncan et al., 1989; Farkas-Bargeton et al., 1972; Hudson et al., 1987; Knapp and Skoff, 1984; Knapp et al., 1986; Meier and Bischoff, 1975; Nave et al., 1986; Sidman et al., 1964; Vela et al., 1998). The severe dysmyelination evidenced in the CNS of JP mice was correlated to oligodendrocyte (OL) death or apoptosis evoked by aberrant PLP production (Cerghet et al., 2001; Knapp et al., 1999, 1986; Skoff, 1995; Skoff et al., 2004; Vela et al., 1996). However, although appreciable progress has been made in the elucidation of the mechanisms involved in PLP mutation-induced OL degeneration (Dhaunchak and Nave, 2007; Gow et al., 1994; Gow and Lazzarini, 1996; Gow et al., 1998; Roboti et al., 2009; Southwood et al., 2002; Swanton et al., 2003; Yamada et al., 2001), further investigations are required to clearly determine the relevant mechanisms that may selectively be targeted for the development of effective strategy against oligodendrocytal death and dysmyelinating disorders. All of such investigations cannot be performed in vivo or in primary cultures of JP mice brain, because they require heavy experimental procedures that are complicated by the short lifespan of JP mice. Also, in regard to ethical regulations, only restricted number of animals can be used for research

purposes. Therefore, it was extremely important to generate an immortalized cell line of jimpy OL (158JP) and a control wild-type lineage (158N) to foster cellular investigations that may allow the elucidation of the mechanisms involved in PLP mutation-induced OL degeneration (Feutz et al., 2001). Previous works reveal that 158JP OL exhibit several abnormalities including aberrant PLP insertion into the plasma membrane, cAMP pathway cell cycle, and plasmalogen deficiencies (Baarine et al., 2009; Feutz et al., 2001; Ghandour et al., 2002; Wood et al., 2011). However, in this specific 158JP cell line, the mechanistic link between the abnormal production of PLP and death-related mechanisms remains completely unknown. Investigations using other experimental models suggested that PLP mutation may lead to its accumulation inside the endoplasmic reticulum (ER) lumen and cause “ER stress” suspected as a key feature of various diseases involving protein misfolding (Dhaunchak and Nave, 2007; Gow et al., 1994; Gow and Lazzarini, 1996; Gow et al., 1998; Hetz and Mollereau, 2014; Roboti et al., 2009; Southwood et al., 2002; Swanton et al., 2003; Yamada et al., 2001). PLP accumulation in the ER and morphological abnormalities of the ER have also been found in pluripotent stem cells derived from PMD patients (Numasawa-Kuroiwa et al., 2014). Nevertheless, the development of effective strategy based on the modulation of ER stress to prevent abnormal PLP-induced OL death has until now received little attention. In this study, we investigated the involvement of ER stress in the pathophysiological processes determining aberrant PLP-induced death by assessing the links between cell survival and endogenous levels of ER stress and apoptosis markers in 158JP and control 158N OL. We have also compared the sensitivity and vulnerability of 158JP and 158N OL to tunicamycin-induced ER stress. Finally, we explored the ability of 4-Phenylbutyrate (4-PBA), known as a pharmacological inhibitor of ER stress (Basseri et al., 2009; Cho et al., 2014) to protect against abnormal PLP-evoked 158JP OL death through the down-regulation of ER stress and apoptotic markers.

2. Material & methods

2.1 Chemicals and reagents

Dubelcco's modified eagle medium (DMEM), Cell Dissociation Solution Non-enzymatic, penicillin/streptomycin, 4-PBA, tunicamycin, Trypan Blue and MTT were purchased from Sigma (St. Quentin, France). Fetal calf serum was from Gibco (Basel, Switzerland). NucleoZOL reagent was from Macherey-Nagel (Düren, Germany). DNA Primers were from Eurogentec (Angers, France) and Biorad (Hercules, CA, USA). iQ™ SYBR® Green Supermix and iScript™ cDNA Synthesis Kit were purchased from Biorad (Hercules, CA, USA).

2.2 Cell culture

158N and 158JP OLs were grown at 37°C under a 5% CO_2 atmosphere, in DMEM supplemented with 5% heat-inactivated fetal calf serum, 2 mM Glutamax, 0.5% Penicillin/Streptomycin and 4.5 g/l glucose.

For drug treatments, 158JP cells were seeded and allowed to grow for 24h then culture media was removed and replaced by new media only (control) or by new media containing 4-PBA at 500 µM or tunicamycin (an ER stress inducer) in a dose-dependent manner (from 5 µg/ml to 0.0005 µg/ml).

2.3 Trypan blue exclusion assay

158N and 158JP cells were seeded into a 24-well plate with 10^5 cells per well and incubated 24 h at 37°C. Then, the cells were detached from the plate using for 5 min a non-enzymatic cell dissociation solution and immediately after DMEM supplemented with serum was added. Equal volumes of cells suspension and 0.4% (v/v) Trypan Blue in phosphate-buffered saline (PBS) were mixed. Ten microliters of each experiment were transferred to a

non-gridded disposable Countess® chamber Slide and cells were scored using a Countess® automated cell counter (Invitrogen, Saint Aubin, France). Each experiment was counted twice. The percent of survival cells was calculated by the Countess® software as the number of living cells divided by total cell number (including dead and living cells). The percentages of surviving cells in both control and drug conditions were counted blinded to avoid any counting bias. The percentage values in control conditions were arbitrary set at 100%.

2.4 MTT reduction assay

To assess cell viability, MTT reduction assays were performed according to the manufacturer's protocol. 158N and 158JP cells were seeded at 2000 cells/wells into 96-wells plates and allowed to growth for 24, 48 and 72h in DMEM without phenol red. Thiazolyl blue tetrazolium bromide was added into wells at a final concentration of 0.5 mg/ml. The quantity of formazan formed, which is assumed to be proportional to the number of viable cells, is then detected by recording the absorbance at 570 nm. MTT signal detected for each cell type in basal condition was arbitrary set at 100%. This basal signal reflecting the total number of living cells in each cell type was the reference that served for the accurate determination of dose-dependent effects of tunicamycin at 20h.

2.5 Flow cytometry

The cells were detached, centrifuged for 10 min at 500g (room temperature) and re-suspended with PBS. Cells were incubated in FITC-ATAD-FMK (CaspILLUME, GeneTex, Irvine, CA, USA), annexin V-PE and propidium iodure (eBioscience, San Diego, CA, USA) at 10^6 cells/ml according to the manufacturer's protocol. Cells were then centrifuged at 500g for 5min and the supernatant was removed, then the cells were washed 2 times with PBS and analyzed by flow cytometry (Navios, Beckman Coulter, Indianapolis, IN, USA).

2.6 Western Blotting

158N and 158JP cells at 80% confluency were dissociated and incubated for 1h in a RIPA lysis Buffer (Thermo-scientific) supplemented with 1:20 of Roche complete protease cocktail inhibitor. After incubation on ice for 1h, cell lysates were then clarified by centrifugation at 4°C for 45 min at 12000*g* and the supernatant was saved for protein analysis and Western blotting. Total protein concentration was determined by the BCA kit (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin, France). A total of 45-µg proteins were fractionated by 4–20% mini-PROTEAN TGX stain-free gels (Biorad, Hercules, CA, USA). After electrotransfer to polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes (BioRad, Hercules, CA, USA), the blots were incubated for 1h at room temperature with primary antibodies against Bax (Santa Cruz, Dallas, TX, USA, sc-6236, dilution 1:1000), Bcl-2 (Santa Cruz, Dallas, TX, USA, sc-509, dilution 1:200), BiP (Enzo life science, Farmingdale, New York, USA, ADI-SPA-826 dilution 1:1000). The membranes were then washed six times with TBS Tween 20 and probed with corresponding secondary antibodies conjugated with horse radish peroxidase (Abliance, Compiège, France, dilution 1:1000) at room temperature for 45 min. Detection was carried out by using a chemoluminescence detection kit (Clarity™ Western ECL substrate, Biorad, Hercules, CA, USA). Signals were detected with ChemiDoc MP™ (Biorad, Hercules, CA, USA). The relative intensity was densitometrically determined by using the Image Lab software (Biorad, Hercules, CA, USA) as the intensity of the bands compared to total protein ratio revealed by stain free method.

2.7 Reverse transcription and Real-time qPCR

Total RNA from 158N and 158JP cells were extracted using NucleoZOL reagent according to the manufacturer's instructions. The quality and quantity of RNA was determined by optical density (OD) absorptions ratios OD_{260nm}/OD_{280nm} >1.7 and OD_{260nm}/OD_{230nm} >1.7. Reverse transcription was performed with 1µg RNA using Biorad iScript™ cDNA synthesis kits. qPCR was performed with a thermal iCycler (Biorad, Hercules, CA, USA) using BioRad SYBRGreen® dye. For each sample, the reaction mix was a make-up of 320nM forward primer, 320nM reverse primer, 12.5nM probe and 5µl cDNA template in a total reaction volume of 25µl. To calculate starting quantities, a standard curve based on successive cDNA dilutions was set up. Starting quantities of genes of interest were reported to those of the HMBS gene (used as a housekeeping gene) in the same plate to ensure an accurate calculation. All samples were analyzed in triplicate and the mean and standard deviation were determined. Specificity of the amplification was controlled by a melting curve ranging from 89 to 94°C and allowing the identification of a single peak corresponding to the amplicon.

The specific primer sequences were for BAX; 5′- CCAGGATGCGTCCACCAAGA -3′ (Forward), 5′- GGTGAGGACTCCAGCCACAA -3′ (Reverse), BCL-2; 5′ CTCGTCGCTACCGTCGTGACTTCG -3′ (Forward) 5′- CAGATGCCGGTTCAGGTACTCAGTC -3′ (Reverse), CHOP; 5'- TTCTCTGGCTTGGCTGACTGA-3' (Forward), 5'-TGGTCTTCCTCCTCTTCCTCCT-3' (Reverse), HMBS ; 5'-GATGGGCAACTGTACCTGACTG-3' (Reverse), 5'- CTGGGCTCCTCTTGGAATG-3' (Forward) and for GRP78(BIP) primer sequences were designed by Biorad (Hercules, CA, USA).

2.8 Statistical analysis

Statistical analyses were performed using the GraphPad-Prism program (GraphPad-Prism, San Diego, CA, USA). Comparisons between two means were evaluated by the Student's *t* test. Statistical significance of differences between more than two means was determined using a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's multiple comparison test. Dose–effect parameters for tunicamycin (ED_{50} values) were determined by non-linear regression of the experimental data and the goodness of fits was estimated by the R-squared value (>0.7). All experiments were performed with at least two independent passages.

3. Results

3.1 158JP OL exhibit a decreased viability compared to control 158N cells

MTT and Trypan blue assay were performed to compare the viability of 158JP and 158N OL, MTT reduction assay is known as a sensitive assay for the measurement of cell viability and proliferation, based on tetrazolium salt reduction into insoluble formazan produced by the mitochondria. The analysis of formazan absorbance showed that 158N cells had more mitochondrial activity than 158JP cells 48h and 72h after seeding (Fig. 1 A). Because MTT method only measures living cell percentage, Trypan blue exclusion assays was used to determine the percentages of living and dead cells. A significant increase ($p<0.0001$) of 158JP OL cell death (49.38% ± 1.824, n=12) was observed in comparison to the control 158N cells (17.67% ± 1.539, n=12). Therefore, it appears that the loss of mitochondrial activity in 158JP OL was not only due to a delayed cell proliferation but also to a cell death increase.

3.2 The JP mutation increases apoptosis but not necrosis level to decrease 158 JP OL survival

Flow cytometry combined with double staining (Annexin-V and Propidium Iodure) was used to identify the mechanism inducing the increased cell death observed in 158JP OL. We observed 8.5% vs. 15.6% for early apoptotic cells and 14% vs. 33.5% for late apoptotic cells in 158N compared to 158JP OL, respectively (Fig. 2). The percentage of necrotic cells was similar and constant in the two cells lines (8.9% vs. 7.9%). More importantly, the combination of RT-qPCR and Western blot experiments revealed that the basal ratios of mRNA and protein levels of key apoptotic markers Bax (pro-apoptotic)/Bcl-2 (anti-apoptotic) were higher in 158JP than in 158N OL (Fig. 3). Interestingly, we found that the expression level of the anti-apoptotic marker Bcl2 was extremely low and remained under the limit of detection of the Western-Blot analyzes. Altogether, these results suggest that the JP mutation may evoke an increased apoptosis level which induces the decreased viability or increased death of 158JP OL.

3.3 158JP OL exhibit a high basal level of ER stress compared to control 158N OL

To check whether JP mutation-induced increased apoptosis level may result from ER stress evoked by aberrant PLP accumulation in the ER, we assessed the basal levels of ER stress markers in 158JP and 158N OL. Because BiP is a chaperone known to sense protein aggregation and binding, allowing the activation of UPR response downstream pathways (Bertolotti et al., 2000; Flynn et al., 1991; Lee, 2005; Quinones et al., 2008), we measured BiP mRNA and protein levels in 158JP and 158N cells. The expression levels of BiP mRNA and protein were significantly higher in 158JP compared to 158N OL (Fig. 4). Consistently, we found that the expression level of caspase-12, which pivotally mediates ER-stress-induced apoptosis and cell death (Hitomi et al., 2004; Martinez et al., 2010; Morishima et al., 2002; Nakagawa et al., 2000; Szegezdi et al., 2003), strongly increased in 158JP cells but not in the control 158N OL (Fig. 5). Indeed, our quantitative evaluation revealed a 30%

increase of caspase 12 labeling mean intensity in 158JP OL and the qualitative analysis showed a right shift of the fow cytometry fluorescent signal in 158JP compared to the control 158N cells (Fig. 5A, B).

3.4 158JP OL are more vulnerable than the control cells to the ER stress inducer tunicamycin

To assess the sensitivity of 158JP and 158N OL to tunicamycin, the well known ER stress pharmacological inducer (Nami et al., 2016; Shen et al., 2015; Wang et al., 2015), a dose-dependent study was performed. Tunicamycin induced a dose-dependent decrease of cell viability in both 158JP and 158N OL (Fig. 6). However, tunicamycin doses killing 50% of cells (ED_{50} values) after 20h exposure were 0.1356 ± 0.007 and 0.0020 ± 0.0001 µg/ml for 158N and 158JP cells, respectively (Fig. 6). These data suggest that the initially elevated basal level of ER stress promoting factors occurring in 158JP OL is amplified by tunicamycin-evoked ER stress pathways to make 158JP cells extremely vulnerable than the control OL.

3.5 Protective effect of ER stress inhibitor 4-PBA against JP mutation induced OL death

Because 4-PBA is well known as a down-regulator of ER stress (Basseri et al., 2009; Cho et al., 2014), we assessed the ability of this drug to protect against aberrant PLP accumulation-induced increased 158JP cell death. Thus, a first series of dose-reponse studies were performed to indentify the optimal concentration of 4-PBA. While a strong dose-dependent beneficial effects was detected on the levels of ER stress and apoptosis makers in 158JP cells using 4-PBA at 500µM and 1mM, we found that the housekeeping gene HMBS level was altered by 4-PBA at 1mM which is the highest dose (Fig. 7A). Therefore 4-PBA at 500µM appeared as the optimal dose inducing strong beneficial actions without affecting or disturbing the reference HMBS gene expression level. Trypan blue assays were performed on 158JP cells in the absence or presence of 4-PBA (500 µM) during 48h. The treatment with 4-PBA induced about 18% increase (17.6 ± 5.8 %) of 158JP OL survival (Fig.

7B). Consistently, molecular analyzes showed that 4-PBA treatment also decreased significantly the expression levels of ER stress markers such as BiP (21.2 ± 4.2%) and CHOP (19.5 ± 3.8%) in 158JP cells (Fig. 8). Furthermore, the exposure to 4-PBA induced a significant anti-apoptotic effect revealed by the decrease of Bax (pro-apoptotic)/Bcl-2 (anti-apoptotic) ratio in 158JP OL. Indeed, under 4-PBA treatment, Bax and Bcl-2 expression levels decreased or increased, respectively in 158JP OL (Fig. 8).

4. Discussion

The present study combines various comparative analyzes to demonstrate the existence of 3 major differences between 158JP OL, that represents a cell model to investigate PLP mutation-induced myelin abnormalities/disorders, and the control 158N OL. Indeed, (i) MTT-based assays revealed that 158JP OL exhibit a decreased viability/survival compared to 158N cells; (ii) Trypan blue assays showed the existence of high cell death or mortality of 158JP compared to the control 158N OL; (iii) Most importantly, the combination of real time RT-qPCR, Western-Blot analyzes and Flow cytometry methods made it possible to reveal that PLP mutation-induced decreased viability and increased death/mortality of 158JP OL pivotally resulted from an increased endogenous/basal level of ER stress and an elevated apoptosis rate occurring in 158JP but not in the control 158N OL. To confirm the critical involvement of ER stress in the induction of increased apoptosis and subsequent death of 158JP OL, our study also demonstrates that 4-PBA, which acts as a chemical chaperone to reduce ER stress-evoked apoptosis (Kubota et al., 2006; Mimori et al., 2012; Qi et al., 2004; Yam et al., 2007), significantly prevents PLP mutation-induced 158JP cell death.

Our results showing the decreased viability and increased mortality of 158JP cells are in perfect line with previous studies which have used microscopic and ultrastructural methods to show that the percentage of OL death is at least 10 times higher in developing JP mice CNS tissues compared to normal mice tissues (Knapp et al., 1986). Furthermore, while the

potential implication of ER stress has been suspected in other experimental models (Dhaunchak and Nave, 2007; Gow et al., 1994; Gow and Lazzarini, 1996; Gow et al., 1998; Roboti et al., 2009; Southwood et al., 2002; Swanton et al., 2003; Yamada et al., 2001), to our knowledge, the direct link between ER stress, apoptosis and an increased 158 JP OL death supported by the simultaneous or concomitant characterization of cellular markers of both ER stress and apoptosis has never been evidenced as described for the first time herein. Indeed, our results show that the decreased viability and enhanced death/mortality of 158JP OL are correlated to the increase of chaperone protein BiP which is known to be upregulated during ER stress (Lee, 2005). In addition, because UPR may be either cytoprotective or cytotoxic depending on different factors such as the time and/or the intensity of stress (Hetz and Mollereau, 2014; Southwood et al., 2002; Southwood et al., 2016), we have also assessed Bax/Bcl-2 ratio and capase-12 expression to determine the apoptotic status of 158JP OL. Caspase-12 has been well demonstrated as a key ER stress activated caspase which stimulates pro-caspases 9 and 3 to launch irreversibly apoptosis (Hitomi et al., 2004; Martinez et al., 2010; Morishima et al., 2002; Nakagawa et al., 2000; Szegezdi et al., 2003). But controversial data have claimed minimal role for caspase-12 in the UPR in OL (Sharma and Gow, 2007). By contrast, the correlation of increased Bax(pro-apoptotic factor)/Bcl-2(anti-apoptotic factor) ratio with apoptosis has been extensively demonstrated and conventionally well admitted (Del Poeta et al., 2003; Korsmeyer, 1999; Oltvai et al., 1993; Westphal et al., 2011; Yang et al., 1994; Youle and Strasser, 2008). Therefore, we combined several approaches including RT-qPCR, Western Blotting and flow cytometry analyzes to show that the basally elevated level of ER stress marker BiP is well complemented by the overexpression of caspase-12 and the occurrence of Bax/Bcl-2 increase in 158JP cells. These observations strongly confirm the link between the high endogenous/basal amount of ER stress, the elevated level of apoptosis and the increased mortality/death of 158JP OL. Moreover, our results also revealed that 158JP OL are extremely vulnerable than the control 158N cells in the presence of tunicamycin that is well-known as an inducer of ER stress through the alteration of protein N-glycosylation (Nami et

al., 2016; Shen et al., 2015; Wang et al., 2015). Indeed, extremely low doses of tunicamycin are sufficient to induce high percentage of 158JP cell death as tunicamycin ED_{50} killing 50% of 158JP OL is about 68 times lower than the dose (ED_{50}) causing 50% of control 158N OL death. These results consolidate the idea that PLP mutation may predispose 158JP OL to ER stress-evoked cell death via the activation of ER stress-related pathways that generate a basally elevated amount of endogenous ER stressors in 158JP cells. Consequently, just a little additional or complementary amount of ER stressors (induced by very low doses of tunicamycin) may be sufficient to drive these 158JP OL to death. The situation is different in the control 158N OL because the basal/endogenous level of ER stressors in these cells is very low therefore significant doses of tunicamycin are necessary to generate high intracellular level of ER stressors which may be able to provoke 158N cell death. Altogether, these data suggest that 158JP OL, which basally exhibit aberrant PLP-evoked high intracellular or endogenous level of ER stress, constitutes a relevant model to test the efficacy of drugs aim at protecting against OL or nerve cell degeneration through the down-regulation of ER stress-evoked apoptosis and death.

To check this idea, we also investigated in the present study the ability of 4-PBA to protect against aberrant PLP-induced ER stress, apoptosis and death of 158JP OL. Indeed, 4-PBA is a drug approved for the treatment of urea cycle disorders which has been shown to act as a chemical chaperone reducing ER stress-induced apoptosis (Kubota et al., 2006; Mimori et al., 2012; Qi et al., 2004; Yam et al., 2007). Beneficial effects of 4-PBA have been evidenced in various experimental models of misfolded protein accumulation-related disorders (Inden et al., 2007; Ricobaraza et al., 2009; Wiley et al., 2011). Interestingly, we found that 4-PBA treatment efficiently increased 158JP cell survival by decreasing significantly intracellular levels of ER stress markers BiP and CHOP and these data were also consistently correlated to the down-regulation of the apoptotic Bax/Bcl-2 ratio in 158JP OL. The protective effect of 4-PBA on ER stress-induced cell death is commonly assigned to its chaperone-like activity (Kolb et al., 2015; Mimori et al., 2013). However 4-PBA is also an histone deacetylase inhibitor (HDACi) suggesting that its protective effect may also results

from its capacity to directly modulate genes involved in survival and adaptive ER stress response (Miller et al., 2011; Wang et al., 2011).

While BiP overexpression is always related to ER stress increase in several models (in agreement with 4-PBA-induced BiP decrease observed herein), we believe that it is fair and necessary to recall that there is a controversial debate about the protein CHOP considered to be pro-deleterious or anti-apoptotic depending on the situations (Penas et al., 2011; Southwood et al., 2002). Here, we found that 4-PBA treatment decreased CHOP expression concomitantly with an improvement of 158JP OL survival. In accordance with our observations, previous studies have also shown that the neuroprotector valproate which decreases CHOP expression is capable of preserving OL and axons from death after spinal cord injury (Penas et al., 2011). Moreover, 4-PBA treatment, which promoted both 158JP and 158N cell differentiation, has been shown to enhance various enzyme or transporter (CNPase, peroxisomal transporter *abcd2*, ACOX1 or catalase) expression and/or activities (Baarine et al., 2009). Therefore, these data, taken together with our results showing 4-PBA-induced decreased levels of BiP and CHOP in 158JP cells in addition to the down-regulation of pro-apoptotic factor Bax, concomitantly with the up-regulation of anti-apoptotic factor Bcl-2, strongly support the existence of a beneficial action of 4-PBA against PLP mutation-induced ER stress, apoptosis and OL death.

5. Conclusions

The present work, which demonstrates the existence of a direct relationship between the viability or survival of 158JP OL and the occurrence of elevated endogenous/basal levels of ER-stress and apoptotic factors, also reveals that ER-stress may critically determine PLP mutation-induced 158JP cell death. The results also suggest that 4-PBA-based strategy and/or the characterization of novel pharmacological agents/compounds reducing efficiently and safely ER stress-induced apoptosis and OL death may represent a promising approach to explore for the development of effective therapies against myelin disorders.

Acknowledgments

This work was supported by grants from INSERM and the University of Strasbourg. Authors want to thank Dr Said Ghandour (former member of our research Unit INSERM 1119) who provided the initial vials of 158JP and 158N cell lines. ASW was a PhD fellow granted by the Region Alsace (Grand Est) and the NeuroRhine Consortium coordinated by AGMN and funded by INTERREG IV Program (European Fund for Regional Development) in the Upper Rhine Region and the Offensive Science Call 2012.

Competing interest

The authors declare no competing interests.

Funding

This work was supported by grants from INSERM and the University of Strasbourg. ASW was a PhD fellow granted by the Region Alsace (Grand Est) and the NeuroRhine Consortium coordinated by AGMN and funded by INTERREG IV Program (European Fund for Regional Development) in the Upper Rhine Region and the Offensive Science Call 2012.

Figure legends

Fig. 1. Illustration of the decreased viability and increased mortality of 158JP compared to 158N OL. (A) Time-course study of 158N (▪) and 158JP (▪) cell viability. MTT reduction assay was used to determine the differences between the viability/survival of the 2 cell line cultures at 24, 48 and 72 hours, n=8. (B) Trypan blue assay was performed to calculate the effective percentage of dead cells in 158N and 158JP OL cultures after 48h, n=13. The values represent the mean + S.E.M. (****$p < 0.0001$).

Fig. 2. Flow cytometry qualitative assessment of apoptosis in 158JP and 158N cells. PI staining is represented by the y axis and Annexin-V by the x axis. The quadrant 1 represents necrotic cells, quadrant 2 the late-apoptotic and/or necrotic cells, quadrant 3 the viable cells and quadrant 4 the early apoptotic cells.

Fig. 3. Evaluation of the basal levels of apoptotic markers in 158N and 158JP OL. (A) RT-qPCR assessment of Bax/Bcl-2 mRNA ratio in 158N and 158JP, n=12. The values represent the mean ± S.E.M (****$p < 0.0001$). (B) Western blot image and (C) semi-quantification of Bax/Bcl-2 protein ratio in 158N and 158JP cells; total protein was used as loading control, n=8. The values represents the mean + S.E.M. (****$p < 0.0001$).

Fig. 4. Evaluation of the basal levels of ER stress in 158N and 158JP OL. (A) RT-qPCR assessment of the chaperone protein BiP expression in 158N and 158JP, n=16. The values represent the mean ± S.E.M (****$p < 0.0001$). (B) Western blot image and (C) semi-quantification of BiP protein in 158N and 158JP cells; total protein was used as loading control, n=8. The values represent the mean + S.E.M. (*$p < 0.05$).

Fig. 5. Flow cytometry qualitative (A) and quantitative (B) assessment of activated caspase-12. Each value represents the mean + S.E.M. of three independent experiments (*p < 0.05). The Mean of Intensity of Fluorescence (MIF) represents the mean of fluorescence Intensity of 10 000 cells count for each experiment.

Fig. 6. Dose–response effect of tunicamycin on 158N (●) and 158JP (■) cell viability. MTT reduction assay was used to determine the cell viability that was expressed as percent of control (untreated cells). MTT signal assessed for each cell type in basal condition (absence of tunicamycin) is arbitrarily set at 100%. Tunicamycin concentration evoking 50% of cell survival (or killing 50% of cells) corresponds to the ED_{50} (µg/ml) for each cell type (line with dotted), n=8. The values on the graph represent the mean ± S.E.M. of cells survival (****p < 0.0001).

Fig. 7. Effects of 4-PBA on the housekeeping gene HMBS expression level and on 158 JP OL survival.

(A) RT-qPCR assessment of HMBS expression level in 158JP OL treated with the control solution or with 4-PBA at 500µM or 1mM, n=12. The values represent the mean + S.E.M (****p < 0.0001). (B) Trypan blue exclusion assay measurement of the effect of 4-PBA on 158JP OL survival. The charts show the percentages of surviving 158JP cells in the absence (control) and presence of 4-PBA (500µM) during 48h, n=20. The values represent the mean + S.E.M. (**p < 0.01).

Fig. 8. Effects of 48h 4-PBA (500µM) treatment on ER stress and apoptosis markers. (A) RT-qPCR assessment of BiP expression in 158N and 158JP, n=16. The values represent the mean + S.E.M (***p < 0.001). (B) RT-qPCR evaluation of CHOP expression in 158N and

158JP, n=16. The values represent the mean ± S.E.M (**p < 0.01). (C) RT-qPCR assessment of Bax/Bcl-2 ratio in 158N and 158JP, n=16. The values represents the mean + S.E.M. (**p < 0.0001).

References

Baarine, M., Ragot, K., Genin, E.C., El Hajj, H., Trompier, D., Andreoletti, P., Ghandour, M.S., Menetrier, F., Cherkaoui-Malki, M., Savary, S., Lizard, G., 2009. Peroxisomal and mitochondrial status of two murine oligodendrocytic cell lines (158N, 158JP): potential models for the study of peroxisomal disorders associated with dysmyelination processes. J. Neurochem. 111, 119-131.

Basseri, S., Lhotak, S., Sharma, A.M., Austin, R.C., 2009. The chemical chaperone 4-phenylbutyrate inhibits adipogenesis by modulating the unfolded protein response. J. Lipid Res. 50, 2486-2501.

Bertolotti, A., Zhang, Y.H., Hendershot, L.M., Harding, H.P., Ron, D., 2000. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. Nat. Cell Biol. 2, 326-332.

Cerghet, M., Bessert, D.A., Nave, K.A., Skoff, R.P., 2001. Differential expression of apoptotic markers in jimpy and in Plp overexpressors: evidence for different apoptotic pathways. J. Neurocytol. 30, 841-855.

Cho, J.A., Zhang, X., Miller, G.M., Lencer, W.I., Nery, F.C., 2014. 4-Phenylbutyrate Attenuates the ER Stress Response and Cyclic AMP Accumulation in DYT1 Dystonia Cell Models. Plos One 9, e110086.

Del Poeta, G., Venditti, A., Del Principe, M.I., Maurillo, L., Buccisano, F., Tamburini, A., Cox, M.C., Franchi, A., Bruno, A., Mazzone, C., Panetta, P., Suppo, G., Masi, M., Amadori, S.,

2003. Amount of spontaneous apoptosis detected by Bax/Bcl-2 ratio predicts outcome in acute myeloid leukemia (AML). Blood 101, 2125-2131.

Dhaunchak, A.S., Nave, K.A., 2007. A common mechanism of PLP/DM20 misfolding causes cysteine-mediated endoplasmic reticulum retention in oligodendrocytes and Pelizaeus-Merzbacher disease. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 104, 17813-17818.

Duncan, I.D., Hammang, J.P., Goda, S., Quarles, R.H., 1989. Myelination in the Jimpy Mouse in the Absence of Proteolipid Protein. Glia 2, 148-154.

Farkas-Bargeton, E., Robain, O., Mandel, P., 1972. Abnormal glial maturation in the white matter in Jimpy mice. An optical study. Acta Neuropathol. 21, 272-281.

Feutz, A.C., Pham-Dinh, D., Allinquant, B., Miehe, M., Ghandour, M.S., 2001. An immortalized jimpy oligodendrocyte cell line: defects in cell cycle and cAMP pathway. Glia 34, 241-252.

Flynn, G.C., Pohl, J., Flocco, M.T., Rothman, J.E., 1991. Peptide-Binding Specificity of the Molecular Chaperone Bip. Nature 353, 726-730.

Garbern, J.Y., 2007. Pelizaeus-Merzbacher disease: Genetic and cellular pathogenesis. Cell. Mol. Life Sci. 64, 50-65.

Ghandour, M.S., Feutz, A.C., Jalabi, W., Taleb, O., Bessert, D., Cypher, M., Carlock, L., Skoff, R.P., 2002. Trafficking of PLP/DM20 and cAMP signaling in immortalized jimpy oligodendrocytes. Glia 40, 300-311.

Gow, A., Friedrich, V.L., Lazzarini, R.A., 1994. Many Naturally-Occurring Mutations of Myelin Proteolipid Protein Impair Its Intracellular-Transport. J. Neurosci. Res. 37, 574-583.

Gow, A., Lazzarini, R.A., 1996. A cellular mechanism governing the severity of Pelizaeus-Merzbacher disease. Nat. Genet. 13, 422-428.

Gow, A., Southwood, C.M., Lazzarini, R.A., 1998. Disrupted proteolipid protein trafficking results in oligodendrocyte apoptosis in an animal model of Pelizaeus-Merzbacher disease. J. Cell Biol. 140, 925-934.

Hetz, C., Mollereau, B., 2014. Disturbance of endoplasmic reticulum proteostasis in neurodegenerative diseases. Nat. Rev. Neurosci. 15, 233-249.

Hitomi, J., Katayama, T., Taniguchi, M., Honda, A., Imaizumi, K., Tohyama, M., 2004. Apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress depends on activation of caspase-3 via caspase-12. Neurosci. Lett. 357, 127-130.

Hudson, L.D., Berndt, J.A., Puckett, C., Kozak, C.A., Lazzarini, R.A., 1987. Aberrant splicing of proteolipid protein mRNA in the dysmyelinating jimpy mutant mouse. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 84, 1454-1458.

Inden, M., Kitamura, Y., Takeuchi, H., Yanagida, T., Takata, K., Kobayashi, Y., Taniguchi, T., Yoshimoto, K., Kaneko, M., Okuma, Y., Taira, T., Ariga, H., Shimohama, S., 2007. Neurodegeneration of mouse nigrostriatal dopaminergic system induced by repeated oral administration of rotenone is prevented by 4-phenylbutyrate, a chemical chaperone. J. Neurochem. 101, 1491-1504.

Knapp, P.E., Bartlett, W.P., Williams, L.A., Yamada, M., Ikenaka, K., Skoff, R.P., 1999. Programmed cell death without DNA fragmentation in the jimpy mouse: secreted factors can enhance survival. Cell Death Differ. 6, 136-145.

Knapp, P.E., Skoff, R.P., 1984. Increased glial cell death in jimpy mouse optic nerve and spinal cord, Soc. Neurosci. Abstr. 10, 428.

Knapp, P.E., Skoff, R.P., Redstone, D.W., 1986. Oligodendroglial Cell-Death in Jimpy Mice - an Explanation for the Myelin Deficit. J. Neurosci. 6, 2813-2822.

Kolb, P.S., Ayaub, E.A., Zhou, W., Yum, V., Dickhout, J.G., Ask, K., 2015. The therapeutic effects of 4-phenylbutyric acid in maintaining proteostasis. Int. J. Biochem. Cell B. 61, 45-52.

Korsmeyer, S.J., 1999. BCL-2 gene family and the regulation of programmed cell death. Cancer Res. 59, 1693s-1700s.

Kubota, K., Niinuma, Y., Kaneko, M., Okuma, Y., Sugai, M., Omura, T., Uesugi, M., Uehara, T., Hosoi, T., Nomura, Y., 2006. Suppressive effects of 4-phenylbutyrate on the aggregation of Pael receptors and endoplasmic reticulum stress. J. Neurochem. 97, 1259-1268.

Lee, A.S., 2005. The ER chaperone and signaling regulator GRP78/BiP as a monitor of endoplasmic reticulum stress. Methods 35, 373-381.

Martinez, J.A., Zhang, Z.Q., Svetlov, S.I., Hayes, R.L., Wang, K.K., Larner, S.F., 2010. Calpain and caspase processing of caspase-12 contribute to the ER stress-induced cell death pathway in differentiated PC12 cells. Apoptosis 15, 1480-1493.

Meier, C., Bischoff, A., 1975. Oligodendroglial Cell Development in Jimpy Mice and Controls - Electron-Microscopic Study in Optic-Nerve. J. Neurol. Sci. 26, 517-528.

Miller, A.C., Cohen, S., Stewart, M., Rivas, R., Lison, P., 2011. Radioprotection by the histone deacetylase inhibitor phenylbutyrate. Radiat. Environ. Bioph. 50, 585-596.

Mimori, S., Ohtaka, H., Koshikawa, Y., Kawada, K., Kaneko, M., Okuma, Y., Nomura, Y., Murakami, Y., Hamana, H., 2013. 4-Phenylbutyric acid protects against neuronal cell death by primarily acting as a chemical chaperone rather than histone deacetylase inhibitor. Bioorg. Med. Chem. Lett. 23, 6015-6018.

Mimori, S., Okuma, Y., Kaneko, M., Kawada, K., Hosoi, T., Ozawa, K., Nomura, Y., Hamana, H., 2012. Protective effects of 4-phenylbutyrate derivatives on the neuronal cell death and endoplasmic reticulum stress. Biol. Pharm. Bull. 35, 84-90.

Morishima, N., Nakanishi, K., Takenouchi, H., Shibata, T., Yasuhiko, Y., 2002. An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis - Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12. J. Biol. Chem. 277, 34287-34294.

Nakagawa, T., Zhu, H., Morishima, N., Li, E., Xu, J., Yankner, B.A., Yuan, J.Y., 2000. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. Nature 403, 98-103.

Nami, B., Donmez, H., Kocak, N., 2016. Tunicamycin-induced endoplasmic reticulum stress reduces in vitro subpopulation and invasion of CD44+/CD24-phenotype breast cancer stem cells. Exp. Toxicol. Pathol. 68, 419-426.

Nave, K.A., Lai, C., Bloom, F.E., Milner, R.J., 1986. Jimpy Mutant Mouse - a 74-Base Deletion in the Messenger-Rna for Myelin Proteolipid Protein and Evidence for a Primary Defect in Rna Splicing. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 83, 9264-9268.

Numasawa-Kuroiwa, Y., Okada, Y., Shibata, S., Kishi, N., Akamatsu, W., Shoji, M., Nakanishi, A., Oyama, M., Osaka, H., Inoue, K., Takahashi, K., Yamanaka, S., Kosaki, K., Takahashi, T., Okano, H., 2014. Involvement of ER stress in dysmyelination of Pelizaeus-Merzbacher Disease with PLP1 missense mutations shown by iPSC-derived oligodendrocytes. Stem Cell Rep. 2, 648-661.

Oltvai, Z.N., Milliman, C.L., Korsmeyer, S.J., 1993. Bcl-2 Heterodimerizes in-Vivo with a Conserved Homolog, Bax, That Accelerates Programmed Cell-Death. Cell 74, 609-619.

Penas, C., Verdu, E., Asensio-Pinilla, E., Guzman-Lenis, M.S., Herrando-Grabulosa, M., Navarro, X., Casas, C., 2011. Valproate Reduces Chop Levels and Preserves Oligodendrocytes and Axons after Spinal Cord Injury. Neuroscience 178, 33-44.

Qi, X., Hosoi, T., Okuma, Y., Kaneko, M., Nomura, Y., 2004. Sodium 4-phenylbutyrate protects against cerebral ischemic injury. Mol. Pharmacol. 66, 899-908.

Quinones, Q.J., de Ridder, G.G., Pizzo, S.V., 2008. GRP78: A chaperone with diverse roles beyond the endoplasmic reticulum. Histol. Histopathol. 23, 1409-1416.

Ricobaraza, A., Cuadrado-Tejedor, M., Perez-Mediavilla, A., Frechilla, D., Del Rio, J., Garcia-Osta, A., 2009. Phenylbutyrate ameliorates cognitive deficit and reduces tau pathology in an Alzheimer's disease mouse model. Neuropsychopharmacol. 34, 1721-1732.

Roboti, P., Swanton, E., High, S., 2009. Differences in endoplasmic-reticulum quality control determine the cellular response to disease-associated mutants of proteolipid protein. J. Cell Sci. 122, 3942-3953.

Sharma, R., Gow, A., 2007. Minimal role for caspase 12 in the unfolded protein response in oligodendrocytes in vivo. J. Neurochem. 101, 889-897.

Shen, M.Z., Wang, L., Quo, M.W., Xue, Q., Hu, C., Li, X., Fan, L., Wang, X.M., 2015. A novel endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis model using tunicamycin in primary cultured neonatal rat cardiomyocytes. Mol. Med. Rep. 12, 5149-5154.

Sidman, R.L., Dickie, M.M., Appel, S.H., 1964. Mutant mice (quacking and jimpy) with deficient myelination in the central nervous system. Science 144, 309-311.

Skoff, R.P., 1995. Programmed Cell-Death in the Dysmyelinating Mutants. Brain Pathol. 5, 283-288.

Skoff, R.P., Bessert, D.A., Cerghet, M., Franklin, M.J., Rout, U.K., Nave, K.A., Carlock, L., Ghandour, M.S., Armant, D.R., 2004. The myelin proteolipid protein gene modulates apoptosis in neural and non-neural tissues. Cell Death Differ. 11, 1247-1257.

Southwood, C.M., Garbern, J., Jiang, W., Gow, A., 2002. The unfolded protein response modulates disease severity in Pelizaeus-Merzbacher disease. Neuron 36, 585-596.

Southwood, X.C., Fykkolodziej, B., Maheras, K.J., Garshott, D.M., Estill, M., Fribley, A.M., Gow, A., 2016. Overexpression of CHOP in Myelinating Cells Does Not Confer a Significant Phenotype under Normal or Metabolic Stress Conditions. J. Neurosci. 36, 6803-6819.

Swanton, E., High, S., Woodman, P., 2003. Role of calnexin in the glycan-independent quality control of proteolipid protein. EMBO J. 22, 2948-2958.

Szegezdi, E., Fitzgerald, U., Samali, A., 2003. Caspase-12 and ER-stress-mediated apoptosis: the story so far. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1010, 186-194.

Vela, J.M., Dalmau, I., Gonzalez, B., Castellano, B., 1996. The microglial reaction in spinal cords of jimpy mice is related to apoptotic oligodendrocytes. Brain Res. 712, 134-142.

Vela, J.M., Gonzalez, B., Castellano, B., 1998. Understanding glial abnormalities associated with myelin deficiency in the jimpy mutant mouse. Brain Res. Rev. 26, 29-42.

Wang, F.M., Chen, Y.J., Ouyang, H.J., 2011. Regulation of unfolded protein response modulator XBP1s by acetylation and deacetylation. Biochem. J. 433, 245-252.

Wang, H.P., Wang, X., Ke, Z.J., Comer, A.L., Xu, M., Frank, J.A., Zhang, Z., Shi, X.L., Luo, J., 2015. Tunicamycin-induced unfolded protein response in the developing mouse brain. Toxicol. Appl. Pharm. 283, 157-167.

Westphal, D., Dewson, G., Czabotar, P.E., Kluck, R.M., 2011. Molecular biology of Bax and Bak activation and action. Biochim. Biophys. Acta 1813, 521-531.

Wiley, J.C., Pettan-Brewer, C., Ladiges, W.C., 2011. Phenylbutyric acid reduces amyloid plaques and rescues cognitive behavior in AD transgenic mice. Aging Cell 10, 418-428.

Wood, P.L., Smith, T., Pelzer, L., Goodenowe, D.B., 2011. Targeted metabolomic analyses of cellular models of pelizaeus-merzbacher disease reveal plasmalogen and myo-inositol solute carrier dysfunction. Lipids Health Dis. 10, 102.

Yam, G.H., Gaplovska-Kysela, K., Zuber, C., Roth, J., 2007. Sodium 4-phenylbutyrate acts as a chemical chaperone on misfolded myocilin to rescue cells from endoplasmic reticulum stress and apoptosis. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 48, 1683-1690.

Yamada, M., Jung, M., Tetsushi, K., Ivanova, A., Nave, K.A., Ikenaka, K., 2001. Mutant PLP/DM20 cannot be processed to secrete PLP-related oligodendrocyte differentiation/survival factor. Neurochem. Res. 26, 639-645.

Yang, E., Jockel, J., Zha, J., Korsmeyer, S.J., 1994. Bad, a New Bcl-2 Family Member, Heterodimerizes with Bcl-2 and Bcl-X in-Vivo, and Promotes Cell-Death. Blood 84, A373-A373.

Youle, R.J., Strasser, A., 2008. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. Nat. Rev. Mol. Cell Bio. 9, 47-59.

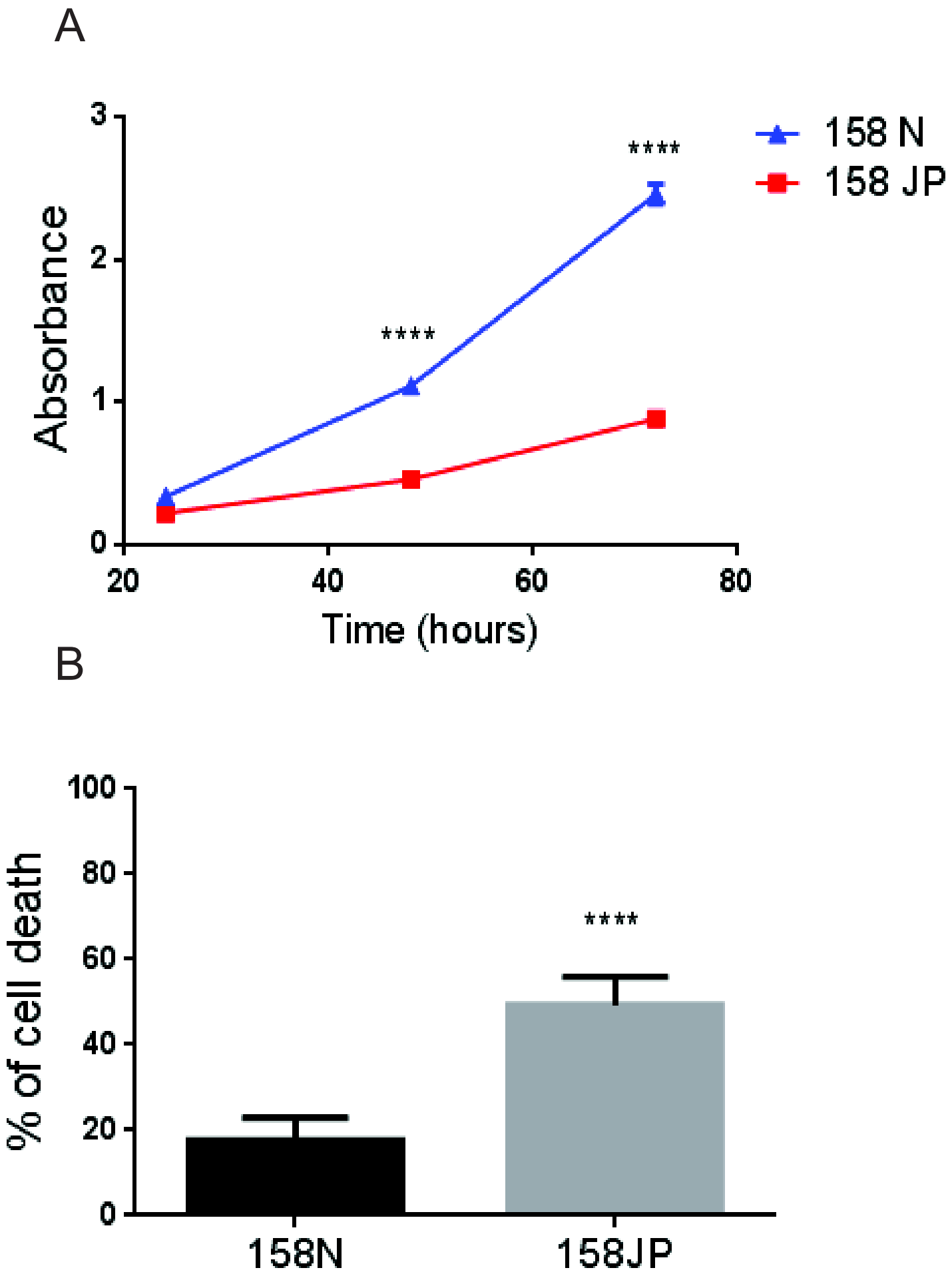

Figure 1 Wilding-Mensah
(color on the web only)

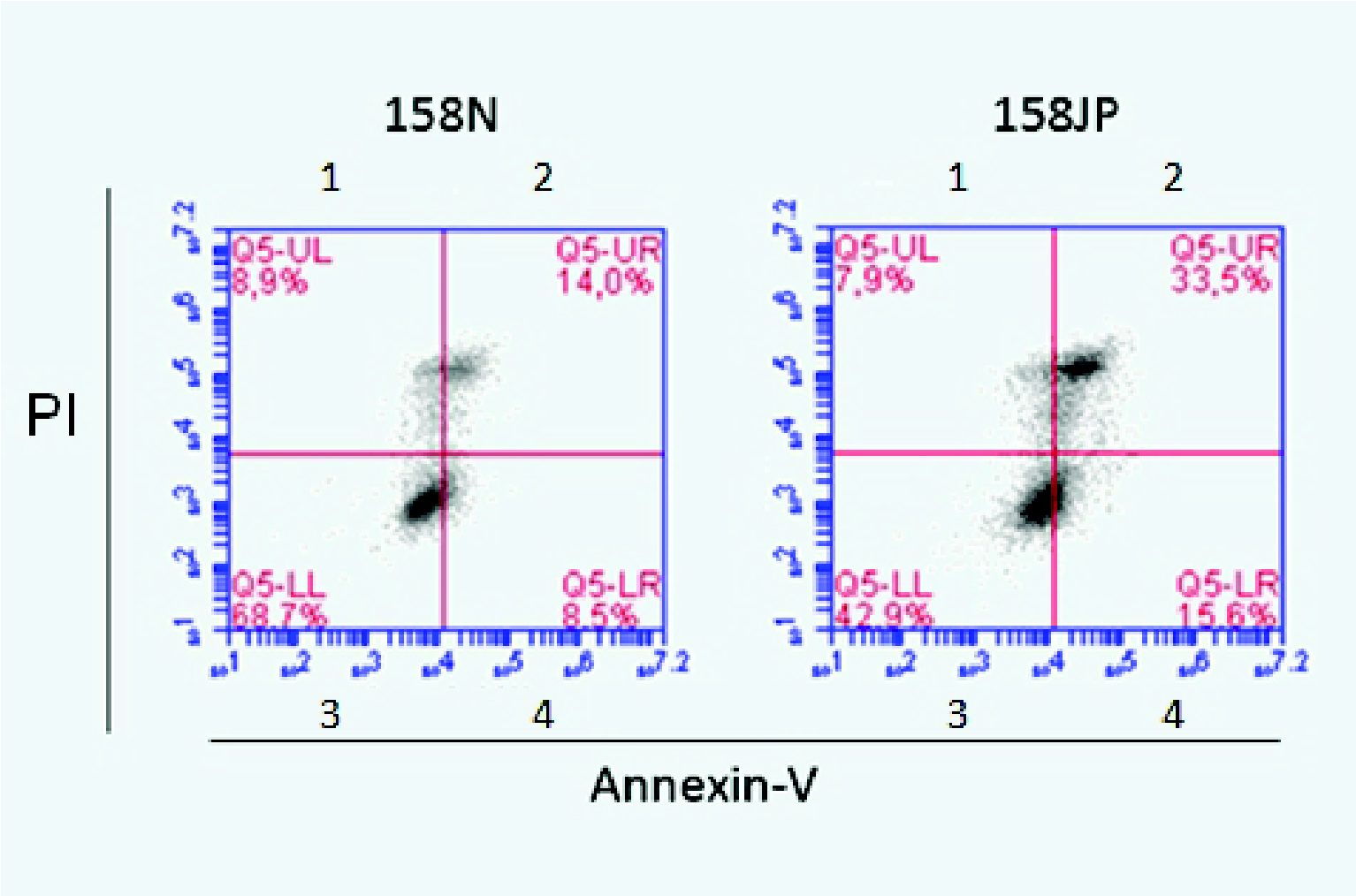

Figure 2 Wilding-Mensah
(color on the web only)

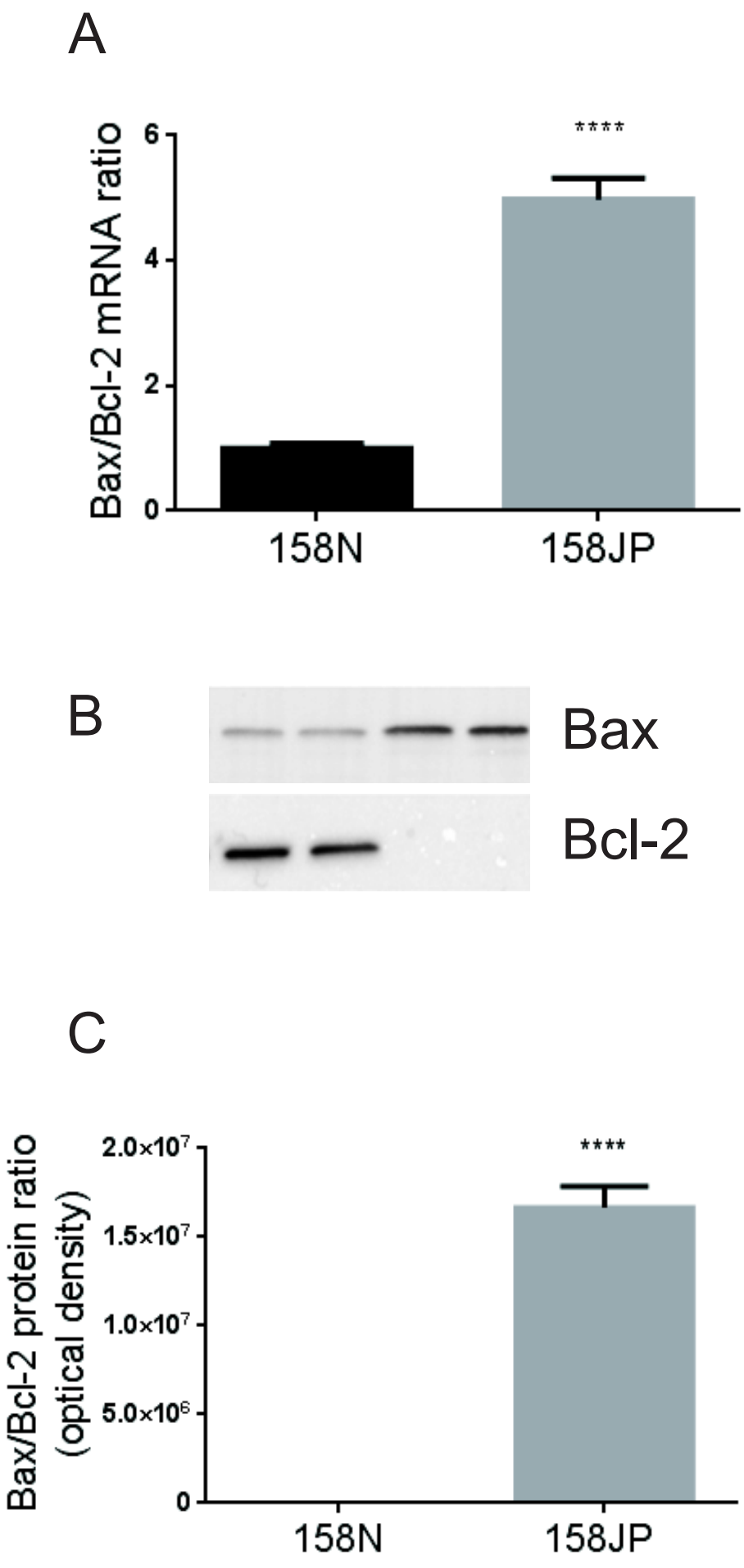

Figure 3 Wilding-Mensah

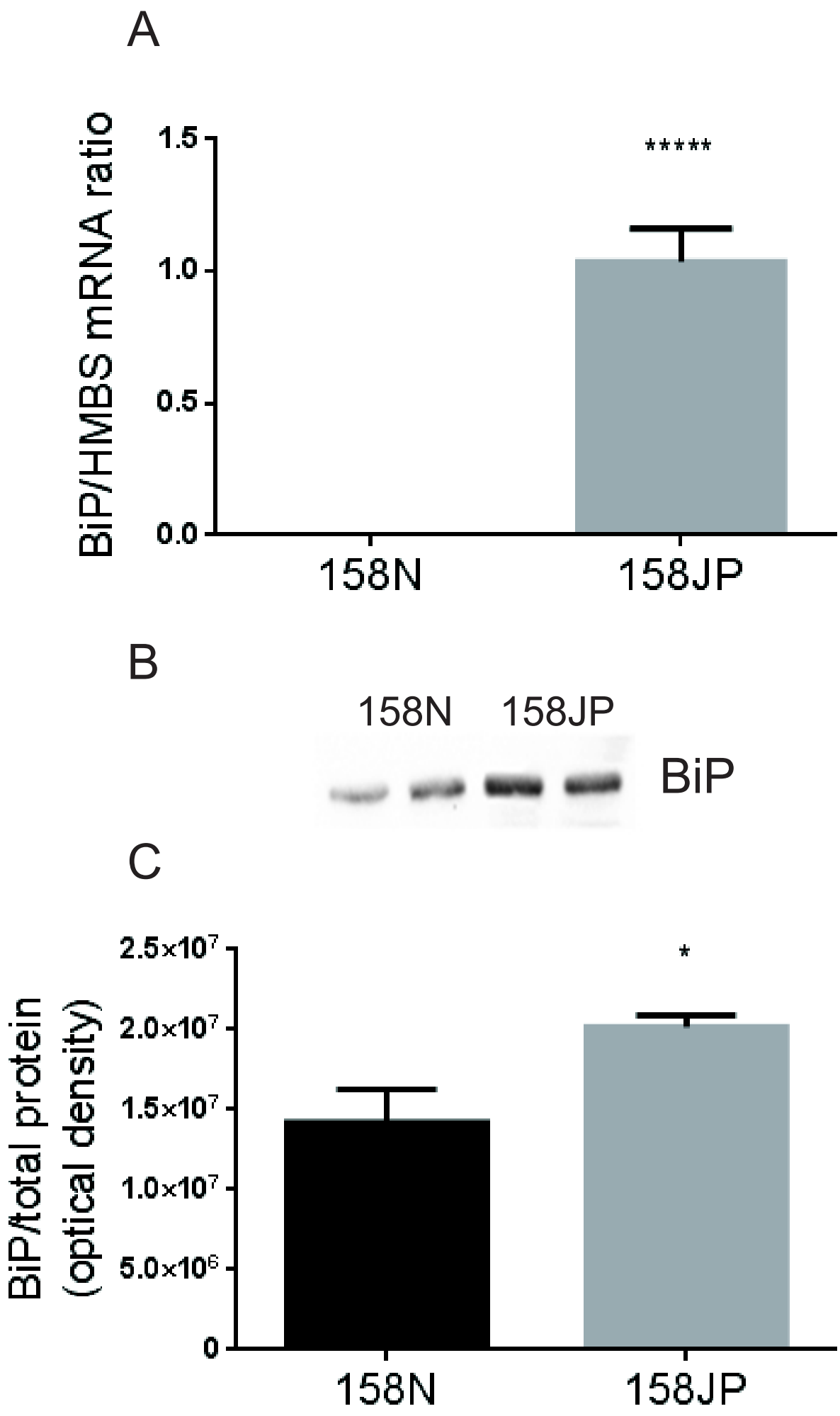

Figure 4 Wilding-Mensah

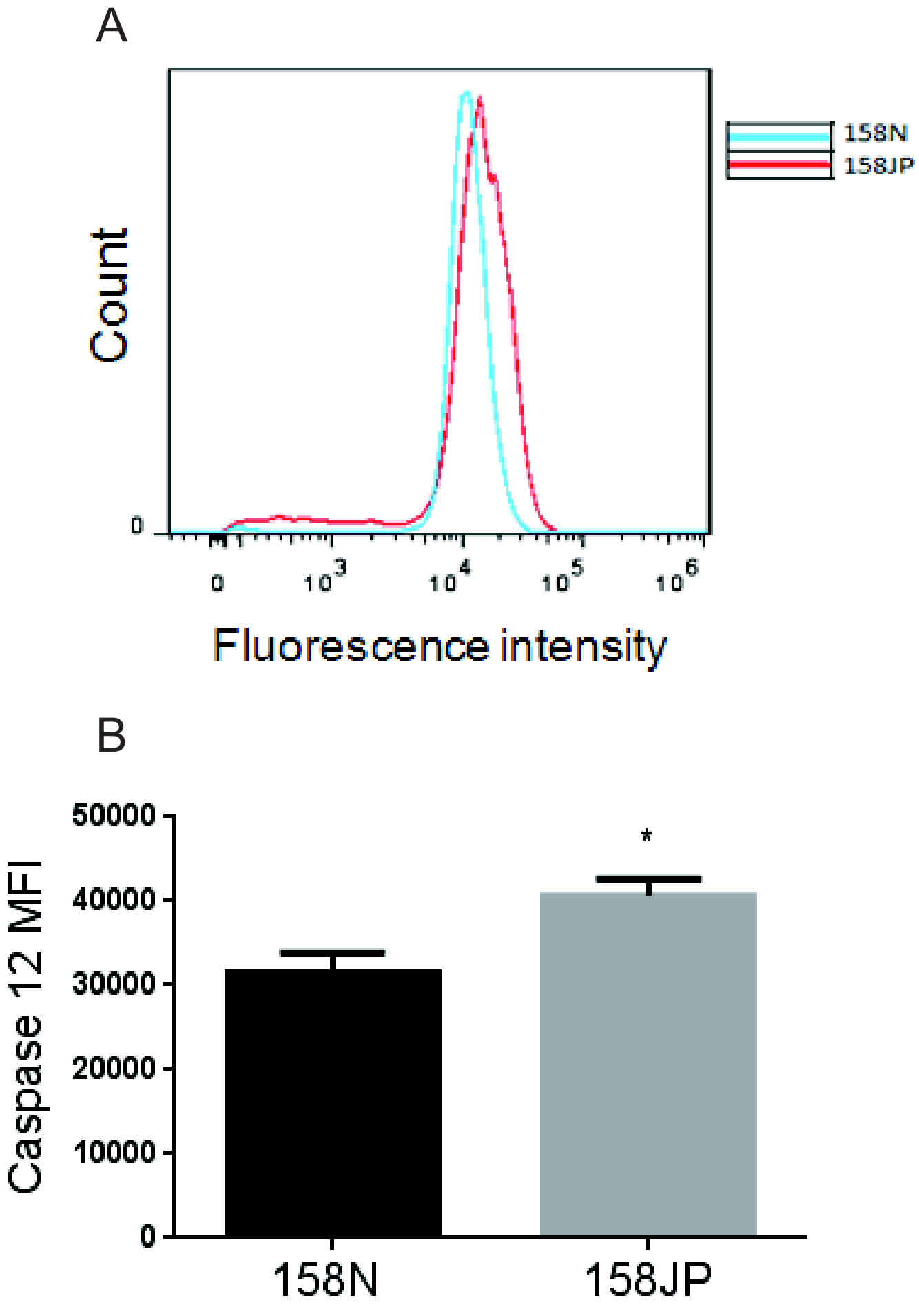

Figure 5 Wilding-Mensah
(color on the web only)

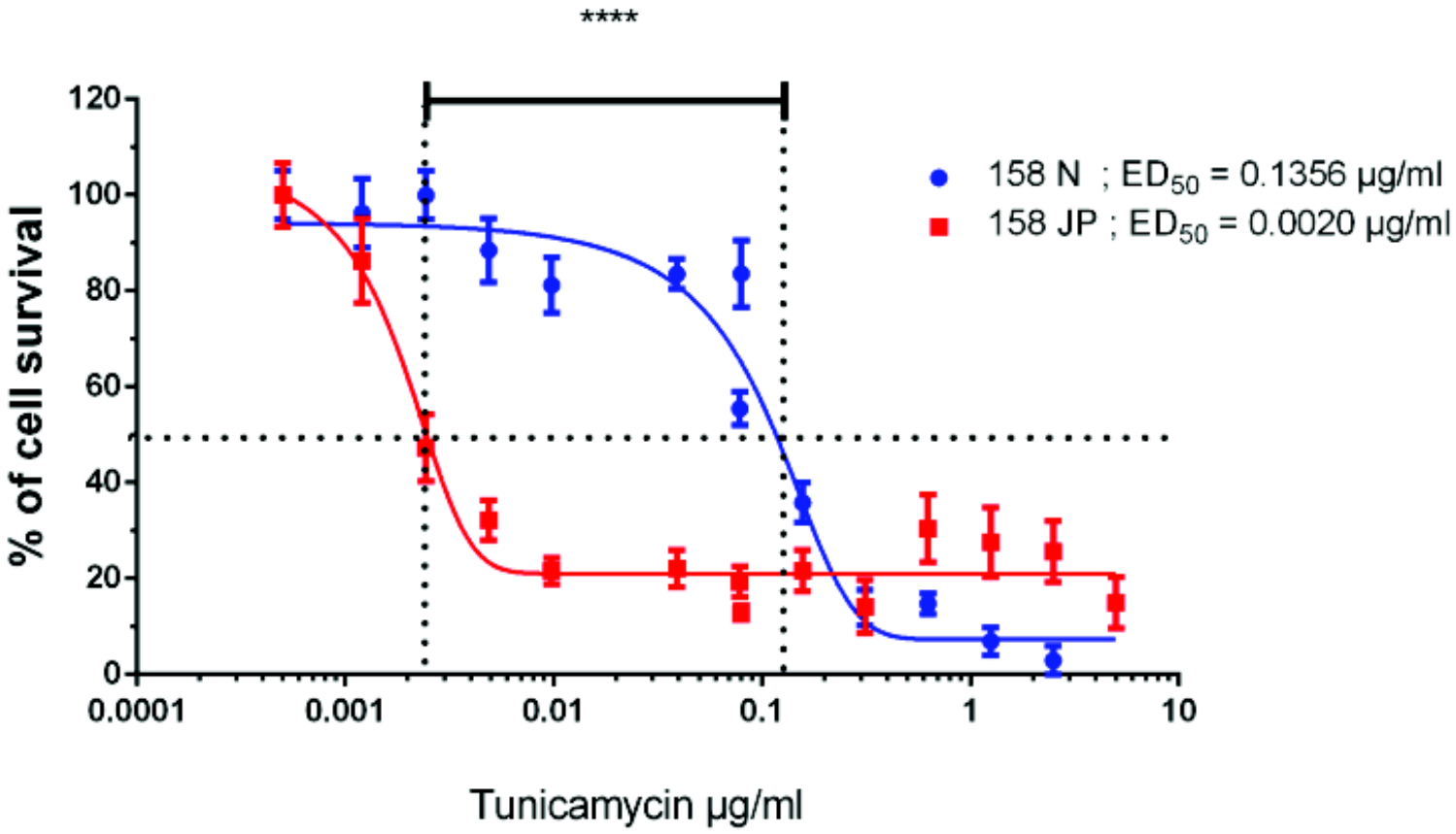

Figure 6 Wilding-Mensah
(color on the web only)

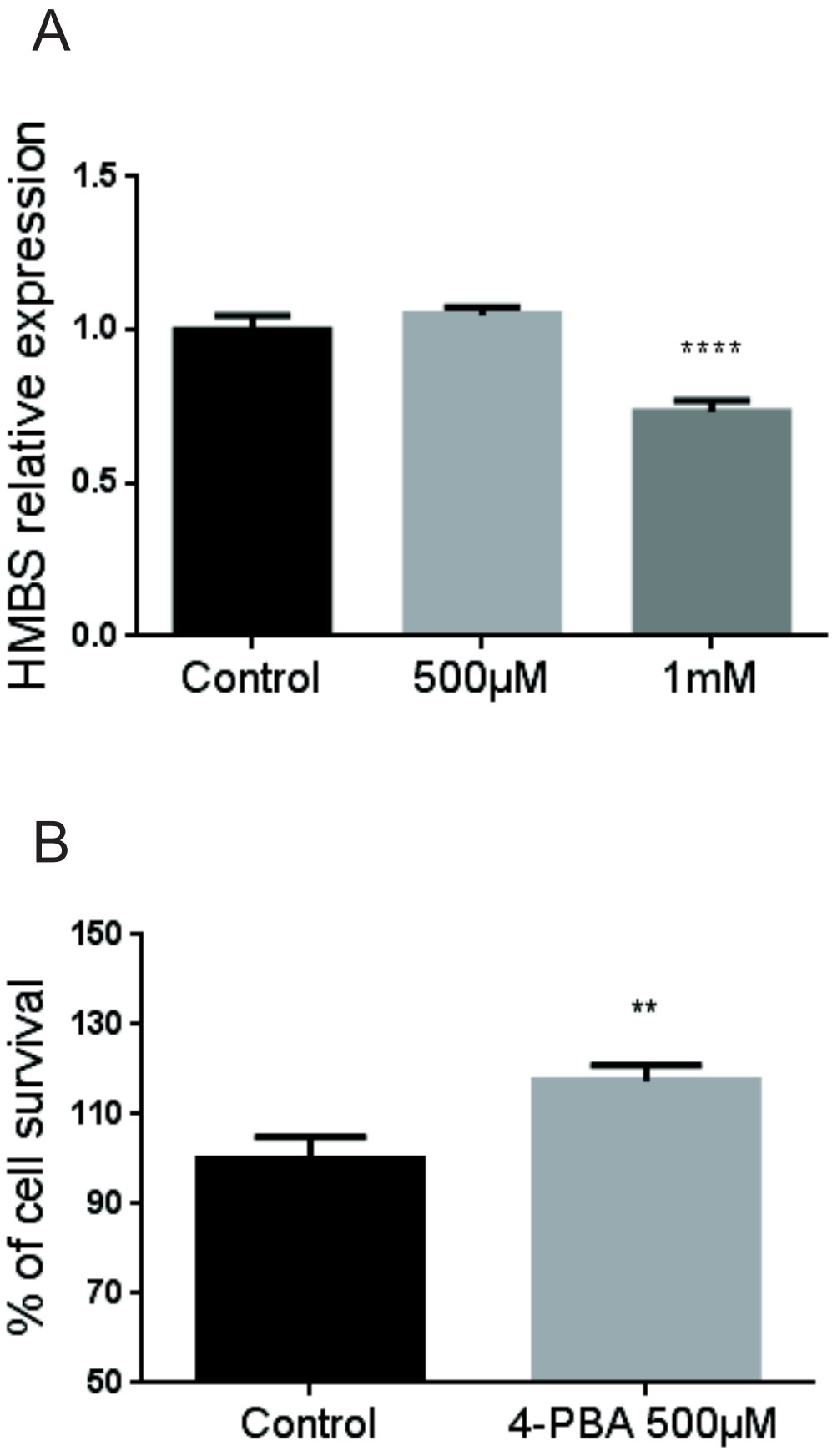

Figure 7 Wilding-Mensah

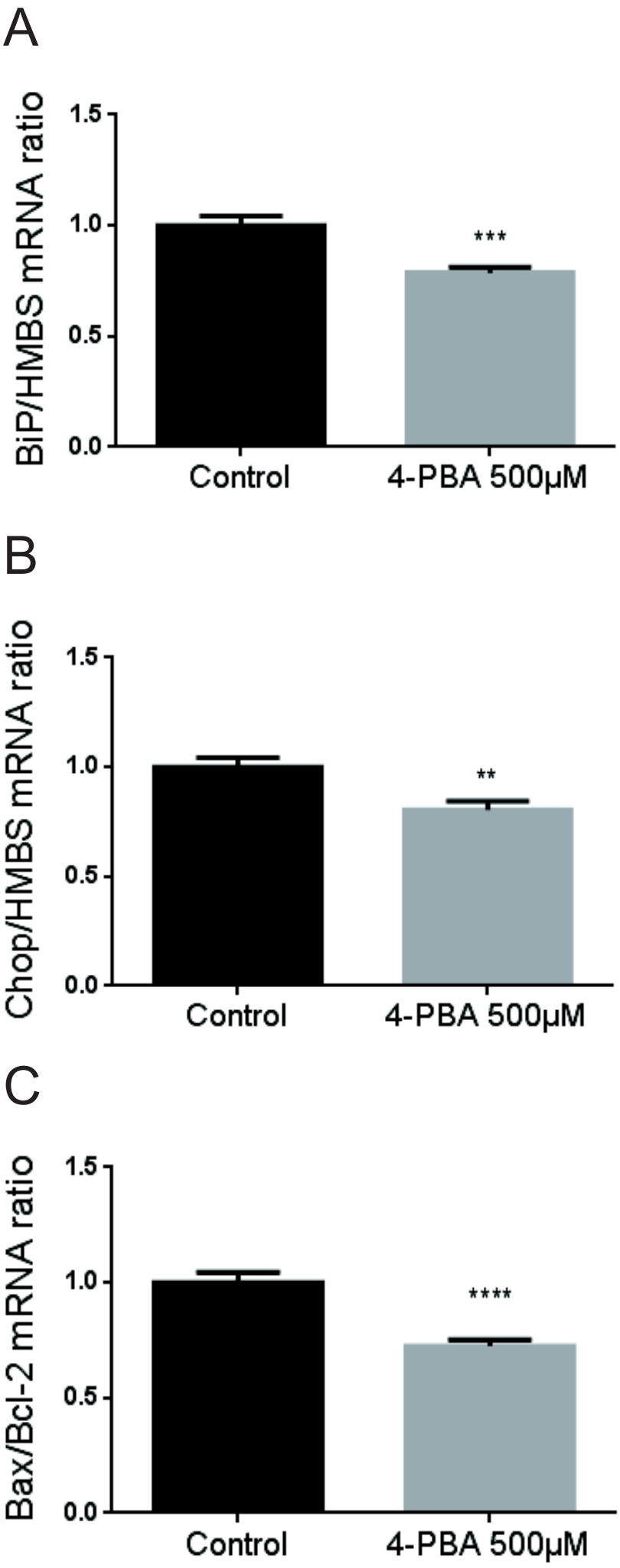

Figure 8 Wilding-Mensah

Anne-Sophie WILDING

Etude des mécanismes impliqués dans la mort oligodendrocytaire induite par la protéolipide-protéine mutée: rôle du stress du réticulum endoplasmique et identification des modulateurs à fort potentiel pour le traitement des pathologies dysmyélinisantes

Résumé

Les mutations de la protéolipide-protéine (PLP) entraînent la mort des oligodendrocytes (OL) et les pathologies de la myéline. Pour contribuer à l'élucidation des mécanismes impliqués, ce travail de thèse, qui a utilisé des lignées d'OL 158N (normale) et 158JP (porteuse de PLP mutée), démontre une mortalité élevée des cultures 158JP comparées aux témoins. Une hausse du ratio Bax (pro-) /Bcl2 (anti-apoptose) est observée chez les 158JP. La protéine BiP, marqueur de stress du réticulum endoplasmique (SRE), est surexprimée chez les 158JP. L'exposition au SRE induit par la tunicamycine a révélé que la DE_{50} pour les 158JP est 67 fois plus faible que la DE_{50} pour les 158N. Les 158JP surexpriment aussi les protéines CHOP et caspase-12 qui déterminent le basculement des processus intracellulaires vers l'apoptose. Le 4-Phénylbutyrate, inhibiteur du SRE, améliore la survie des 158JP et diminue les marqueurs du SRE et de l'apoptose. Des perspectives intéressantes sont ouvertes pour l'exploration de stratégies efficaces contre les pathologies dysmyélinisantes.

Mots clés: Apoptose; Maladies de la myéline; Neuroprotection; Oligodendrocytes; Pelizaeus-Merzbacher, 4-Phénylbutyrate; Stress du réticulum endoplasmique.

Abstract

Mutations of proteolipid-protein (PLP) cause oligodendrocyte (OL) death and myelin disorders. To contribute to the elucidation of the mechanisms involved, the present PhD work has used 158N (normal) and 158JP (mutated PLP) OL lines, to show the occurrence of a high cell death percentage in 158JP OL cultures compared to the controls. An increased Bax (pro-)/Bcl2 (anti-apoptosis) ratio is evidenced in 158JP cells. Also, the endoplasmic reticulum stress marker (SRE) BiP is overexpressed in 158JP OL. Exposure of 158N and 158JP cells to tunicamycin-induced SRE revealed that the ED_{50} for 158JP OL is 67 times lower than the ED_{50} for 158N OL. Proteins CHOP and caspase-12, that pivotally determine the switching from survival to apoptotic pathways, are upregulated in 158JP cells. 4-Phenylbutyrate, a SRE inhibitor, which improves 158JP cell survival, also decreases the levels of SRE and apoptosis markers in 158JP OL. The thesis opens promising perspectives for the development of effective strategies against myelin disorders.

Keywords: Apoptosis; Endoplasmic reticulum stress; Myelin diseases; Neuroprotection; Oligodendrocytes; Pelizaeus-Merzbacher; 4-Phenylbutyrate.