



<http://portaildoc.univ-lyon1.fr>

Creative commons : Paternité - Pas d'Utilisation Commerciale -
Pas de Modification 2.0 France (CC BY-NC-ND 2.0)



<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.0/fr>



Université Claude Bernard



Lyon 1

FACULTE DE MEDECINE ET DE MAIEUTIQUE LYON SUD CHARLES MERIEUX

ANNÉE 2019

N° 83

Neuropathies périphériques dues au dosage génique de *PMP22* : étude fonctionnelle des Enhancers et application en pratique diagnostique

THÈSE D'EXERCICE EN MÉDECINE

Présentée à l'Université Claude Bernard Lyon 1

et soutenue publiquement le 26 Avril 2019

pour l'obtention du grade de Docteur en Médecine

Par

M. Thibaut BENQUEY

Né le 01 Octobre 1990 (13)

Sous la direction du Docteur Philippe LATOUR

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS (Classe exceptionnelle)

ADHAM Mustapha	Chirurgie Digestive
BONNEFOY Marc	Médecine Interne, option Gériatrie
BERGERET Alain	Médecine et Santé du Travail
BROUSSOLLE Emmanuel	Neurologie
BURILLON-LEYNAUD Carole	Ophthalmologie
CHIDIAC Christian	Maladies infectieuses ; Tropicales
FLOURIE Bernard	Gastroentérologie ; Hépatologie
FOUQUE Denis	Néphrologie
GEORGIEFF Nicolas	Pédopsychiatrie
GILLY François-Noël	Chirurgie générale
GLEHEN Olivier	Chirurgie Générale
GOLFIER François	Gynécologie Obstétrique ; gynécologie médicale
GUEUGNIAUD Pierre-Yves	Anesthésiologie et Réanimation urgence
LAVILLE Martine	Nutrition - Endocrinologie
LAVILLE Maurice	Thérapeutique - Néphrologie
LINA Gérard	Bactériologie
MALICIER Daniel	Médecine Légale et Droit de la santé
MION François	Physiologie
MORNEX Françoise	Cancérologie ; Radiothérapie
MOURIQUAND Pierre	Chirurgie infantile
NICOLAS Jean-François	Immunologie
PIRIOU Vincent	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
RODRIGUEZ-LAFRASSE Claire	Biochimie et Biologie moléculaire
SALLES Gilles	Hématologie ; Transfusion
SIMON Chantal	Nutrition
THIVOLET Charles	Endocrinologie et Maladies métaboliques

THOMAS Luc	Dermato –Vénérologie
TRILLET-LENOIR Véronique	Cancérologie ; Radiothérapie
VALETTE Pierre Jean	Radiologie et imagerie médicale
VIGHETTO Alain	Neurologie

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS (1ère Classe)

ALLAOUCHICHE Bernard	Anesthésie-Réanimation Urgence
ANDRE Patrice	Bactériologie – Virologie
BERARD Frédéric	Immunologie
BONNEFOY- CUDRAZ Eric	Cardiologie
BOULETREAU Pierre	Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie
CERUSE Philippe	O.R.L
CHAPET Olivier	Cancérologie, radiothérapie
DES PORTES DE LA FOSSE Vincent	Pédiatrie
DORET Muriel	Gynécologie-Obstétrique ; gynécologie médicale
FARHAT Fadi	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
FESSY Michel-Henri	Anatomie – Chirurgie Ortho
FEUGIER Patrick	Chirurgie Vasculaire
FRANCK Nicolas	Psychiatrie Adultes
FREYER Gilles	Cancérologie ; Radiothérapie
GIAMMARILE Francesco	Biophysique et Médecine nucléaire
JOUANNEAU Emmanuel	Neurochirurgie
KASSAI KOUPAI Behrouz	Pharmacologie Fondamentale, Clinique
LANTELME Pierre	Cardiologie
LEBECQUE Serge	Biologie Cellulaire
LIFANTE Jean-Christophe	Chirurgie Générale
LONG Anne	Médecine vasculaire
LUAUTE Jacques	Médecine physique et Réadaptation
PAPAREL Philippe	Urologie
PEYRON François	Parasitologie et Mycologie

PICAUD Jean-Charles	Pédiatrie
POUTEIL-NOBLE Claire	Néphrologie
PRACROS J. Pierre	Radiologie et Imagerie médicale
RIOUFFOL Gilles	Cardiologie
RUFFION Alain	Urologie
SALLE Bruno	Biologie et Médecine du développement et de la reproduction
SANLAVILLE Damien	Génétique
SAURIN Jean-Christophe	Hépatogastroentérologie
SERVIEN Elvire	Chirurgie Orthopédique
SEVE Pascal	Médecine Interne, Gériatrique
THOBOIS Stéphane	Neurologie
TRONC François	Chirurgie thoracique et cardio

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS (2ème Classe)

BARREY Cédric	Neurochirurgie
BELOT Alexandre	Pédiatrie
BOHE Julien	Réanimation urgence
BREVET-QUINZIN Marie	Anatomie et cytologie pathologiques
CHO Tae-hee	Neurologie
CHOTEL Franck	Chirurgie Infantile
COTTE Eddy	Chirurgie générale
COURAND Pierre-Yves	Cardiologie
COURAUD Sébastien	Pneumologie
DALLE Stéphane	Dermatologie
DEVOUASSOUX Gilles	Pneumologie
DISSE Emmanuel	Endocrinologie diabète et maladies métaboliques
DUPUIS Olivier	Gynécologie-Obstétrique ; gynécologie médicale
FRANCO Patricia	Physiologie - Pédiatrie

GHESQUIERES Hervé	Hématologie
GILLET Pierre-Germain	Biologie Cell.
HAUMONT Thierry	Chirurgie Infantile
LASSET Christine	Epidémiologie., éco. Santé
LEGA Jean-Christophe	Thérapeutique – Médecine Interne
LEGER FALANDRY Claire	Médecine interne, gériatrie
LUSTIG Sébastien	Chirurgie. Orthopédique,
MOJALLAL Alain-Ali	Chirurgie. Plastique.,
NANCEY Stéphane	Gastro Entérologie
PASSOT Guillaume	Chirurgie Générale
PIALAT Jean-Baptiste	Radiologie et Imagerie médicale
REIX Philippe	Pédiatrie -
ROUSSET Pascal	Radiologie imagerie médicale
TAZAROURTE Karim	Médecine Urgence
THAI-VAN Hung	Physiologies - ORL
TRAVERSE-GLEHEN Alexandra	Anatomie et cytologie pathologiques
TRINGALI Stéphane	O.R.L.
VOLA Marco	Chirurgie thoracique cardiologie vasculaire
WALLON Martine	Parasitologie mycologie
WALTER Thomas	Gastroentérologie – Hépatologie
YOU Benoît	Cancérologie

PROFESSEUR ASSOCIE sur Contingent National

PIERRE Bernard	Cardiologie
----------------	-------------

PROFESSEURS - MEDECINE GENERALE (2^{ème} Classe)

BOUSSAGEON Rémy
ERPELDINGER Sylvie

PROFESSEUR ASSOCIE - MEDECINE GENERALE

DUPRAZ Christian

PERDRIX Corinne

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS (Hors Classe)

ARDAIL Dominique

Biochimie et Biologie moléculaire

CALLET-BAUCHU Evelyne

Hématologie ; Transfusion

DIJOURD Frédérique

Anatomie et Cytologie pathologiques

LORNAGE-SANTAMARIA Jacqueline

Biologie et Médecine du développement et de la reproduction

MASSIGNON Denis

Hématologie – Transfusion

RABODONIRINA Meja

Parasitologie et Mycologie

VAN GANSE Eric

Pharmacologie Fondamentale, Clinique

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS (1ère Classe)

BRUNEL SCHOLTES Caroline

Bactériologie virologie ; Hygiène .hospitalière.

COURY LUCAS Fabienne

Rhumatologie

DECAUSSIN-PETRUCCI Myriam

Anatomie et cytologie pathologiques

DESESTRET Virginie

Cytologie – Histologie

FRIGGERI Arnaud

Anesthésiologie

DUMITRESCU BORNE Oana

Bactériologie Virologie

GISCARD D'ESTAING Sandrine

Biologie et Médecine du développement et de la reproduction

LOPEZ Jonathan

Biochimie Biologie Moléculaire

MAUDUIT Claire	Cytologie – Histologie
MILLAT Gilles	Biochimie et Biologie moléculaire
PERROT Xavier	Physiologie - Neurologie
PONCET Delphine	Biochimie, Biologie cellulaire
RASIGADE Jean-Philippe	Bactériologie – Virologie ; Hygiène hospitalière
NOSBAUM ép ROSSIGNOL Audrey	Immunologie
SUJOBERT Pierre	Hématologie - Transfusion
VALOUR Florent	Mal infect.
VUILLEROT Carole	Médecine Physique Réadaptation

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS (2ème Classe)

BOLZE Pierre-Adrien	Gynécologie Obstétrique
DEMILY Caroline	Psy-Adultes
HALFON DOMENECH Carine	Pédiatrie
JAMILLOUX Yvan	Médecine Interne - Gériatrie
KOPPE Laetitia	Néphrologie
PETER DEREK	Physiologie - Neurologie
PUTOUX DETRE Audrey	Génétique
RAMIERE Christophe	Bactériologie-virologie
SKANJETI Andréa	Biophysique. Médecine nucléaire.
SUBTIL Fabien	Bio statistiques
VISTE Anthony	Anatomie

MAITRES DE CONFERENCES ASSOCIES – MEDECINE GENERALE

SUPPER Irène

PROFESSEURS EMERITES

Les Professeurs émérites peuvent participer à des jurys de thèse ou d'habilitation. Ils ne peuvent pas être président du jury.

ANNAT Guy	Physiologie
BERLAND Michel	Gynécologie-Obstétrique ; gynécologie médicale
CAILLOT Jean Louis	Chirurgie générale
CARRET Jean-Paul	Chirurgie Orthopédique
ECOCHARD René	Bio-statistiques
FLANDROIS Jean-Pierre	Bactériologie – Virologie; Hygiène hospitalière
DUBOIS Jean-Pierre	Médecine générale
LLORCA Guy	Thérapeutique
MATILLON Yves	Epidémiologie, Economie Santé et Prévention
PACHECO Yves	Pneumologie
PEIX Jean-Louis	Chirurgie Générale
SAMARUT Jacques	Biochimie et Biologie moléculaire
TEBIB Jacques	Rhumatologie

LE SERMENT D'HIPPOCRATE

Je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la Médecine.

Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans discrimination.

J'interviendrai pour les protéger si elles sont vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité. Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité.

J'informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences. Je ne tromperai jamais leur confiance.

Je donnerai mes soins à l'indigent et je n'exigerai pas un salaire au-dessus de mon travail.

Admis dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me seront confiés et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs.

Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement la vie ni ne provoquerai délibérément la mort.

Je préserverai l'indépendance nécessaire et je n'entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je perfectionnerai mes connaissances pour assurer au mieux ma mission.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert d'opprobre et méprisé si j'y manque.

COMPOSITION DU JURY

PRÉSIDENT DU JURY

Monsieur le Professeur Damien SANLAVILLE

Professeur des Universités - Praticien Hospitalier – Génétique

UFR Lyon Sud

MEMBRES ASSESSEURS

Madame le Professeur Christine VINCIGUERRA

Professeur des Universités - Praticien Hospitalier - Hémostase biologique

ISPB

Monsieur le Docteur Gaetan LESCA

Maitre de conférences des Universités - Praticien Hospitalier - Génétique

UFR Lyon Est

Monsieur le Docteur Philippe LATOUR

Praticien Hospitalier – Service de Neurobiologie

Centre de Biologie et Pathologie Est

REMERCIEMENTS

Aux membres de mon Jury,

Monsieur le Professeur Damien SANLAVILLE,

Je tiens à vous remercier de m'avoir fait l'honneur de présider mon jury et d'évaluer ce travail. Les 6 mois passés resteront un souvenir marquant de mon internat grâce à vous, vos connaissances, votre pédagogie hors du commun et surtout votre patience lors des staffs quand je répondais à côté de la plaque.

Madame le Professeur Christine VINCIGUERRA,

Ce n'est pas toujours facile d'être sollicitée par tous ces médecins biologistes qui vous embêtent pour juger leur travail de thèse. Aussi, je vous remercie chaleureusement de votre présence au sein de ce jury et du temps que vous avez accepté de m'accorder. Votre disponibilité pour les internes et votre bonne humeur sont un exemple à suivre.

Monsieur le Docteur Gaëtan LESCA,

Un grand merci pour avoir accepté de juger, de manière totalement objective bien sûr, ce travail. J'ai beaucoup appris ces dernières années à tes côtés et ce n'est que le début j'en suis certain. C'est toujours un plaisir de travailler et d'échanger avec toi, autant sur des sujets professionnels que sur les derniers sons de BigFlo & Oli.

Monsieur le Docteur Philippe LATOUR,

Merci. Merci de tout le temps que vous m'avez consacré pour partager vos connaissances et votre passion des neuropathies et du CMT. Merci également de votre patience et de votre confiance, vous êtes un mentor de grande qualité et je mesure la chance que j'ai d'avoir travaillé à vos côtés.

A Jimmy,

Eh oui bro évidemment que tu as une place de choix ici. Je ne pourrai jamais assez te remercier de tout ce que tu as fait pour moi, si j'en suis la aujourd'hui c'est grâce à toi. J'ai été formé sur toutes mes manip par le maître et je ne désespère pas de te dépasser, il ne va pas falloir te

reposer sur tes lauriers je suis pas loin ! T'es un gars en or et j'espère avoir la chance de pouvoir continuer à travailler à côté de toi, on va soulever des montagnes mon bro.

A mes co-internes,

Alexia, tu ne pouvais pas avoir une autre place que la première dans ces remerciements (no offense pour les autres je vous adore aussi), notre amitié est à l'image de ce voyage à Casto pour ton salon de jardin, c'est désordonné mais qu'est-ce qu'on se marre, surtout ne change jamais. **Anatole**, t'es peut-être le diable en personne mais quand tu veux t'es quand même le meilleur des bros ! **Camsou**, comme on l'a toujours dit, on n'est peut-être pas les meilleurs mais au moins on est les plus drôles, allez, bisous et surtout ... **Cynthia**, merci pour ces 6 mois que je n'ai pas vu passer entre les petites pauses, les petits chocolats, les petits canons mais surtout tes grands conseils, sans toi ce stage n'aurait pas été le même. **Maud**, je ne me lasse pas de bitcher il faut absolument qu'on continue sinon les journées seront bien tristes, mais il y a de la matière alors je ne me fais pas de soucis. **Sara**, tu as quitté ton monde obscur pour venir observer celui des biologistes le temps d'un semestre, c'était un plaisir de t'avoir parmi nous. **Coco**, je serai toujours disponible pour des grandes soirées coinches et pour t'écouter me raconter l'histoire du rock progressif à travers les âges. **Flora**, on arrive toujours à trouver un sujet sur lequel on peut râler un bon moment. **Dorian**, pour ta classe à l'anglaise et ta découverte de la dorianite. **Florian**, à qui le tour ? **Claire**, tu es passée de l'autre côté de la barrière mais merci pour les grandes discussions et tous tes conseils. **Xavier**, tu es à l'image de ton week-end au carnaval de Dunkerque, sympa et coloré. **Louis**, on n'a pas fait de stages ensemble mais c'est toujours un plaisir de te voir. **Stéphanie**, grâce à toi j'ai pu me consacrer à la rédaction et à la finition de ce manuscrit pendant les gardes, je t'en remercie. **Léa**, ton départ à Grenoble a créé un vide.

Un grand merci également à **Julie, Camille P, Emma, Audrey, Jean-Louis, Pauline, Damien, Emeline, Thomas, Aurélien, Mathilde, Sarah, Laura, Hortense, Clémentine, Thibault, Léa, Laurent, Gaëlle, Estelle**. Vous avez tous et toutes participé de près ou de loin à ce grand voyage qu'est l'internat, et si parmi vous j'en ai oublié j'en suis désolé.

Aux amis de longue date,

Sophie, je n'oublierai jamais ces années d'externat à tes côtés, ces nombreuses soirées et moments de rire. **Magou**, je ne t'en veux pas d'avoir modifié ton choix de ville au dernier moment pour rester dans à Toulouse mais c'est dur de ne plus se voir autant, on va corriger ça ! **Cécile**, la D4 à tes côtés et la sous-colle avec Soso c'était probablement la meilleure période de l'externat. **Florian**, tu as le cœur sur la main et une bouteille de Ricard dans l'autre, c'est à ça qu'on sait que tu vas bien. **Francois** et **Pauline**, vous représentez tout ce qui me manque de Toulouse, la gentillesse, la candeur, le fun. J'espère vous convaincre de venir vous installer à Lyon. **Paul** et **Océane**, vous avoir ici me fait chaud au cœur et vous avez amené un petit bout du Sud-Ouest. **Julia**, on est arrivés à Lyon il y a 4 ans bientôt et il faut absolument qu'on aille le boire ce verre ! **Jeanne**, ton départ de la coloc a été dur mais j'aurai gagné une grande amie de ces quelques années. **Chang** et **Amélie**, cela fait quelques temps qu'on carve ensemble et c'est un moment que j'attends avec impatience tous les ans, en attendant on aura autre chose à fêter ! Merci à vous tous d'avoir fait le déplacement.

Aux amis d'un peu moins longue date mais de date quand même,

Jiji et **Mimi**, vous êtes un vrai rayon de soleil. **Laetitia**, tu rends chaque jour un peu plus honneur à Maïté et ça n'a pas de prix. **Ludo**, le jour où j'aurai besoin de me faire carry je ferai appel à toi sans aucun doute ! **Alexis**, ne t'en fais pas, je vais profiter de cet été pour me perfectionner aux fléchettes, il y a du boulot mais je vais me former avec les meilleurs. Merci à vous pour tous ces moments de pur bonheur.

A ma famille,

Vous ne savez pas ce que cela représente pour moi que nous soyons tous réunis, comme quoi cela n'arrive pas qu'aux enterrements ! A ma mère et à mon père, merci des valeurs que vous avez sues me transmettre, je n'ai pas toujours été un fils modèle mais j'essaie de me rattraper et j'espère pouvoir vous rendre fiers aujourd'hui ! A mes frères et sœurs, **Magalie**, **Romain**, **Mathis** et **Manon**, peut-être que ce jour sera l'occasion pour moi de vous faire un peu plus comprendre les expériences bizarres que l'on fait au labo. A **Manuella**, **Frédogero**, **Capucine**, **Tim** et **Daniel**, merci d'être présents, je suis très touché de partager cet instant avec vous.

A la famille de Neurogénétique,

Julie, Emilie, Nicolas, Guénaële, merci pour cette année passée en votre compagnie. Je ne saurai vous dire à quel point j'ai aimé travailler avec vous.

A la plateforme Biogenet,

Merci à Carole G, Diane, Murielle, Carine, Valérie, Sophie, Delphine, Audrey, Marie-Christine, Dorothee, Stéphanie D, Séverine, Stéphanie J, Carole D, Anne-Lise, Pascale, Hélène, Camel, Kévin, Rita, Véronique. Vous avez vu faire de ce laboratoire ma deuxième maison et c'est grâce à vous que je me levais avec plaisir pour venir bosser !

Au service de Cytogénétique,

Merci à Isabelle, Alexia, Christelle, Audrey, Cathy, Brigitte, Caroline, Chantal, Amélie, Sylvie, Hélène, Jessica, Amina, Laura, Marie, Flavie, Françoise, Laurence pour votre accueil pendant ces 6 mois et votre gentillesse. Je garderai toujours un excellent souvenir de ce semestre ici.

A Caroline, merci pour tes enseignements sur la FISH et les points de cassure.

A mon ARC préférée, Eudeline. Grâce à toi je sais préparer dignement un plan de plaque de DPN, à peu de choses près.

A ma cytogénéticienne préférée, Marianne, un très très grand merci pour votre disponibilité envers nous, votre envie de nous transmettre votre savoir et votre éternelle bonne humeur qui nous ont accompagné tout au long de ce semestre.

Table des matières

Liste des abréviations	17
Liste des figures	18
Liste des tableaux	20
Introduction	21
Partie I : Le système nerveux périphérique et la maladie de Charcot-Marie-Tooth : présentation générale et état de l'art bibliographique	23
1. Le nerf périphérique	23
2. Cellule de Schwann et gaine de myéline	30
3. La maladie de Charcot-Marie-Tooth	34
a. Historique (Sturtz et al., 1992)	35
b. Signes cliniques et examen physique	36
c. L'apport de l'électrophysiologie : formes myéliniques, axonales et intermédiaires	38
d. Acronymes et classification : bilan de la période nosologique (1956 – 1980)	40
4. PMP22 (forme CMT1A)	46
a. PMP22 : structure du gène	50
b. Régions régulatrices	52
c. Tests génétiques (Southern Blot, MLPA, microsatellites)	54
d. Modèles animaux et cellulaires	57
e. Essais thérapeutiques (vitamine C, PHARNEXT)	57
Partie II : Matériel et Méthodes	62
1. Sélection des régions d'intérêt	62
a. Enhancers	62
b. Promoteurs	63
2. Choix des plasmides	64
a. pGL3-Basic Vector	64
b. pRL-SV40	65
3. Protocole de construction de la banque de plasmides	66
a. Design des amorces	66
b. Linéarisation des plasmides	67
c. Ligation des produits de PCR dans les plasmides linéarisés	67
d. Transformation bactérienne	68
e. Screening des clones bactériens	68
f. Extraction et purification de l'ADN plasmidique	69

g.	Séquençage des plasmides purifiés	69
4.	Constructions plasmidiques	70
5.	Culture cellulaire	71
a.	Choix du type cellulaire	71
b.	Culture cellulaire et entretien	71
c.	Protocole de co-transfection pGL3 + pRL-SV40.....	72
6.	Méthode d'analyse par luminescence de l'activité luciférase : Dual-Glo® Luciferase Assay System (Promega™)	73
7.	Identification de variants	74
a.	Analyse des régions d'intérêt par séquençage haut débit (NGS)	74
b.	Cohorte de patients.....	74
8.	Analyses statistiques	75
Partie III : Résultats expérimentaux		76
1.	Séquences Enhancers isolées	76
2.	Etude des séquences promotrices	78
3.	Analyse de la cohorte de patient	80
4.	Etude <i>in vitro</i> des variants d'intérêt identifiés	83
Partie IV : Discussion		87
Partie V : Perspectives		95
Partie VI : Bibliographie		97

Liste des abréviations

A	Adénine
ACMG	American College of Medical Genetics
AD	Autosomique Dominant
AR	Autosomique Récessif
C	Cytosine
CMT	Charcot-Marie-Tooth
CMTI	CMT de forme intermédiaire
CMTNS	Charcot-Marie-Tooth Neuropathy Score
Da	Dalton
ENMG	Electroneuromyogramme
G	Guanine
HGM	Human Gene Mapping
NGS	Next Generation Sequencing
NIS	Neuropathy Impairment Scale
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
PCR	Polymerase Chain Reaction
REP	Repetitive Extragenic Palindromic sequence
SNC	Système nerveux central
SNP	Système nerveux périphérique
T	Thymine
UTR	Untranslated Region (Région non traduite)
VCN	Vitesses de conduction nerveuses
VCNM	Vitesses de conduction nerveuses motrices
VCNS	Vitesses de conduction nerveuses sensitives
WT	Wild-type
XL	Lié à l'X

Liste des figures

Figure 1 : Représentation schématique d'un nerf et d'un câble électrique

Figure 2 : Découpe anatomique transversale d'un nerf spinal

Figure 3 : Mécanismes du transport axonal

Figure 4 : Voies et molécules du transport axonal actualisées

Figure 5 : Formation d'une gaine de myéline

Figure 6 : Structure d'une gaine de myéline entourant un axone

Figure 7 : Docteurs Jean-Martin Charcot, Pierre Marie et Howard Henry Tooth

Figure 8 : Déformation squelettique réalisant un *pes cavus*

Figure 9 : Représentation de la région du Chr17p11.2 de 1,5Mb

Figure 10 : Mécanisme de *crossing-over* inégal entre les deux séquences REP

Figure 11 : Représentation du gène *PMP22* avec ses exons et introns et vue schématique de la protéine membranaire PMP22

Figure 12 : Image de FISH montrant la duplication en tandem identifiée par Rautenstrauss et al.

Figures 13 A,B,C : Exemples de résultats obtenus par analyse des microsatellites de la région 17p11.2 sur le logiciel GeneMapper™

Figure 14 : Résultats de ChIP-Seq de la région en amont de *PMP22*

Figure 15 : Squelette du plasmide pGL3-Basic Vector de Promega®

Figure 16 : Squelette du plasmide pRL-SV40 de Promega®

Figure 17 : Activités luciférase relatives concernant les séquences Enhancers isolées en position de promoteur

Figure 18 : Activités luciférase relatives concernant les séquences Enhancers isolées en position d'Enhancer

Figure 19 : Activités luciférase relatives concernant le promoteur 1A seul et en combinaison

Figure 20 : Activités luciférase relatives concernant le promoteur 1B seul et en combinaison

Figure 21 : Couverture moyenne du gène *PMP22* issue du panel NGS des neuropathies périphériques

Figure 22 : Activités luciférase relatives concernant le variant g.15309414C>T (Enhancer B)

Figure 23 : Activités luciférase relatives concernant les variants g.15281032T>A et g.15281336T>C (Enhancer C)

Figure 24 : Activités luciférase relatives concernant le variant g.15168522T>G (Promoteur 1A)

Figure 25 : Activités luciférase relatives concernant le variant g.15168577G>C (Promoteur 1A)

Figure 26 : Northern Blot réalisé à partir d'extraits de lignées cellulaires pour l'étude des transcrits de *PMP22*

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification de Dyck et Lambert des Neuropathies héréditaires sensitivo-motrices

Tableau 2 : Identification des premiers locus associés au CMT avec les acronymes et gènes correspondants

Tableau 3 : Série phénotypique du CMT issue de la base OMIM

Tableau 4 : Caractéristiques de cohortes de patients CMT1A

Tableau 5 : Microsatellites employés dans le diagnostic du CMT1A avec la séquence répétée correspondante

Tableau 6 : Séquences des amorces employées dans l'étude, taille des fragments de PCR et taille du plasmide après insertion de la séquence correspondante

Tableau 7 : Constructions plasmidiques

Tableau 8 : Couverture moyenne des régions d'intérêt issues des données du panel NGS des neuropathies périphériques

Tableau 9 : Variants identifiés par analyse NGS sur une cohorte de 168 patients

Introduction

La maladie de Charcot-Marie-Tooth est la neuropathie périphérique héréditaire la plus fréquente, avec une prévalence estimée classiquement à 1/2500 (Skre et al., 1974). Cette maladie présente une grande hétérogénéité clinique, parfois au sein d'une même famille, ainsi que génétique avec plus de 80 gènes responsables identifiés.

L'anomalie la plus courante est une microduplication interstielle de 1,5 Mb en 17p11.2 (Raeymaekers et al., 1991) contenant le gène codant pour la protéine de la myéline périphérique (*PMP22*) et responsable de la maladie de Charcot-Marie-Tooth de type 1A (CMT1A), représentant la grande majorité des formes démyélinisantes. De la même façon on identifie un controtypage de microdélétion qui est à l'origine d'une neuropathie périphérique héréditaire avec hypersensibilité à la pression (HNPP, également appelée neuropathie tomaculaire ; Chance et al., 1993).

Le diagnostic de cette affection est réalisé en routine, notamment grâce à l'étude de microsatellites polymorphes dans la population (Latour et al., 2001) qui permettent aisément la recherche et l'identification de ces variations du nombre de copies (CNV).

Cependant, si cette technique permet le diagnostic au sein de la plupart des familles atteintes, il persiste des patients présentant un diagnostic clinique en accord avec une forme de CMT1A ou d'HNPP mais qui ne présentent pas l'anomalie génétique classique. Par ailleurs, on retrouve dans ces deux entités l'existence de patients asymptomatiques malgré la présence de l'anomalie princeps, posant la question d'une pénétrance incomplète ou de mécanismes de régulations non identifiés.

Le développement et l'utilisation quotidienne du séquençage haut débit (NGS) participe grandement à l'amélioration des connaissances génétiques et à l'obtention de données de plus en plus complètes. Ces données ont ouvert la voie à de nouvelles possibilités diagnostiques, d'une part pour les familles dont la recherche des mutations les plus fréquentes n'a pas abouti à un diagnostic moléculaire, mais également pour celles qui cliniquement présentent une forme typique de CMT1A/HNPP sans l'anomalie récurrente de la région de *PMP22*.

Des travaux récents ont notamment permis l'identification de régions régulatrices, encore appelées Enhancers, situées bien en amont du gène, dont la seule variation du nombre de copies pourrait être responsable de la pathologie (Weterman et al., 2010).

Dans ce contexte nous avons développé et validé un modèle cellulaire *in vitro* permettant l'étude des régions régulatrices incluant les deux promoteurs alternatifs décrits de *PMP22* ainsi que 4 régions amplificatrices ci nommées Enhancer A, B, C et I3 (Jones et al., 2012). Nous présentons et discutons l'application potentielle de ce modèle au diagnostic de variants dans les régions non codantes.

Partie I : Le système nerveux périphérique et la maladie de Charcot-Marie-Tooth : présentation générale et état de l'art bibliographique

1. Le nerf périphérique

Le nerf périphérique peut s'apparenter à un « câble » par lequel s'effectue le passage des axones, prolongements cellulaires des neurones moteurs, sensitifs et végétatifs qui appartiennent au système nerveux périphérique (SNP). L'information est véhiculée dans les deux sens (ascendant et descendant) entre ces neurones et leurs effecteurs (muscles striés, récepteurs sensitifs et viscères, respectivement).

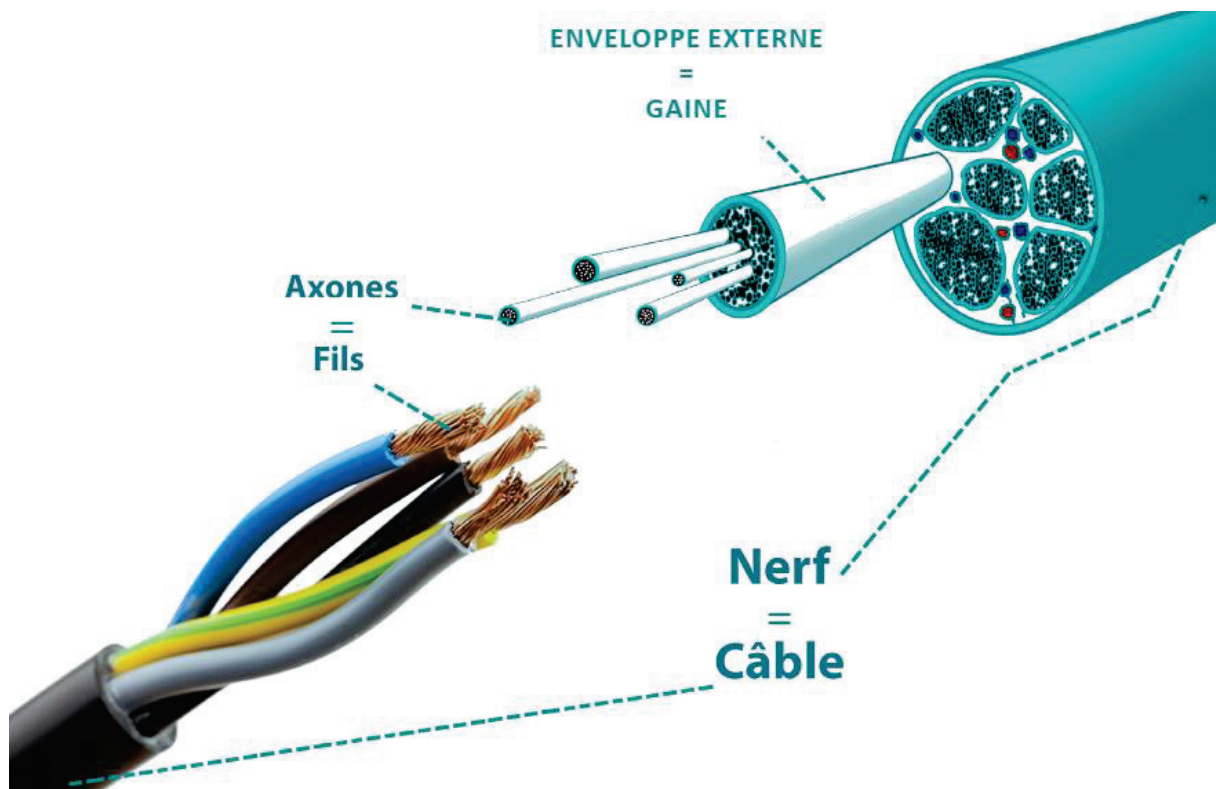


Figure 1 : Représentation schématique de la structure d'un nerf et d'un câble électrique

Laurie Bonnafond, DIU Appareillage et rééducation en chirurgie de la main

On distingue les efférences du système nerveux central (SNC) vers la périphérie qui correspondent au contingent moteur du nerf, des afférences qui représentent le contingent sensitif, issues des récepteurs périphériques dont le rôle est de transmettre les informations vers le SNC.

L'information est transmise sous forme de signaux électriques ou influx nerveux qui possèdent des propriétés dépendantes, entre autres, des caractéristiques intrinsèques du nerf notamment le diamètre axonal ou la présence d'une gaine de myéline entourant le nerf qui ont un rôle majeur sur la vitesse de conduction de l'influx nerveux.

Les nerfs sont formés de fibres nerveuses qui sont-elles même constituées d'axones et de cellules de Schwann qui représentent les cellules gliales de soutien du SNP et qui sont notamment à l'origine de la gaine de myéline, recouvrant certains des axones, structure qui sera plus amplement détaillée par la suite.

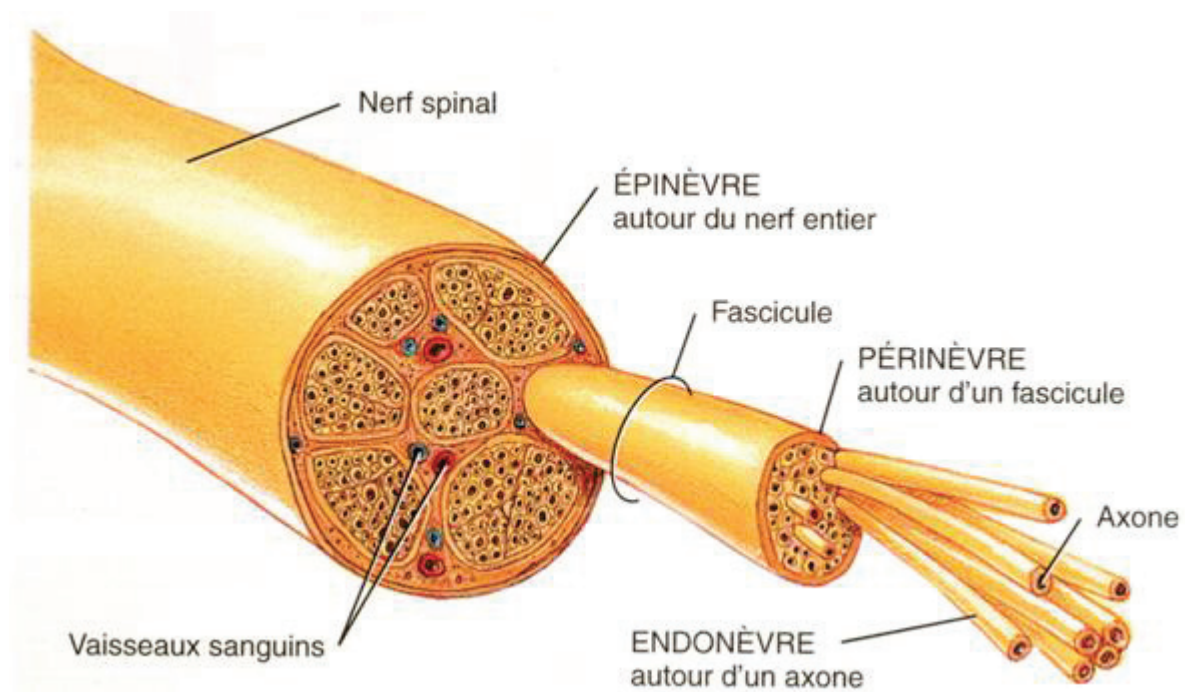


Figure 2 : Découpe anatomique transversale d'un nerf spinal

<http://www.futura-sciences.com>

Ces fibres nerveuses sont regroupées en fascicules et représentent la moitié du volume fasciculaire. La surface complémentaire est composée d'un tissu conjonctif lâche, l'endonèvre, constitué d'une matrice de collagène, de fluides endoneuraux et d'un contingent cellulaire associant des fibroblastes à de rares mastocytes et macrophages. Cet ensemble est engainé par le périnèvre, véritable barrière de diffusion constituée de multiples couches cellulaires au sein desquelles on retrouve de nombreuses jonctions serrées. Le périnèvre participe au maintien du milieu osmotique et de la pression endoneurale à des valeurs stables.

Les fascicules sont eux-même inclus dans un tissu conjonctif aréolaire, l'épinèvre, dont la présence participe à une fixation relative des fascicules au sein du nerf mais également à son glissement au sein des structures environnantes, fournissant de plus une forme de résistance à la compression. L'épinèvre est également le support du réseau lymphatique et vasculaire permettant la communication du avec les artérioles et veinules contenues dans l'endonèvre.

A. Structure et physiologie de l'axone

L'axone est un prolongement cylindrique du cytoplasme du neurone dont le rôle est la transmission de l'influx nerveux par des mécanismes de dépolarisation – repolarisation membranaire. Son existence ne peut se concevoir que dans le contexte d'une unité fonctionnelle entre le neurone et la cible, et étant donné que sa structure ne permet pas une synthèse protéique propre il existe un flux axonal permettant l'acheminement de ses constituants du noyau du neurone vers la périphérie.

Au niveau de sa structure, on distingue la membrane plasmique axonale continue, ou axolemme, et le cytoplasme, aussi nommé axoplasme.

L'axolemme possède une bicouche lipidique intégrant en son sein des protéines et des glycolipides (les gangliosides). Son rôle est d'assurer l'interface entre l'axone, le milieu extérieur et les cellules de Schwann ainsi que la conduction de l'influx nerveux.

Cette conduction est réalisée grâce à un certain nombre de protéines transmembranaires appartenant à la famille des protéines canalaire (canaux calciques, sodiques, potassiques notamment) qui sont responsables des mouvements actifs et passifs des ions de part et d'autre de l'axolemme, générant des différences de concentrations ioniques ou potentiels de membrane dont la diffusion participe in fine à la conduction nerveuse.

La structure interne de l'axone est sous la dépendance d'une structure dense constituée de microfibrilles qui comprend trois grands groupes de protéines : les microfilaments, les filaments intermédiaires et les microtubules. Ces microfibrilles participent au maintien de la forme axonale ainsi qu'à sa croissance.

Les microfilaments sont formés d'un assemblage de polymères d'actine globulaire et sont préférentiellement localisées dans les zones en mouvement et d'ancrage membranaire participant ainsi significativement à la mobilité du cône de croissance axonal ainsi qu'à la formation des synapses.

Les neurofilaments (Yuan et al. 2012), dans le système nerveux périphérique, représentent une structure constituée des trois protéines NFL, NFM et NFH (respectivement Neurofilament light, medium et heavy polypeptide). Ces protéines sont capables, par un jeu de modifications post traductionnelles à type de phosphorylation notamment, de polymériser pour former une structure lâche d'un certain calibre, participant ainsi à la détermination du diamètre axonal, paramètre majeur corrélé à la myélinisation.

Enfin, les microtubules sont élaborés à partir d'un hétérodimère de tubuline alpha et bêta formant une ossature tubulaire creuse sur laquelle viennent se fixer de nombreuses protéines neuronales essentielles dans les fonctions d'assemblage, de stabilisation et d'interaction avec les autres structures microfibrillaires environnantes. Les microtubules possèdent un rôle particulièrement important au sein du flux axonal.

1. Le flux axonal

Ce flux circule de manière constante, à double sens, à l'image d'un axe routier reliant un centre névralgique à sa destination, antérograde et rétrograde et ce à des vitesses variables en fonction des éléments transportés (Filliatreau et al., 1988). Ce transport est vital pour le fonctionnement du système nerveux, ou la synthèse protéique est confinée au corps cellulaire qui doit donc approvisionner l'axone et sa terminaison nerveuse, représentant en terme de surface plusieurs milliers de fois celle du soma. Les études de ce mécanisme (Allen et al. 1985, Paschal et al. 1987) ont permis de mettre en évidence les supports moléculaires moteurs représentés par la kinésine pour le transport antérograde et par la dynéine pour le rétrograde.

1.1 Le transport antérograde

Il peut être divisé en 2 contingents.

Le premier, lent, assure le renouvellement de 80% des protéines totales du neurone, transportant essentiellement les protéines de structure du cytosquelette ainsi que des enzymes du métabolisme intermédiaire, à des vitesses comprises entre 1 et 4 mm/jour.

Le transport antérograde rapide véhicule, à une vitesse d'environ 400 mm/jour, des structures vésiculaires et tubulaires contenant les précurseurs des neurotransmetteurs essentiels au fonctionnement synaptique ainsi que des protéines membranaires. D'autre part, les mitochondries et lipides membranaires sont véhiculées de la même manière avec une vitesse toutefois moindre, décrite entre 50 et 100 mm/jour.

1.2 Le transport rétrograde

Ce type de transport est également rapide, à une vitesse d'environ 200 mm/jour, et chargé du retour au corps cellulaire des déchets périphériques, des enzymes, facteurs de croissance et vésicules lysosomiales participant également au rétrocontrôle de l'activité du corps cellulaire par la cible.

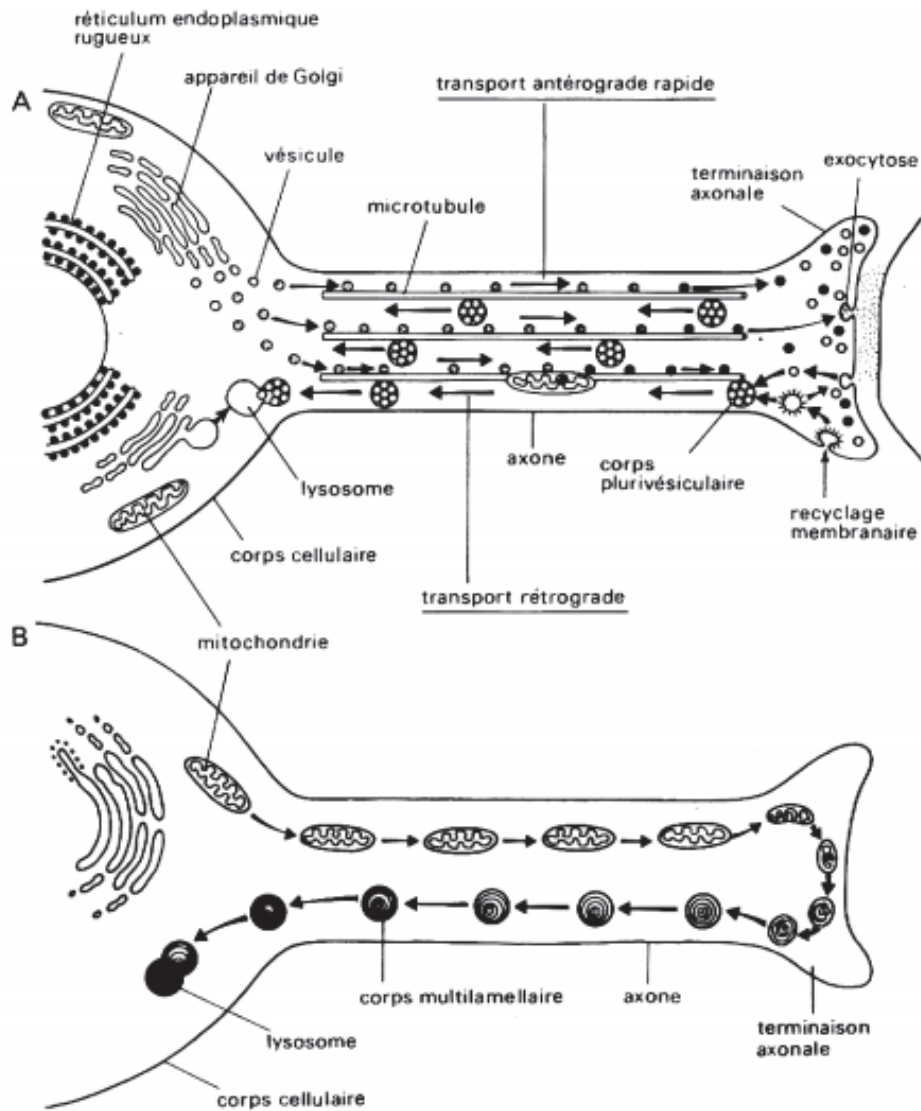


Figure 3 : Mécanismes du transport axonal

A. Représentation du transport axonal antérograde rapide (mouvement antérograde de vésicules) et du transport axonal rétrograde. Ces deux transports ont pour support les microtubules.

B. Représentation du transport de mitochondries (devenir ?)

Neurosciences & comportements (neur-one.fr)

1.3 Connaissances actualisées du transport axonal

Des travaux plus récents de Maday et al. (2014) mettaient la lumière sur l'état de l'art du transport axonal, révélant la présence simultanée sur un grand nombre de composant à la fois de la kinésine et de la dynéine, le flux étant régulé par l'adjonction de complexe protéique activant ou inhibant leur action. Un résumé des différents types de transports est exposé dans leur schéma ci-dessous.

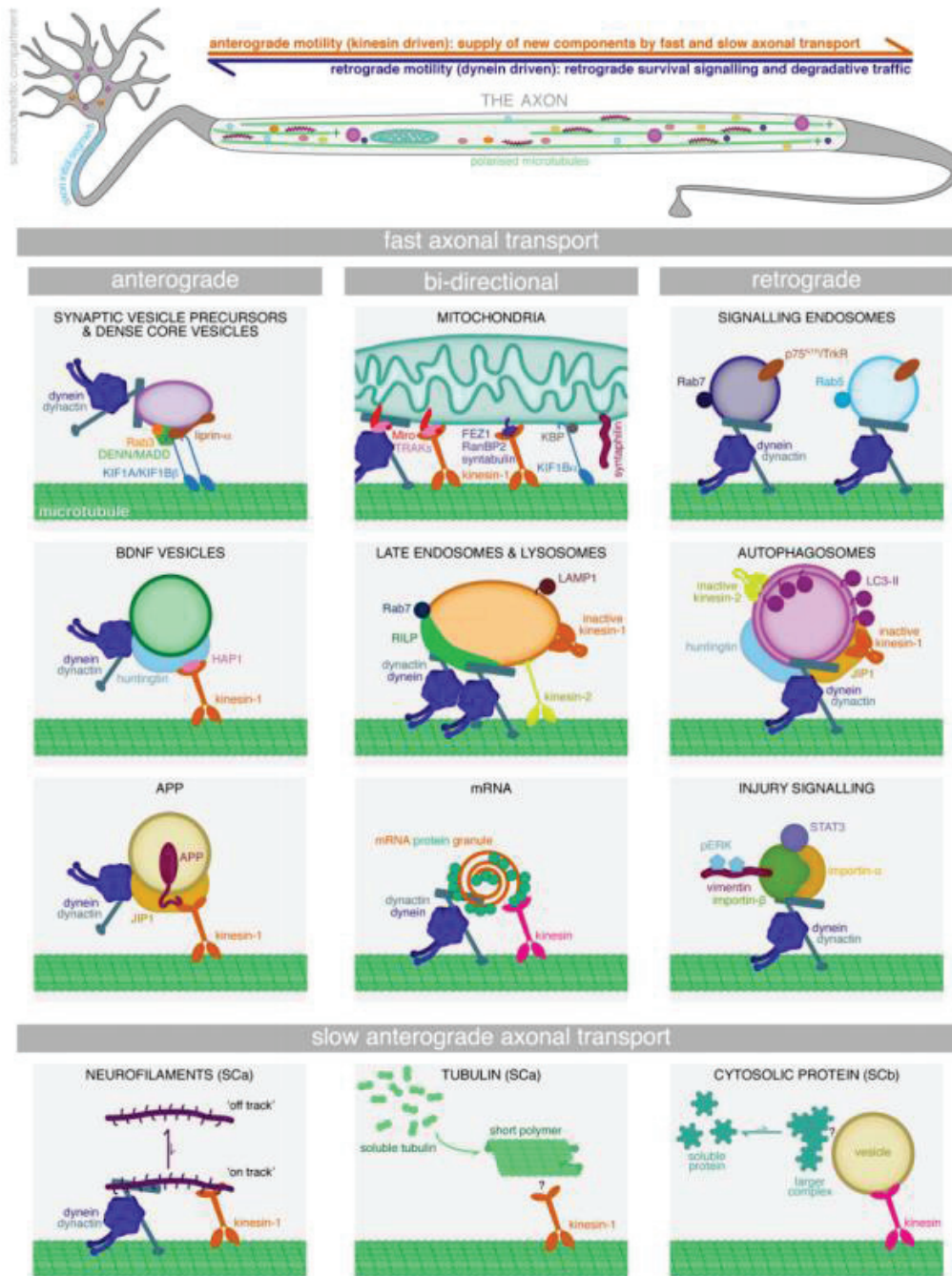


Figure 4 : Voies et molécules du transport axonal actualisées

Mécanismes impliquant à la fois la dynéine et la kinésine dans le transport vésiculaire de composants cellulaires

2. Cellule de Schwann et gaine de myéline

a. Cellule de Schwann

Ce sont des cellules gliales dérivées initialement de cellules pluripotentes de la crête neurale lors de l'embryogénèse qui sont spécifiques du système nerveux périphérique. Ces cellules embryonnaires ont la propriété de se différencier en plusieurs types cellulaires (neurones périphériques, mélanocytes, cellules endocrines, cellules musculaires lisses) sous l'influence de facteurs de transcription.

Plusieurs travaux (Britsch et al., 2001 ; Mirsky et al., 2008) ont mis en évidence le rôle majeur de Sox10 dans la différenciation précoce vers cette lignée induisant la formation des précurseurs de la cellule de Schwann ainsi que son rôle dans l'acquisition des propriétés myélinisantes de ce type cellulaire. La transition des précurseurs vers la cellule de Schwann mature implique également l'endothéline et la cascade de signalisation cellulaire sous la dépendance de Notch (Brennan et al., 2000 ; Wakamatsu et al. 2000).

Lors de la migration du précurseur pendant la vie embryonnaire, la cellule de Schwann en devenir va entourer un groupe d'axones en formation avant de séparer un axone de gros calibre du reste du contingent puis après division cellulaire on distingue classiquement deux voies. Une cellule fille sera isolée avec l'axone de gros calibre tandis que la deuxième cellule fille restera associée au groupe axonal de faible diamètre, ce processus étant couramment appelé le « tri radial ». Le tri est maintenu au cours de la vie dans les fibres de petit calibre qui sont entourées par la cellule de Schwann pour former un ensemble appelé les fibres de Remak.

Concernant les gros axones (diamètre de 5-10 μm), le tri radial continue jusqu'à ce qu'une cellule fille entoure chaque axone, avec une relation de une cellule myélinisant un seul axone, mais chaque axone est associé à une multitude de cellules de Schwann afin que la mise en place de la gaine de myéline s'effectue sur toute la longueur. Le processus de myélinisation consiste en un enroulement multiple de la membrane plasmique de la cellule de Schwann autour de l'axone (Webster et al., 1971).

Cette étape implique des modifications d'expression génique et de la morphologie cellulaire par le biais d'autres facteurs de transcription dont le plus notable est Krox-20 (Egr-2). En effet, des modèles de souris KO pour Egr-2 démontraient (Topilko et al. 1994) l'absence de

myélinisation tandis qu'une expression diminuée d'Egr-2 est responsable d'une démyélinisation sévère ainsi qu'une rapide dédifférenciation des cellules de Schwann avec reprise d'une activité prolifératrice (Decker et al., 2006), démontrant un processus dynamique dans lequel l'expression différentielle de facteurs environnant est essentielle pour son bon déroulement.

b. Gaine de myéline



Figure 5 : Formation d'une gaine de myéline avec l'enroulement de prolongements cytoplasmique de la cellule de Schwann autour d'un axone
 Fabrice Paré, « La perméabilité contrôlée des membranes et ses conséquences »

Elle est représentée par l'enroulement important, plus de 100 fois, de la membrane plasmique de la cellule de Schwann autour d'un axone. Initialement ce prolongement contient du cytoplasme qui secondairement, avec l'accolement des membranes, disparaît pour ne subsister qu'un complexe lipoprotéique, la myéline compacte. On retrouve cependant une persistance du cytoplasme dans des régions où la gaine est dite non compacte, au niveau de la région périaxonale ainsi que dans les incisures de Schmidt-Lanterman, le tout réalisant une alternance de bande compacte-non compacte.

Une cellule de Schwann est responsable de la myélinisation d'un segment donné d'un axone et l'espace compris entre deux segments est une zone transitionnelle appelée nœud de Ranvier. Cette structure permet la conduction de l'influx nerveux de façon saltatoire, de nœud

en nœud, qui permet d'atteindre des vitesses de conduction jusqu'à dix fois supérieures (120 m/s contre 15 m/s) en comparaison des fibres non myélinisées dont la conduction est continue.

Au niveau de la composition de cette gaine, on retrouve une majorité (70-80%) de lipides avec en particulier du cholestérol, des phospholipides et des glycosphingolipides. On comprendra donc aisément qu'une dysfonction métabolique de ces composants peut aboutir à des pathologies démyélinisantes sévères.

En ce qui concerne les protéines présentes, certaines sont retrouvées dans l'ensemble du système nerveux mais la majeure partie des protéines structurales de la myéline du système nerveux périphérique lui sont spécifiques.

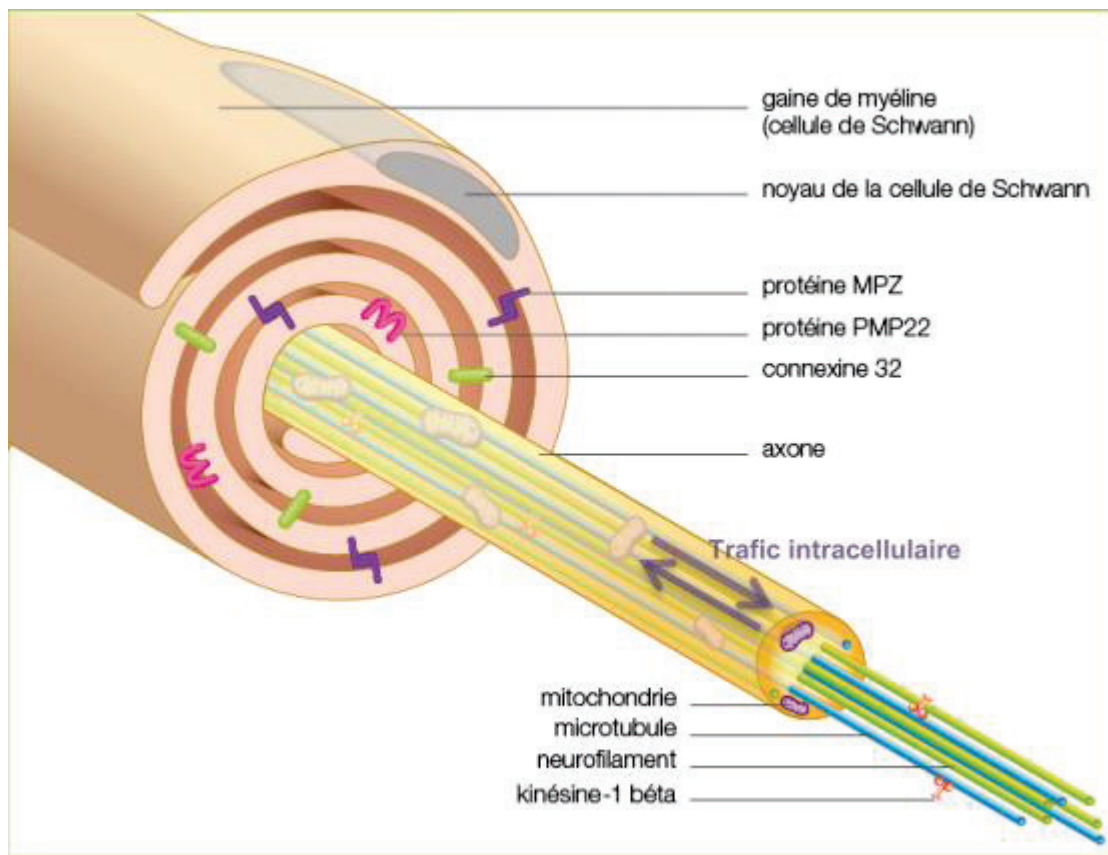


Figure 6 : Structure de la gaine de myéline entourant un axone et localisation des protéines principales de la myéline

Afm-telethon.fr

1. Protéine P0/MPZ

C'est le constituant majoritaire (50%) de la myéline périphérique qui intervient dans la compaction de la gaine. Cette protéine appartient à la superfamille des immunoglobulines, possède une extrémité N-terminale extracellulaire portant le domaine immunoglobuline-like, un segment transmembranaire et une extrémité cytoplasmique C-terminale. Son poids moléculaire apparent est de 30 kDa. Elle est codée par le gène *MPZ* localisé sur le bras long du chromosome 1 (1q23.3).

Le domaine extracellulaire a la propriété de former des dimères antiparallèles de protéines P0, à l'image d'une fermeture éclair, rendant compte de son rôle dans la compaction de la myéline (Raasakka et al., 2019). Par ailleurs, la queue cytoplasmique (P0ct) fortement chargée positivement participe également à la stabilité de ces interactions par un ancrage à la bicouche lipidique de la membrane plasmique à travers des interactions électrostatiques, la membrane étant chargée négativement.

2. Protéine de la myéline périphérique-22 (PMP22)

Elle représente 5% des protéines de la myéline du système nerveux périphérique. C'est une protéine hydrophile de 22 kDa possédant 4 domaines transmembranaires. Elle est codée par le gène *PMP22* localisé sur le bras court du chromosome 17 (17p11.2).

Son absence n'a que peu d'effet sur la structure principale des lamelles de myéline, cependant on constate dans des modèles de souris KO une hypomyélinisation ainsi que la formation de tomacula (Adlkofer et al., 1997), épaissements focaux de la gaine de myéline. Cette lésion anatomique est retrouvée dans la neuropathie héréditaire avec hypersensibilité à la pression (HNPP), causée par une microdélétion de 1,5 Mb sur le chromosome 17p11.2 contenant *PMP22*. Inversement, la microduplication de cette même région est responsable de la maladie de Charcot-Marie-Tooth de type 1A.

Ces deux phénotypes illustrent le concept de dosage génique et l'importance d'une régulation fine de l'expression des gènes impliqués dans le processus de myélinisation, qui nécessite une balance équilibrée afin d'obtenir une structure optimale. Nous exposerons en détails le CMT1A dans le chapitre correspondant.

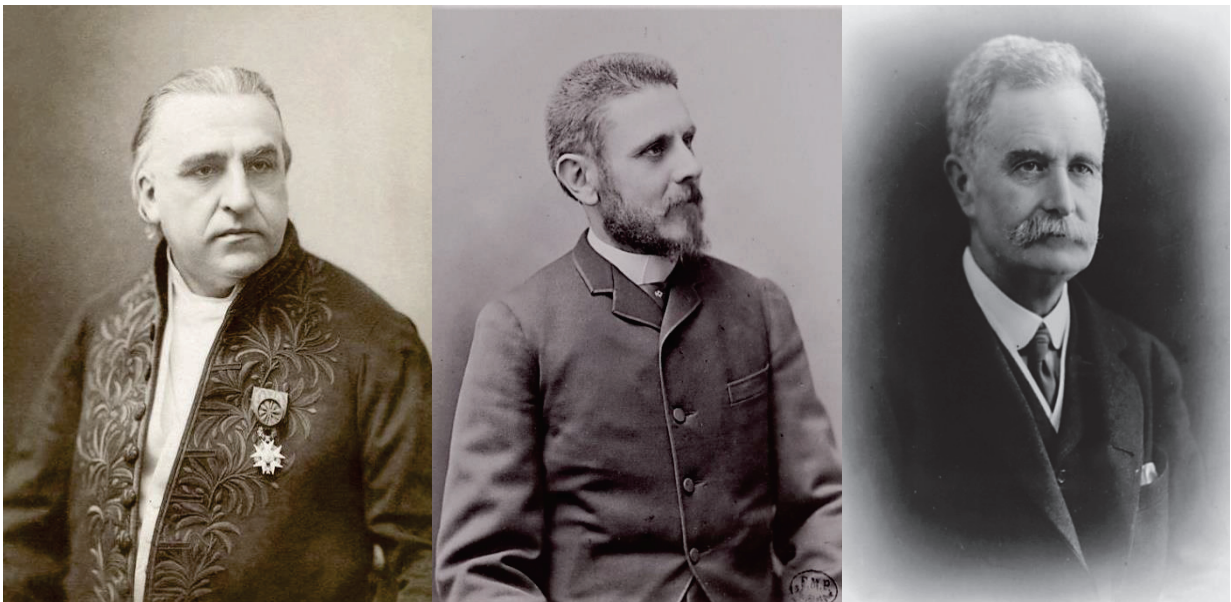
3. Protéine basique de la myéline (MBP)

Elle représente 5% des protéines de la myéline et est également retrouvée au sein du système nerveux central, dans le système immunitaire et dans la moelle osseuse. Cette protéine existe sous de nombreux isoformes en raison d'un important épissage alternatif. Elle est codée par le gène *MBP* localisé sur le bras long du chromosome 18 (18q23). Son rôle dans la gaine de myéline est décrit dans la fusion des membranes plasmiques au sein des régions compactes grâce à sa forte charge positive qui lui permet un ancrage aux lipides chargés négativement, en particulier les résidus de phosphatidyl-sérine.

4. Protéine de la myéline périphérique-2 (PMP2)

Elle représente jusqu'à 15% de la myéline. C'est une petite protéine basique de 14,5 kDa, codée par le gène *PMP2* localisé sur le bras long du chromosome 8 (8q21.13). On la retrouve également au niveau de la myéline compacte et elle aurait un rôle dans le transport des acides gras ou dans le métabolisme des lipides associés à la myéline.

3. La maladie de Charcot-Marie-Tooth



De gauche à droite, Jean-Martin Charcot, Pierre Marie et Howard Henry Tooth ;

Source : Wikipedia

a. Historique (Sturtz et al., 1992)

La pathologie a été décrite pour la première fois dans la littérature en février 1886. Les médecins Jean-Martin Charcot et Pierre Marie rapportaient cinq patients examinés présentant une atrophie péronière de forme familiale lentement progressive, avec un affaiblissement et une atteinte symétrique, débutant aux membres inférieurs et touchant les membres supérieurs après plusieurs années. Le début de cette pathologie était rapporté dans l'enfance ou l'adolescence avec un caractère héréditaire retrouvé dans toutes les observations des différents auteurs dont Charcot et Marie avaient analysé les données, leur permettant de définir une affection de type familial.

Parallèlement, la même année, à partir de trois nouvelles observations, Howard Tooth rapportait dans sa thèse « *The Peroneal Type of pressive muscular atrophy* » vingt cas d'atrophie musculaire progressive. Les cas recensés incluaient les deux premières probables descriptions de patients faites par Aran et Virchow en 1855, ainsi que les observations de Charcot et Marie. Tooth conclut à une atteinte des nerfs périphériques, l'origine musculaire étant clairement écartée, sur la symptomatologie et l'analyse des cas autopsiés.

Trois années plus tard, Herringham et al. (1889) rapportait probablement la première description d'une grande famille de CMT avec une forme de transmission dominante liée à l'X.

En 1893, Jules Dejerine et Jules Sottas décrivaient une fratrie (une sœur et son frère) avec une apparition de la maladie dans la petite enfance. Ce syndrome était alors décrit comme une atteinte nerveuse à type de névrite interstitielle.

Les auteurs individualisaient cette présentation clinique comme un syndrome à part du CMT devant une hypertrophie nerveuse, une atteinte sensitive distales des quatre membres avec ataxie majeure, ainsi qu'une dégénérescence médullaire postérieure mise en évidence en post mortem. Il est cependant notable dans cette étude que les parents n'avaient pas été examinés et que la description du syndrome correspondait essentiellement à la description clinique de la sœur. Dejerine confirmait en 1896 son observation à partir d'un sujet masculin issu d'une famille consanguine avec un âge de début de la maladie autour de 7 ans.

Le syndrome qui porte leur nom reste à l'heure actuelle individualisé des CMT, étant utilisé pour décrire des formes à début infantile, ainsi que des formes sévères démyélinisantes ou récessives.

b. Signes cliniques et examen physique

Dans 60% des cas, les symptômes apparaissent dans la première décennie. Cependant certains patients peuvent n'être symptomatiques que vers l'âge de 60 ans (Souayah et al., 2007).

Une anamnèse rigoureuse révélera en particulier des entorses fréquentes, des antécédents de fractures des pieds et malléoles, des difficultés sportives à l'école et des lésions plantaires récurrentes dans les formes avec une atteinte sensitive plus marquée (ulcérations, paronychies, durillons ; Klein et al., 2013).

A l'examen physique, la triade caractéristique de la pathologie se reconnaît par :

- Un **déficit moteur progressif** prédominant en distalité des membres, manifesté par un steppage important à la marche dont le patient n'a souvent pas conscience. Une atrophie globale des jambes, très marquée au niveau des mollets, pourra être notée à l'examen.
- Des **déformations squelettiques** dont les pieds creux ou les orteils en griffe, ainsi que des formes de scoliose parfois sévères.
- Une **hypo** ou **aréflexie** tendineuse généralisée (Vallat et al., 2013 ; Kazamel et al., 2015).

Il est important de noter que le spectre clinique de la maladie de Charcot-Marie-Tooth est très large, allant des formes très modérées voire même asymptomatiques, aux formes les plus sévères et précoces aussi appelées « maladie de Dejerine-Sottas ».

1. Déficit sensitivo-moteur des extrémités

Deux pics d'apparition des troubles de l'appareil locomoteur sont classiquement décrits : le premier dans la jeune enfance entre 2 et 3 ans (Cottalorda et al., 2012), le second pendant l'adolescence (Harding et al., 1980).

Ces troubles sont représentés par un déficit moteur et une atrophie qui sont dits « longueur-dépendants », progressifs et le plus souvent symétriques (Kuhlenbäumer et al., 2002).

Les muscles classiquement touchés sont les muscles intrinsèques du pied, ceux de la loge antéro-externe de la jambe (tibial antérieur, extenseur propre du gros orteil, long extenseur

des orteils et péronier antérieur). Ceux intéressant le membre supérieur sont généralement touchés plus tardivement.

Il est important de noter que dans l'étude de Bienfait et al. (2007), 94% des 47 patients symptomatiques avaient ressenti, comme signe inaugural de la maladie, un déficit moteur touchant les membres inférieurs. Dans cette série, 43% et 62% des patients rapportaient des fasciculations ou des crampes, respectivement

2. Déformations squelettiques

Elles touchent essentiellement les pieds et conduisent à une anomalie de la marche.

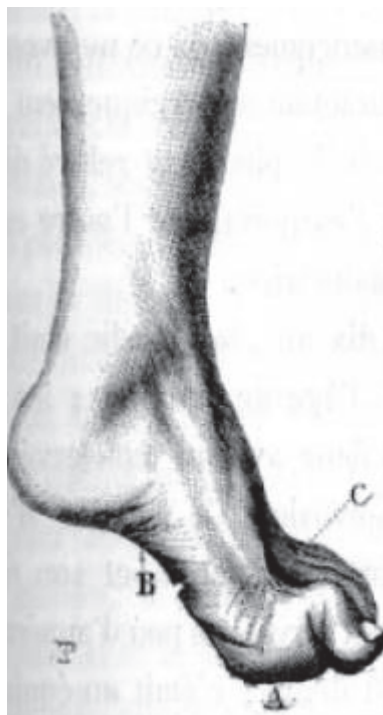


Figure 8 : Déformation squelettique du pied réalisant un *pes cavus*

Image : <https://neuromuscular.wustl.edu/>

On y distingue les pieds creux (« *pes cavus* ») qui sont secondaires à une déformation en flexion plantaire des métatarsiens. Gudmundsson et al. (2009) retrouvait cette anomalie chez 70% d'une cohorte de 37 patients atteints de CMT. La physiopathologie de cette anomalie résiderait dans la dénervation sélective des muscles intrinsèques du pied (Berciano et al., 2011).

Les orteils peuvent également être touchés avec une présentation « en griffe ». Au niveau des mains, à un stade plus avancé de la maladie, l'atrophie distale se manifeste par des « mains de singes ».

En dehors de ces lésions périphériques il existe des cas de scoliozes, en général sévères, que l'on retrouve dans les formes axonales, ainsi que des dysplasies de hanches qui sont présentes chez 6 à 10% des patients présentant un CMT démyélinisant (Walker et al., 1994 ; Hadianfard et al., 2012).

c. L'apport de l'électrophysiologie : formes myéliniques, axonales et intermédiaires

Dans la deuxième partie du 20^{ème} siècle, l'arrivée de l'électrophysiologie représente une étape majeure dans la compréhension de la maladie. Elle a conduit Dyck et Lambert (1968) à distinguer deux phénotypes principaux : la forme myélinique (aussi appelée CMT1) et la forme neuronale (ou axonale / CMT2). Leur travail permettait également la caractérisation de formes de la maladie avec une atteinte des nerfs sensitifs et moteurs (représentant le CMT au sens strict), des formes avec une atteinte motrice pure (également appelés CMT spinaux), ainsi que les formes uniquement sensitives.

Cependant, dans les années 1970, la classification ainsi faite des CMT en seulement deux catégories, myélinique et axonale est sujette à débats.

En effet, en 1978, Davis et al. proposent à partir d'une série de 49 patients comportant 31 hommes et 18 femmes une nouvelle classification en cinq groupes sur la base de résultats électrophysiologiques. On distingue ainsi la neuropathie hypertrophique (vitesse <25m/s), un groupe intermédiaire (entre 25 et 45m/s), une forme neuronale sensitivo-motrice (>45m/s), une forme neuronale motrice pure (>45m/s) et un dernier groupe neuronal moteur avec une atteinte du motoneurone supérieur (>45m/s).

Des membres de la même équipe étudiaient également des biopsies nerveuses montrant, pour le groupe intermédiaire, des anomalies à la fois axonales et de remyélinisation des fibres nerveuses, avec une perte de fibres de gros diamètre et la présence de bulbes d'oignons (témoignant d'une atteinte myélinique) avec cependant moins de lamelles de myéline que chez les patients CMT1 (Madrid et al., 1977).

L'étude de référence pour distinguer les CMT en deux catégories était publiée en 1980 (Harding et Thomas). Les auteurs, à partir de 119 cas index et 108 apparentés atteints provenant de 110 familles différentes, déterminaient que la séparation entre les deux groupes de familles CMT1 et CMT2 pouvait être faite en fixant un cut-off de vitesse de conduction nerveuse motrice (VCM) du nerf médian à 38m/s (plus ou moins 2m/s). Sur leur série, seules 3 familles sur les 110 ne pouvaient pas être catégorisées sur ce simple argument.

Une grande série française de 131 patients CMT était présentée quelques années plus tard (Bouche et al., 1983). Parmi ces patients, 55 étaient classés dans le groupe démyélinisant CMT1 avec une VCM du nerf médian <30m/s, tandis que 64 étaient classés dans le groupe axonal CMT2 avec une VCM >40m/s. Dans leur travail, 12 patients restaient inclassables avec une vitesse comprise entre 30 et 40m/s. Les mêmes auteurs proposaient alors d'inclure ces patients dans un groupe dit « intermédiaire » (Gherardi et al., 1983). Le chiffre de 10% (12/131) de formes inclassables est probablement le plus proche de la réalité actuellement admis dans la classification nosologique des patients CMT.

Dans une mise à jour plus récente, Nicholson et al. en 2006 estimait que le terme de groupe « intermédiaire » ne devrait pas être utilisé pour décrire un patient isolé avec une VCM comprise entre 25 et 45m/s. Les auteurs considéraient, comme groupe intermédiaire, les familles de plusieurs individus avec des vitesses de conduction motrices nerveuses qui les classaient dans les groupes CMT1 ou CMT2. Ces familles étaient en fait représentées par un nombre limité de mutations distinctes d'un faible groupe de gènes responsables d'une hétérogénéité intra familiale (*GJB1*, *DNM2* par exemple).

d. Acronymes et classification : bilan de la période nosologique (1956 – 1980)

Deux grandes classifications pour la maladie de Charcot-Marie-Tooth émanent de cette période (Sturtz et al., 1992).

Un premier recensement est entrepris, prenant en compte les modes de transmission génétique, par McKusick dans son projet Mendelian Inheritance in Man (qui deviendra l'actuelle base de données publique en ligne OMIM). La seconde classification est celle proposée par Dyck et Lambert en 1968 récapitulant l'expérience accumulée de dix années d'explorations cliniques et électrophysiologiques.

La classification de McKusick retient la terminologie historique de CMT, rendant hommage aux médecins ayant décrit la pathologie avec les formes suivantes : **CMT1** (formes démyélinisantes dominantes), **CMT2** (formes axonales dominantes), **CMT3** (neuropathie hypertrophique de Dejerine-Sottas), **CMT4** (formes récessives) et **CMTX** (formes de transmission liée à l'X).

Dans la seconde classification selon Dyck et Lambert, la terminologie CMT est abandonnée pour laisser place au terme plus générique de HMSN (Hereditary Motor and Sensory Neuropathy). Cette classification permet de mettre les CMT en perspective à la fois avec les neuropathies héréditaires sensitivo-motrices autres, mais également avec les formes motrices pures (HMN-V) ou sensibles pures (HSN). Les auteurs décrivent également ce qu'ils nomment les formes de passages (neuropathie avec atteinte centrale à type de syndrome pyramidal ou d'atrophie optique).

Acronyme	Phénotype (Dyck et Lambert)	Remarques
HMSN I	Maladie de Charcot Marie Tooth, formes myéliniques	Autosomiques dominantes Vitesses ralenties (pas de seuil)
HMSN II	Maladie de Charcot-Marie-Tooth forme neuronale (axonale)	Autosomiques dominantes Vitesses normales (pas de seuil)
HMSN III	Maladie de Dejerine-Sottas	La maladie est redéfinie : forme infantile avec retard des acquisitions motrices, vitesses ralenties, transmission récessive
HMSN IV	Maladie de Refsum	Excès d'acide phytanique
HMSN V	HMSN II associée à une paraplégie spastique	Formes dominantes
HMSN VI	HMSN II associée à une atrophie optique	Formes dominantes
HMSN VII	HMSN II associée à une rétinite pigmentaire	Formes dominantes

Tableau 1 : Classification de Dyck et Lambert (1968) des Neuropathies héréditaires sensitivo-motrices

Il est intéressant de noter qu'aucune des deux classifications ainsi présentées ne prend en compte la notion de formes « intermédiaires » de la maladie. Enfin, la description de Dyck et Lambert ne prévoit pas la possibilité de formes axonales de transmission récessives, et elle ignore également les formes liées à l'X.

1. Identification des premiers loci et gènes

Le premier locus intéressant un gène du CMT a été identifié par Bird et al. en 1980 par analyse de liaison d'un marqueur protéique avec le groupe sanguin Duffy assigné au chromosome 1.

Le gène en cause (*MPZ* ou *P0*) sera identifié en 1993 (Hayasaka et al.). Cela correspond à l'actuelle forme CMT1B.

La première découverte d'anomalie génétique dans cette maladie a été réalisée en 1991, avec une duplication touchant la région du chromosome 17p11.2 contenant le gène *PMP22* (Lupski et al. ; Raeymaekers et al.) responsable de l'entité CMT1A. Il s'agit de l'anomalie génétique la plus fréquemment rencontrée.

En 1993, après l'établissement de la carte des gènes humains, chromosome par chromosome, du Consortium Human Gene Mapping (HGM), cinq loci sont alors connus pour le CMT avec à l'époque trois gènes majeurs identifiés. Les premiers acronymes sont donc établis sur la base de « un locus = un acronyme », dans la lignée du recensement effectué par McKusick (Tableau 2).

Première description du locus	Locus	Phénotype rattaché	Acronyme HGM en 1993	Situation en 1993
1980	1q22-q23	Forme dominante démyélinisante	CMT1B	Gène identifié = <i>MPZ (P0)</i>
1986	Xq13	Forme dominante liée à l'X	CMTX1	Gène identifié = <i>GJB1</i>
1989	17p12	Forme dominante démyélinisante	CMT1A	Gène identifié = <i>PMP22</i> (duplication ou mutations ponctuelles)
1993	1p35-p36	Forme axonale	CMT2A	Gène non identifié (<i>MFN2</i>)
1993	8q13-q21	Forme récessive (démyélinisante)	CMT4A	Gène non identifié (<i>GDAP1</i>)

Tableau 2 : Identification des premiers locus associés au CMT avec les acronymes et gènes correspondants

2. Classification et séries phénotypiques OMIM

A ce jour, plus de 80 gènes et 1000 mutations ont été rapportés comme pouvant être impliqués dans le CMT (Timmerman et al., 2014). Pour la pratique quotidienne, cinq gènes à transmission autosomique dominante sont prépondérants et expliquent environ 60% des cas de CMT : *PMP22*, *GJB1/CX32* et *MPZ/P0* pour les formes démyélinisantes CMT1, ainsi que *MFN2*, *GDAP1*, *GJB1* et *MPZ* pour les formes axonales (Saporta et al., 2011 ; Murphy et al.,

2012 ; Sivera et al., 2013 ; Manganelli et al., 2014). En ce qui concerne les formes récessives, les mutations dans *GDAP1* et *SH3TC2* sont les plus fréquentes.

Les connaissances actuelles révèlent qu'il n'est en fait pas plus simple de classer les CMT en fonction des gènes responsables que sur la base de l'électrophysiologie. Certains gènes peuvent en effet être impliqués à la fois dans les formes à transmission dominante ou récessive (comme *MFN2*, *EGR2* ou *PMP22* par exemple). De plus, selon les mutations pour certains gènes, toutes les vitesses de conduction peuvent être observées (exemple de *MPZ*, voir Tableau 3 ci-dessous)

Enfin, il faut tenir compte des gènes non référencés dans la série phénotypique des CMT, mais pour lesquels une neuropathie périphérique isolée est parfois le seul signe clinique précédant les signes cardinaux habituels de ces pathologies. Dans cette catégorie nous retrouvons par exemple le gène *SPG11* impliqué dans les paraplégies spastiques, ou *SURF1* qui est couramment associé à des pathologies mitochondriales. Dans ces deux cas, des observations d'atteinte isolée compatible avec un diagnostic de CMT, mais sans atteinte pyramidale ou cérébelleuses, ont été décrits.

Pour un lecteur non familier ou un patient dont le diagnostic aurait été annoncé, prendre la liste des acronymes CMT pour une classification peut très vite s'avérer déroutant.

Pour un spécialiste du CMT, établir la simple liste des gènes impliqués dans la maladie de Charcot-Marie-Tooth par ses acronymes « génétiques » relève également du défi.

Une alternative simple est l'utilisation de la base OMIM, qui propose désormais pour les CMT une « série phénotypique » regroupant pour chaque locus / gène les descriptions compatibles. La liste est ordonnée par chromosome. La dernière version comportant 73 lignes pour 57 gènes retenus est détaillée ci-après :

Location	Phenotype	Transmission	Phenotype MIM number	Gene/Locus	Gene/Locus MIM number
1p36.31	Charcot-Marie-Tooth disease, recessive intermediate C	AR	615376	PLEKHG5	611101
1p36.22	?Charcot-Marie-Tooth disease, type 2A1	AD	118210	KIF1B	605995
1p36.22	Charcot-Marie-Tooth disease, axonal, type 2A2A	AD	609260	MFN2	608507
1p36.22	Hereditary motor and sensory neuropathy VIA	AD	601152	MFN2	608507
1p36.22	Charcot-Marie-Tooth disease, axonal, type 2A2B	AR	617087	MFN2	608507
1p35.1	Charcot-Marie-Tooth disease, dominant intermediate C	AD	608323	YARS	603623
1p13.1	Charcot-Marie-Tooth disease, axonal, type 2DD	AD	618036	ATP1A1	182310
1q22	Charcot-Marie-Tooth disease, type 2B1	AR	605588	LMNA	150330
1q23.3	Charcot-Marie-Tooth disease, dominant intermediate D	AD	607791	MPZ	159440
1q23.3	Charcot-Marie-Tooth disease, type 2J	AD	607736	MPZ	159440
1q23.3	Charcot-Marie-Tooth disease, type 1B	AD	118200	MPZ	159440
1q23.3	Charcot-Marie-Tooth disease, type 2I	AD	607677	MPZ	159440
1q23.3	Dejerine-Sottas disease	AR, AD	145900	MPZ	159440
3q21.3	Charcot-Marie-Tooth disease, type 2B	AD	600882	RAB7	602298
3q25.2	Charcot-Marie-Tooth disease, axonal, type 2T	AR, AD	617017	MME	120520
3q26.33	Charcot-Marie-Tooth disease, dominant intermediate F	AD	615185	GNB4	610863
4q31.3	Charcot-Marie-Tooth disease, type 2R	AR	615490	TRIM2	614141
5q31.3	Charcot-Marie-Tooth disease, axonal, type 2W	AD	616625	HARS	142810
5q32	Charcot-Marie-Tooth disease, type 4C	AR	601596	SH3TC2	608206
6q21	Charcot-Marie-Tooth disease, type 4J	AR	611228	FIG4	609390
7p14.3	Charcot-Marie-Tooth disease, type 2D	AD	601472	GARS	600287
7q11.23	Charcot-Marie-Tooth disease, axonal, type 2F	AD	606595	HSPB1	602195
8p21.2	Charcot-Marie-Tooth disease, type 2E	AD	607684	NEFL	162280
8p21.2	Charcot-Marie-Tooth disease, dominant intermediate G	AD	617882	NEFL	162280
8p21.2	Charcot-Marie-Tooth disease, type 1F	AR, AD	607734	NEFL	162280
8q13-q23	Charcot-Marie-Tooth disease, axonal, type 2H	AR	607731	CMT2H	607731
8q21.11	?Charcot-Marie-Tooth disease, axonal, autosomal dominant, type 2K	AR, AD	607831	JPH1	605266
8q21.11	Charcot-Marie-Tooth disease, axonal, type 2K	AR, AD	607831	GDAP1	606598
8q21.11	Charcot-Marie-Tooth disease, axonal, with vocal cord paresis	AR	607706	GDAP1	606598
8q21.11	Charcot-Marie-Tooth disease, type 4A	AR	214400	GDAP1	606598
8q21.11	Charcot-Marie-Tooth disease, recessive intermediate, A	AR	608340	GDAP1	606598
8q21.13	Charcot-Marie-Tooth disease, demyelinating, type 1G	AD	618279	PMP2	170715
8q24.22	Charcot-Marie-Tooth disease, type 4D	AR	601455	NDRG1	605262
9p13.3	Charcot-Marie-Tooth disease, type 2Y	AD	616687	VCP	601023
9q33.3-q34.1	Charcot-Marie-Tooth disease, axonal, type 2P	AR, AD	614436	LRSAM1	610933
9q34.2	Charcot-Marie-Tooth disease, type 4K	AR	616684	SURF1	185620
10p14	?Charcot-Marie-Tooth disease, axonal, type 2Q	AD	615025	DHTKD1	614984
10q21.3	Dejerine-Sottas disease	AR, AD	145900	EGR2	129010
10q21.3	Hypomyelinating neuropathy, congenital, 1	AR, AD	605253	EGR2	129010
10q21.3	Charcot-Marie-Tooth disease, type 1D	AD	607678	EGR2	129010
10q22.1	Neuropathy, hereditary motor and sensory, Russe type	AR	605285	HK1	142600
10q24.1-q25.1	Charcot-Marie-Tooth disease, dominant intermediate A	AD	606483	CMTDIA	606483
11p15.4	Charcot-Marie-Tooth disease, type 4B2	AR	604563	SBF2	607697
11q13.3	Charcot-Marie-Tooth disease, axonal, type 2S	AR	616155	IGHMBP2	600502
11q21	Charcot-Marie-Tooth disease, type 4B1	AR	601382	MTMR2	603557
12p11.21	Charcot-Marie-Tooth disease, type 4H	AR	609311	FGD4	611104
12q13.3	Charcot-Marie-Tooth disease, axonal, type 2U	AD	616280	MARS	156560
12q24.11	Hereditary motor and sensory neuropathy, type 1Ic	AD	606071	TRPV4	605427
12q24.23	Charcot-Marie-Tooth disease, axonal, type 2L	AD	608673	HSPB8	608014
12q24.31	Charcot-Marie-Tooth disease, recessive intermediate D	AR	616039	COX6A1	602072
14q32.31	Charcot-Marie-Tooth disease, axonal, type 2O	AD	614228	DYNC1H1	600112
14q32.33	Charcot-Marie-Tooth disease, dominant intermediate E	AD	614455	INF2	610982
15q21.1	Charcot-Marie-Tooth disease, axonal, type 2X	AR	616668	SPG11	610844
16p13.13	Charcot-Marie-Tooth disease, type 1C	AD	601098	LITAF	603795
16q22.1	Charcot-Marie-Tooth disease, axonal, type 2N	AD	613287	AARS	601065
16q23.1	?Charcot-Marie-Tooth disease, recessive intermediate, B	AR	613641	KARS	601421
17p12	Charcot-Marie-Tooth disease, type 1E	AD	118300	PMP22	601097
17p12	Charcot-Marie-Tooth disease, type 1A	AD	118220	PMP22	601097
17p12	Dejerine-Sottas disease	AR, AD	145900	PMP22	601097
17q21.2	?Charcot-Marie-Tooth disease, axonal, type 2V	AD	616491	NAGLU	609701
19p13.2	Charcot-Marie-Tooth disease, dominant intermediate B	AD	606482	DNM2	602378
19p13.2	Charcot-Marie-Tooth disease, axonal type 2M	AD	606482	DNM2	602378
19q13.2	Dejerine-Sottas disease	AR, AD	145900	PRX	605725
19q13.2	Charcot-Marie-Tooth disease, type 4F	AR	614895	PRX	605725
19q13.33	?Charcot-Marie-Tooth disease, type 2B2	AR	605589	MED25	610197
22q12.2	Charcot-Marie-Tooth disease, axonal, type 2CC	AD	616924	NEFH	162230
22q12.2	Charcot-Marie-Tooth disease, axonal, type 2Z	AD	616688	MORC2	616661
22q13.33	Charcot-Marie-Tooth disease, type 4B3	AR	615284	SBF1	603560
Xp22.2	Charcot-Marie-Tooth neuropathy, X-linked recessive, 2	XLR	302801	CMTX2	302801
Xp22.11	?Charcot-Marie-Tooth disease, X-linked dominant, 6	XLD	300905	PKD3	300906
Xq13.1	Charcot-Marie-Tooth neuropathy, X-linked dominant, 1	XLD	302800	GJB1	304040
Xq22.3	Charcot-Marie-Tooth disease, X-linked recessive, 5	XLR	311070	PRPS1	311850
Xq26	Charcot-Marie-Tooth neuropathy, X-linked recessive, 3	XLR	302802	CMTX3	302802
Xq26.1	Cowchock syndrome	XLR	310490	AIFM1	300169

Tableau 3 : Série phénotypique du CMT issue de la base OMIM

<http://omim.org/phenotypicSeries/PS118220>

4. *PMP22* (forme CMT1A)

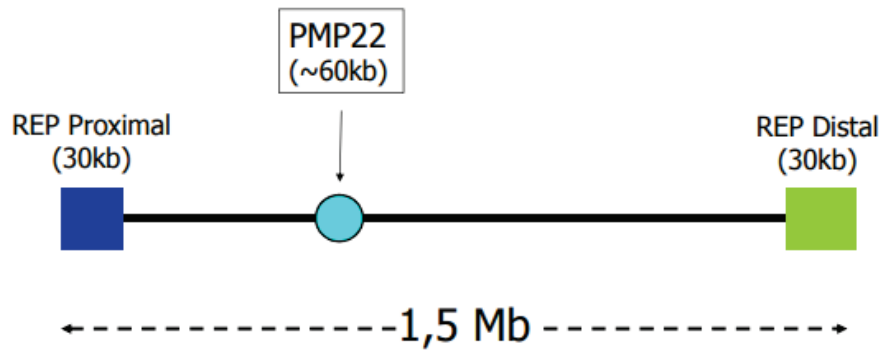
Cette forme est la plus fréquente. En effet elle représente :

- 20 à 64% des CMT selon les études
- 60 à 70% des CMT1
- Une prévalence de 1 à 4 / 10 000 habitants (Skre et al., 1974 ; Braathen et al., 2011)

La transmission de la pathologie se fait sur un mode autosomique dominant, causée par une microduplication localisée au chromosome 17p11.2 (Lupski et al. ; Raeymaekers et al., 1991), région contenant le gène *PMP22* (Matsunami et al., 1992). La région dupliquée contient 30 gènes. L'implication de *PMP22* a été formellement démontrée par l'existence de mutations ponctuelles dans le gène chez des patients CMT1A (Matsunami et al. ; Valentijn et al., 1992).

En dehors des transmissions familiales, il existe une fréquence non négligeable de cas sporadiques avec une duplication de novo, confirmée après étude familiale et tests de paternité (Blair et al., 1996). Cette fréquence atteignait 11% dans une cohorte de 118 patients atteints de CMT1A étudiés par les auteurs.

La majorité des cas sporadiques résultent d'un crossing over inégal survenant pendant la méiose au cours de la spermatogénèse (Palau et al., 1993 ; Reiter et al., 1996 ; Lopes et al., 1996). Les deux spermatoocytes haploïdes résultants renferment donc un déséquilibre de matériel génétique, l'un possédant une duplication de *PMP22* (phénotype CMT1A), l'autre avec une délétion de la même région (phénotype HNPP). La duplication de *PMP22* conduit à une surexpression du gène, *a contrario* sa délétion entraîne une haploinsuffisance (Gabriel et al., 1997).





Les séquences REP  ont 98% d'homologie de séquence 

Figure 9 : Région du Chr17p11.2 de 1,5Mb contenant le gène PMP22, flanquée de 2 régions REP possédant 98% d'homologie de séquence

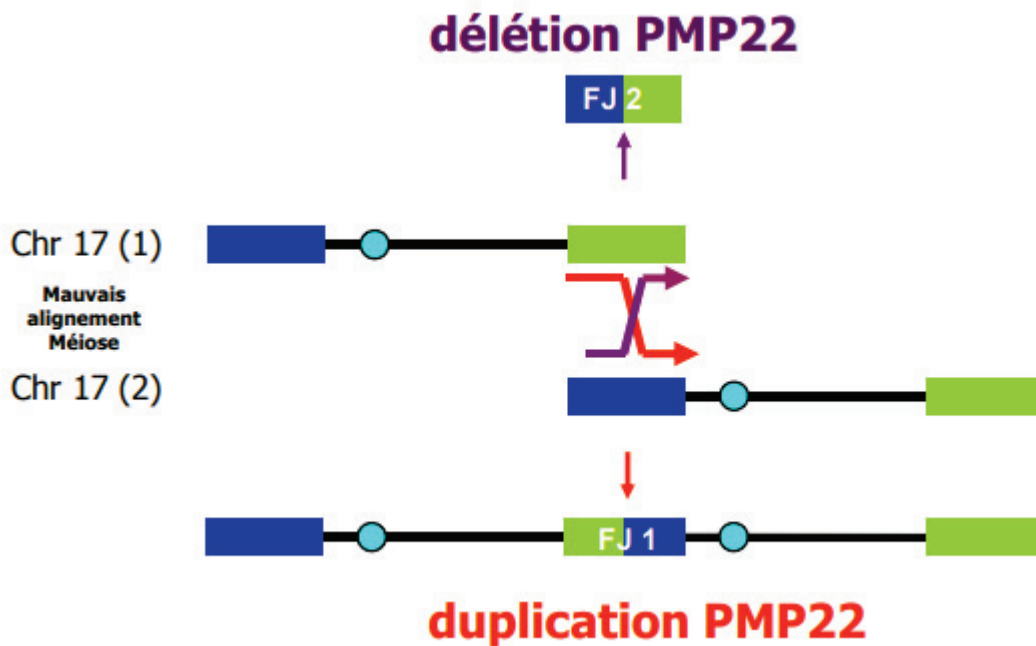


Figure 10 : Mécanisme de *crossing-over* inégal lors de la méiose entre les deux régions REP avec formation des deux CNV : duplication et délétion. On observe la formation au point de recombinaison de fragments de jonction FJ1 et FJ2

Le tableau ci-dessous décrit les caractéristiques des patients CMT1A selon les cohortes publiées dans la littérature :

Etude	Nombre de patients CMT1A	Age de début (années) / Caractéristique	Symptômes initiaux
Blair et al., 1996	118	11% de novo	Déficit moteur, pieds creux, hypoesthésie modérée.
Birouk et al., 1997	119	< 10 ans pour 50% < 20 ans pour 70%	<ul style="list-style-type: none"> - Faiblesse des membres inférieurs - Pieds creux ou Aréflexie MI 100% - 25% des patients asymptomatiques
Berciano et col., 2003	12	4 (1-10)	<ul style="list-style-type: none"> - Aréflexie aux membres inférieurs 100% - Marche talonnante 66% - Atrophie des muscles intrinsèques des pieds (50%) - Hypertrophies nerveuses (50%) - Pieds creux (33%) - Faiblesse péronière 8%

Tableau 4 : Caractéristiques de cohortes de patients CMT1A dans différentes études

Les symptômes apparaissaient dans la première décennie pour 50% des cas, ce chiffre grimant à 70% dans la deuxième décennie (Birouk et al., 1997). Dans la cohorte étudiée par les auteurs, 25% des patients étaient asymptomatiques avec un diagnostic établi après conseil génétique.

Pour Berciano et al., les symptômes initiaux étaient dominés par une atteinte sensitive à type d'ataxie proprioceptive ainsi qu'une déformation des pieds. L'examen physique des patients révélait une aréflexie constante aux membres inférieurs, une démarche talonnante (66%) avec amyotrophie distale (50%), ainsi que la mise en évidence d'hypertrophies nerveuses chez la moitié des patients et une minorité (33%) de *pes cavus*. Aucun des patients ne présentait de paresthésie ou de signes dysautonomiques. Les auteurs notaient également l'existence d'une variabilité phénotypique intrafamiliale.

De manière intéressante, le pronostic fonctionnel de la maladie n'est pas corrélé à la perturbation de la VCM retrouvée à l'électrophysiologie. En revanche, la sévérité de la maladie est corrélée à l'âge de début précoce avec la détérioration axonale sur le nerf médian (Verhamme et al., 2004). Ce dernier paramètre est, par ailleurs, corrélé au degré de handicap des patients. Le handicap résulte d'une perte des réserves corporels et des mécanismes de compensations ainsi que de la progression des déformations squelettiques (Verhamme et al., 2009).

La progression se fait de manière lente sur plusieurs dizaines d'années (Shy et al., 2008). Les auteurs rapportaient pour une cohorte de 72 patients CMT1 une évolution progressive de la maladie avec une augmentation moyenne du score clinique CMTNS (Charcot-Marie-Tooth Neuropathy Score ; Murphy et al., 2011) de 0,68 point/an (IC95% 0,461-0,911 ; $p < 0,0001$), ainsi qu'une augmentation moyenne du score NIS (Neurological Impairment Scale ; Turner-Stokes et al., 2014) de 1,38 point/an (IC95% 0,61-2,12 ; $p < 0,0005$).

Le score moyen des patients de ce travail à l'inclusion était de 13,2 +/- 6,15 (2 – 28). Ce score permet de classer l'atteinte des patients en légère (CMTNS ≤ 10), modéré (CMTNS 11 → 20) et sévère (CMTNS ≥ 21).

a. *PMP22* : structure du gène

Le gène a initialement été isolé à partir de fibroblastes de souris NIH3T3 et identifié comme un gène stoppant la croissance (growth arrest specific genes 3, *gas3* ; Scheiner et al., 1988). Un transcrit plus tard isolé à partir de nerf de rat, SR13, montrait une forte diminution dans son expression en phase précoce après lésion du nerf sciatique (Welcher et al., 1992). Ce transcrit possédait une très forte homologie avec *gas3*. *Gas3/SR13* a ensuite été localisé au niveau de la myéline compacte des nerfs périphériques avec un poids moléculaire estimé de 22 kDa. C'est ainsi que la protéine fut renommée protéine de la myéline périphérique-22 (*PMP22*, Snipes et al., 1992).

Dans le génome humain, *PMP22* est localisé dans la région du chromosome 17p11.2 sur le brin anti sens. C'est un gène long de 40kb qui contient 6 exons très conservés entre l'homme et les rongeurs. On distingue deux exons alternativement transcrits (exons 1A et 1B) qui donnent lieu à deux transcrits différents (Suter et al., 1994).

Ces deux transcrits diffèrent dans leur région 5' non traduite (5'-UTR), suggérant l'existence de deux promoteurs distincts régulant l'expression différentielle des transcrits.

La partie codante du gène s'étend de l'exon 2 jusqu'à l'exon 5. L'exon 2 code le premier domaine transmembranaire. L'exon 3 code la première boucle extracellulaire. L'exon 4 code le second domaine transmembranaire et la moitié du troisième. Enfin, l'exon 5 code la partie restante du troisième domaine transmembranaire, le deuxième domaine extra-cellulaire, le quatrième et dernier domaine transmembranaire ainsi que la région 3' non traduite (3'-UTR).

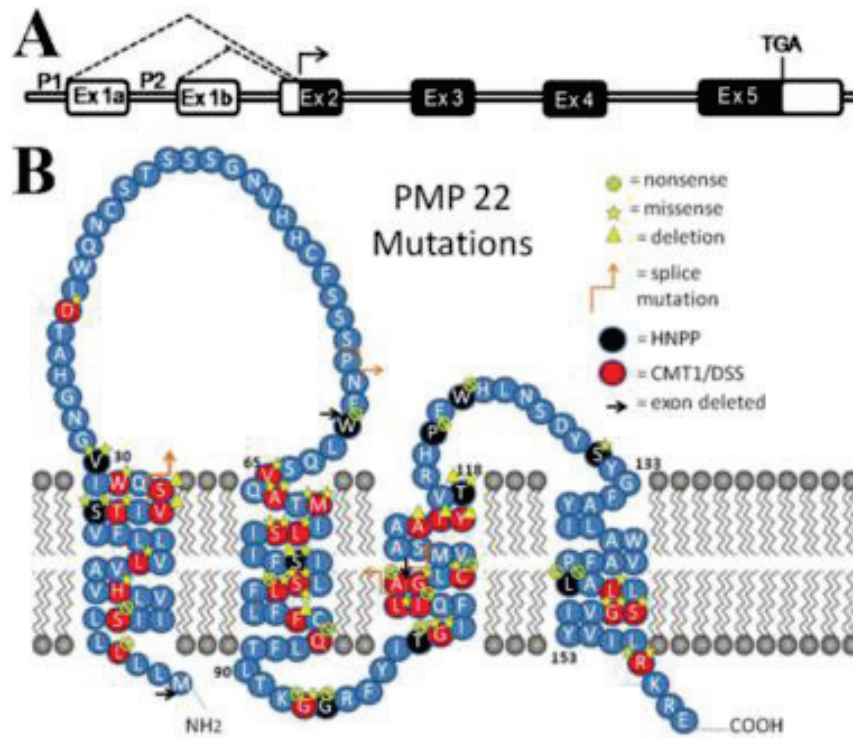


Figure 11 : PMP22 (Li et al. 2013)

- A. Une représentation schématique de PMP22 chez l'Homme contenant 6 exons.
- B. Représentation de la protéine humaine PMP22 montrant les domaines transmembranaires, extra et intracellulaires. Un grand nombre de mutations ponctuelles responsable de CMT4E sont renseignées.

L'étude des régions promotrices (Maier et al., 2002 et 2003) montrait une différence d'expression temporo-spatiale entre le promoteur 1 (ci-après nommé P1A) et le promoteur 2 (ci-après nommé P1B).

Ainsi, P1A est responsable de l'expression spécifique à la cellule de Schwann myélinisante et se retrouve surexprimé dans la phase tardive de la myélinisation ainsi que dans le processus de remyélinisation après une lésion nerveuse. Les auteurs identifiaient en amont du promoteur une séquence régulatrice dénommée LMSE pour Late Myelination Schwann cell Specific Element.

En ce qui concerne P1B, son expression était retrouvée au sein des neurones sensitifs et moteurs, mais également en dehors du système nerveux périphérique avec la mise en

évidence du transcrit 1B au niveau du tronc cérébral, de la moelle épinière, du muscle strié et du cœur (Parmantier et al., 1995 – 1997).

b. Régions régulatrices

Comme la grande majorité des gènes appartenant au génome humain, *PMP22* est soumis à un mécanisme de régulation par l'intermédiaire de ces deux promoteurs et de séquences en *cis* capables de fixer des facteurs de transcription qui agissent comme des activateurs ou, au contraire, des inhibiteurs de la transcription.

L'implication de ces séquences régulatrices en pathologie a d'abord été suggérée par le travail de Weterman et al. (2010) qui mettait en évidence, chez onze patients atteints de CMT1A typique et *a priori* non apparentés, la présence d'une même région dupliquée de 186kb en amont de *PMP22* sans la duplication classique. Cette variation du nombre de copie était considérée comme responsable du phénotype clinique car absente d'une base de 2124 chromosomes contrôles et également absente chez 40 patients atteints d'une polyneuropathie chronique inflammatoire démyélinisante. Des analyses de PCR quantitative à partir de fibroblastes de patients mettait en évidence une augmentation de transcrits de *PMP22* par rapport à des sujets contrôles. Par ailleurs, le séquençage du gène ne retrouvait pas de mutations ponctuelles pouvant expliquer la pathologie.

Cette étude notait que l'utilisation des tests diagnostiques classiques dans la recherche de la microduplication récurrente était alors mise en défaut par l'absence de sondes intéressant cette région.

La recherche de régions régulatrices s'est ensuite poursuivie et a permis, par immunoprécipitation de la chromatine à partir de nerf sciatique de rat et de cellules de Schwann primaires de rat S16 (Jones et al., 2011), d'identifier des sites consensus de fixation pour les facteurs de transcription Egr-2 et Sox10 +11kb par rapport au début de transcription. Cette région correspond à une partie de l'intron 3 du gène. La poursuite de la caractérisation de ces sites, par analyse en FAIRE (Formaldehyde-Assisted Isolation of Regulatory Elements), révélait dans la même zone la présence de chromatine ouverte, témoignant d'une région active sur le plan transcriptionnel.

Les mêmes auteurs (Jones et al., 2012) poursuivaient ensuite leurs recherches, qui aboutirent à la mise en évidence de trois régions situées à distance de *PMP22* possédant les mêmes

propriétés que celle précédemment identifiée dans l'intron 3. Ces trois régions, dénommées Enhancer A (à -120kb par rapport au site d'initiation de la transcription), Enhancer B (à -115kb) et Enhancer C (à -90kb) étaient capables de fixer Egr-2 et Sox-10 et montraient une capacité à induire l'expression du gène de la luciférase d'un vecteur rapporteur contenant un promoteur minimal et transfecté dans des cellules S16. Les mêmes analyses appliquées à des cellules de motoneurone MN1 ne retrouvaient pas une augmentation de l'expression de la luciférase, témoignant d'une spécificité tissulaire. En effet, la lignée cellulaire S16 exprime les facteurs de transcription Egr2 et Sox10, ce qui n'est pas le cas des MN1.

L'analyse de ces Enhancers (Hung et al. 2015) dans différents états cellulaires des cellules de Schwann (myélinisation, réparation après une lésion nerveuse) retrouvait une organisation extrêmement dynamique de l'épigénome, témoignant d'une régulation fine en fonction de l'environnement transcriptionnel. En effet, les auteurs révélaient des changements majeurs dans l'acétylation des histones H3K27 au niveau des régions régulatrices permettant une balance entre la prolifération cellulaire post-lésionnelle des cellules de Schwann et leur propriété myélinisante une fois la lésion réparée.

Plus récemment, Pantera et al. (2018) étudiait plus en détail cette région, qualifiée de « Super Enhancer » (SE), qui correspond à une région génomique étendue contenant plusieurs Enhancers séparés par moins de 12,5kb.

Les Enhancers présents dans une telle région disposent d'une hypersensibilité à la DNase I, une association marquée à l'histone H3K27 acétylé ainsi qu'une fixation à des facteurs de transcription à des degrés plus élevés que ceux retrouvés dans des Enhancers simples. En général, ces Super-Enhancers sont impliqués dans la régulation de gènes essentiels à l'identité cellulaire.

Pantera et al. ont ainsi mis en place un modèle in vitro de cellules S16 modifiées par le système d'édition génomique CRISPR-Cas9. La délétion, par cette méthode, de 37kb correspondant au Super-Enhancer de *PMP22* (PMP22-SE) montrait une diminution de moitié des transcrits de *PMP22* par rapport aux lignées cellulaires non délétées. Ces résultats étaient en faveur du rôle essentiel de cette région pour une expression complète du gène.

c. Tests génétiques (Southern Blot, MLPA, microsatellites)

On retrouve dans la littérature quelques articles publiés dans la deuxième moitié des années 1990 sur la mise en place de technique d'hybridation fluorescente in situ (FISH) pour le diagnostic moléculaire de la duplication/délétion de *PMP22*. Notamment, Liehr et al. en 1997 étudiait les biopsies de nerf sural de 13 cas de CMT1A ainsi que 6 d'HNPP par la combinaison d'un plasmide pVAW409R1 de 10kb (localisé en 17p11.2p12) et d'un cosmide cRCNeu1 de 30-kb (localisé en 17q11.2). Rautenstrauss de son côté publiait la même année une combinaison de deux cosmides (c74F4 et c112C10) sélectionnés pour leur très bonne spécificité qui se manifestait par l'absence d'hybridation non spécifique.

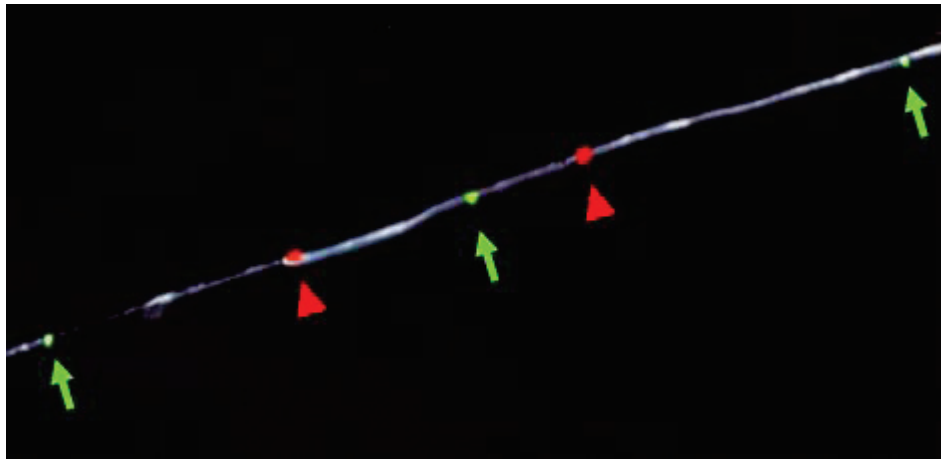


Figure 12 : Image de FISH montrant la duplication en tandem de la région 17p11.2 (Rautenstrauss et al., 1997)

Les signaux représentent les cosmides c74F4 et c112C10

Actuellement, au laboratoire de Neurogénétique du Groupement Hospitalier Est des Hospices Civils de Lyon, le diagnostic de la duplication de *PMP22* est réalisée grâce à l'étude de microsatellites (STR ou Short Tandem Repeat) présents dans la région dupliquée (Latour et al. ; Badano et al., 2001). Ces microsatellites sont des marqueurs hautement polymorphes consistant en une répétition d'une courte séquence nucléotidique (de 2 à 7 paires de bases).

Cette technique met en œuvre l'utilisation de 5 marqueurs amplifiés par PCR (réaction en chaîne à la polymérase) en utilisant un couple d'amorce dont l'une est fluorescente. Les amplicons ainsi formés sont séparés en fonction de leur taille par électrophorèse sur un

séquenceur capillaire. Les produits marqués sont ensuite identifiés par détection fluorescente et analysés sur le programme GeneMapper™ (version 5, Applied Biosystems) pour déterminer la taille des différents allèles.

Les microsatellites employés au laboratoire ainsi que leur séquence nucléotidique répétée et leur marquage fluoresent sont renseignés ci-dessous :

STR	Séquence répétée
2A (D17S2230) (Badano et al.) (noir)	(TTTTC) _n
4A (vert)	(ATCT) ₃ AT(ATCT) ₆ (ACCT) ₅
9A (D17S2227) (bleu)	(CAATA) ₁₄
9B (D17S2226) (bleu)	(TTTC) ₁₂
10A (D17S2224) (vert)	(CAT)(TAT)(CAT) ₄

Tableau 5 : Microsatellites employés dans le diagnostic du CMT1A avec la séquence répétée correspondante

Ci-dessous des exemples d'analyses des microsatellites visualisés sur GeneMapper™ avec un patient normal, un porteur d'une délétion et un patient avec une duplication :

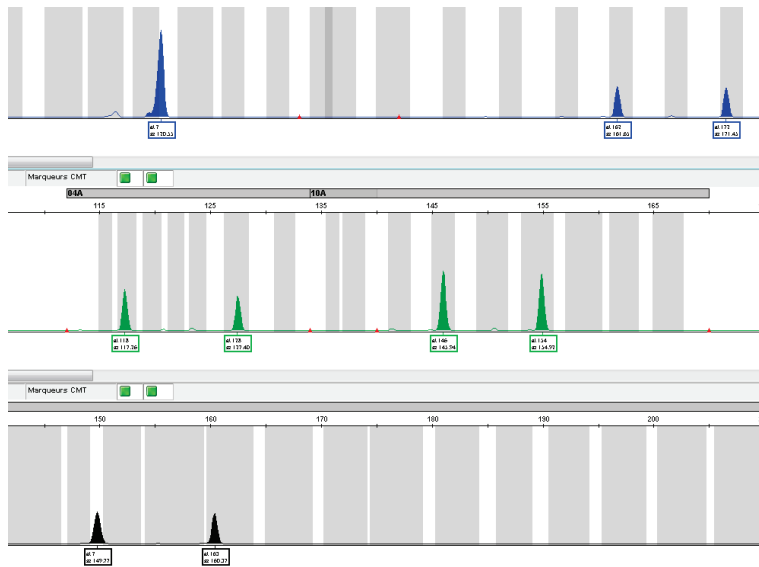


Figure 13A :
 En bleu : STR9B et STR9A
 En vert : STR4A et 10A
 En noir : STR2A
 Patient **normal**

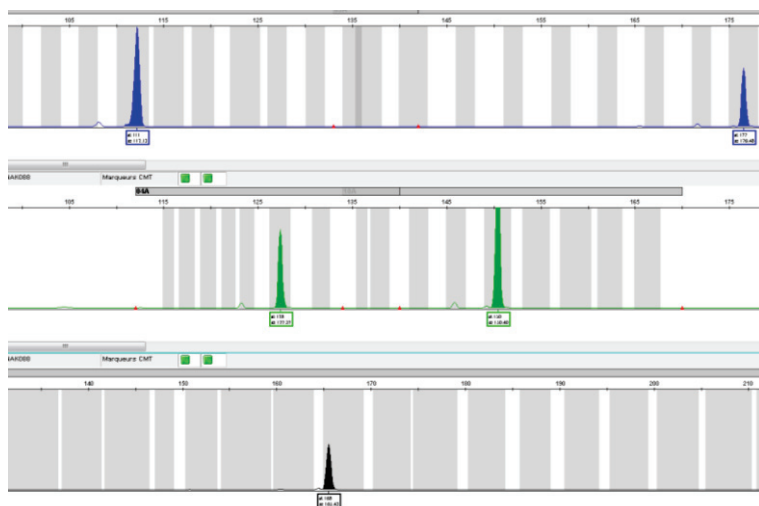


Figure 13B :
 En bleu : STR9B et STR9A
 En vert : STR4A et 10A
 En noir : STR2A
 Patient **délété**

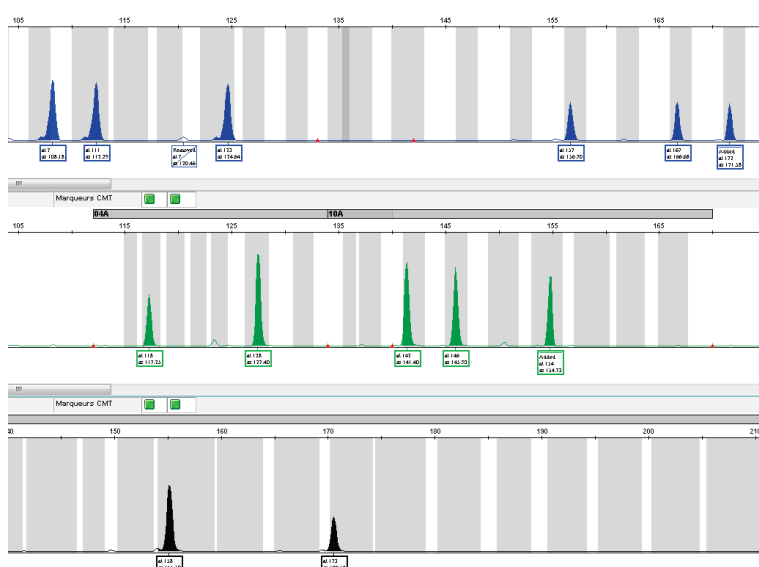


Figure 13C :
 En bleu : STR9B et STR9A
 En vert : STR4A et 10A
 En noir : STR2A
 Patient **dupliqué**

d. Modèles animaux et cellulaires

Il existe actuellement des lignées de souris, Trembler (duplication) et Trembler-J (mutations ponctuelles de *PMP22*) (Suter et al., 1992 – 1993) qui partagent des caractéristiques pathologiques avec les patients CMT1A (Henry et al., 1983). La mutation ponctuelle Leu16Pro présente chez la souris Trembler a d'ailleurs été identifié dans une famille humaine (Valentijn et al., 1992). Cependant, les conséquences cellulaires sont un défaut de conformation protéique dans le cadre d'une mutation ponctuelle versus une surexpression génique dans la majorité des cas de CMT1A (Giambonini-Brugnoli et al., 2005). Dans cette étude, trois types de modèle murins : KO, Trembler (Tr) et avec augmentation du nombre de copies de *PMP22* (*Pmp22tg*) étaient analysés à J4 et J60 post-natal.

Les souris KO pour *PMP22* se démarquaient par une augmentation de l'expression de gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire ainsi que dans la réplication de l'ADN, supportant un rôle de *PMP22* dans la régulation de la prolifération des cellules de Schwann. Les mutants Tr montraient une expression augmentée des gènes impliqués dans la réponse cellulaire au stress. Enfin, une réduction importante d'expression de gènes impliqués dans la synthèse du cholestérol était mise en évidence chez les mutants Tr et *Pmp22tg* à J4, caractéristique qui à J60 concernait également les souris KO.

En ce qui concerne les modèles cellulaires, de nombreuses références sont disponibles dans la littérature et une analyse détaillée des différentes lignées représentait le travail d'étude de Hai et al. (2002), analyse que nous reprenons dans notre matériel et méthode qui a guidé le choix de notre type cellulaire pour réaliser notre protocole de recherche.

e. Essais thérapeutiques (vitamine C, PHARNEXT)

A ce jour, aucun traitement médicamenteux spécifique sur le marché n'a fait la preuve de son efficacité dans le traitement de la maladie de Charcot-Marie-Tooth (Cochrane et al., 2008).

La prise en charge actuelle des patients se doit d'être pluridisciplinaire, impliquant un suivi psychologique régulier, la prévention des complications par l'intermédiaire de kinésithérapie et d'ergothérapie, ainsi que la pratique d'une activité sportive modérée et adaptée aux capacités musculaires. Le maintien de l'autonomie par l'intermédiaire de compensation des déficiences motrices et sensitives ainsi qu'une adaptation du milieu de vie est un élément central de la prise en charge.

Cependant, de nombreuses études ont été entreprises afin d'améliorer la prise en charge de ces patients, et des essais cliniques ont été réalisés ces dernières années (Mathis et al., 2015).

1. Vitamine C

L'acide ascorbique est connu comme étant un régulateur de l'expression génique de *PMP22* par la production d'AMP (Adénosine Mono Phosphate) cyclique qui augmente la production de CREB (cAMP Response Element Binding Protein), agissant comme un facteur de transcription inhibiteur se fixant sur une séquence génomique consensus CRE (cAMP Response Element).

De ce fait, la vitamine C a initialement été testée sur des modèles murins de CMT1A démontrant des effets bénéfiques (Passage et al., 2004).

Entre 2009 et 2013, de nombreux essais cliniques ont été réalisés chez l'Homme et on retrouve ainsi 6 études, revues par Cochrane et al. en 2015, pour un total de 622 patients traités toutes études confondues, employant des doses quotidiennes d'acide ascorbique de 1 à 4 grammes versus placebo, avec une randomisation et une réalisation en double aveugle.

Le critère d'évaluation principal était une amélioration du score CMTNS. Aucune étude n'a mis en évidence une amélioration de ce score clinique après évaluation à 12 et 24 mois, rendant compte de l'absence de l'effet bénéfique de la vitamine C dans le traitement du CMT1A.

2. La place des ARN interférents : essais pré-cliniques

Une étude menée par une équipe chinoise (Lee et al., 2017) testait tout d'abord in vitro l'effet de la transfection d'un petit ARN interférent (siRNA), synthétisé industriellement selon un protocole déjà décrit (Schwarz et al., 2006). Ce siRNA fut ensuite sélectionné selon sa capacité à réduire l'expression luciférase d'un vecteur comportant une copie de *PMP22* contenant la mutation ponctuelle Leu16Pro synthétisé à partir d'une souris Trembler-J.

Au sein d'une lignée de cellules de Schwann de rat RT4, les auteurs démontraient également une augmentation significative de la survie des mutants cellulaires arborant la mutation Leu16Pro après traitement par le siRNA sélectionné (mTr11).

L'étape suivante consistait à tester l'effet de cet ARN interférent in vivo chez des souris Trembler-J directement en intrapéritonéal à 6 jours de vie. L'administration du mTR11 versus un ARN contrôle montrait une nette amélioration des performances et de la réserve de masse musculaire, ainsi qu'une préservation de la structure de la gaine de myéline par rapport à des souris *wild-type* et une réduction des niveaux d'ARN messagers de l'allèle mutant.

Les résultats de cette étude, bien que préliminaires et limités à un modèle animal, ouvrent la voie à des possibilités d'essais thérapeutiques chez l'Homme, à la condition de pouvoir s'émanciper de l'utilisation de vecteurs viraux, potentiellement dangereux en utilisation thérapeutique.

3. Une nouvelle cible d'essai pré-clinique = récepteur P2X7

L'équipe de Nobbio et al. (2009) mesurait, dans des cellules de Schwann issues de modèles de rat CMT1A, une concentration basale de calcium intracellulaire anormalement élevée. Cela était dû à la surexpression d'un gène, *P2X7*, codant pour une protéine canalaire de la famille des récepteurs purinergiques, dont l'expression est dépendante de *PMP22*.

Des tentatives de régulation négative de l'expression par des ARN interférents ou des molécules dirigées contre *P2X7* restauraient les paramètres fonctionnels des cellules de Schwann mutées, établissant un lien de pathogénicité entre la forte concentration de calcium et les fonctions cellulaires altérées.

Ainsi, une équipe italienne (Sociali et al., 2017) testait, lors d'un essai pré-clinique, un antagoniste de *P2X7* (A438079) qui démontrait une amélioration in vitro de la myélinisation dans des cultures de ganglions rachidiens issus de rats CMT1A. Le passage ensuite à l'étude chez l'animal mutant à partir d'injections intrapéritonéales révélait une amélioration significative par rapport à un groupe contrôle. Cette amélioration reposait sur une augmentation de la force musculaire, du nombre d'axones myélinisés ainsi qu'une amélioration de la latence motrice distale à l'ENMG. La tolérance chez l'animal était très bonne, représentant une preuve de principe de l'antagonisation de *P2X7* en tant que potentielle cible thérapeutique.

4. Essai clinique PLEO-CMT, PXT3003

Le PXT3003 est un médicament-candidat développé par la société pharmaceutique PHARNEXT. C'est un pléo-médicament : il est composé d'une association à faibles doses de médicaments existants sur le marché pour d'autres indications (blacofène + naltrexone et sorbitol), sélectionnés pour cibler le réseau de signalisation des RCPG qui inhiberait la transcription de *PMP22*.

Ces trois molécules ont été sélectionnées sur la base d'études précliniques. En effet, les travaux chez des modèles de rats CMT1A montraient une diminution de la protéine PMP22 ainsi qu'une amélioration de la myélinisation et des signes cliniques de la maladie (Chumakov et al., 2014).

Entre 2010 et 2014 se déroulait la phase II de la recherche clinique. Durant cette période, 80 patients atteints de CMT1A léger à modéré, ont été inclus dans une étude randomisée, en double aveugle versus placebo.

L'efficacité du traitement était mesurée sur l'amélioration clinique et électrophysiologique, ainsi que sur les scores ONLS (Overall Neuropathy Limitation Scale) et CMTNS (Attarian et al., 2014). Les résultats montraient une amélioration significative des scores cliniques, de 8% pour le CMTNS et 12.1% pour l'ONLS sous la plus forte dose administrée de PXT3003 sans survenue d'effets indésirables majeurs.

L'essai clinique de phase III pour le PXT3003 a débuté en décembre 2015 pour une durée de 15 mois, incluant 323 patients répartis dans 3 branches : un groupe placebo, un groupe à la même dose que celle administrée pendant la phase II montrant une amélioration significative, et un dernier groupe à deux fois la plus forte dose. Les résultats montraient une forte amélioration de l'ONLS et du test de marche de dix minutes pour le groupe prenant la plus forte dose (Daniel Cohen, présentation CMT France de Novembre 2018). Il est intéressant de noter que les associations de malades inclus dans l'études partageaient sur les forums des témoignages d'une amélioration de leur quotidien avec une diminution des douleurs, des crampes et une marche nettement améliorée.

5. Potentiels biomarqueurs

Un travail récent (Fledrich et al., 2017) soulignait l'importance de critères de mesures, tels que des biomarqueurs, permettant d'évaluer la sévérité de la maladie de Charcot-Marie-Tooth de type 1A ainsi que son évolutivité. Ceci représenterait un outil important permettant d'évaluer les molécules employées lors des essais thérapeutiques actuels et futurs.

Les auteurs ont ainsi réalisé une étude multicentrique impliquant 9 centres cliniques, européens et américains, totalisant 311 patients CMT1A. L'objectif était d'analyser le profil transcriptionnel de 16 potentiels biomarqueurs mis en évidence chez le rat dans leur précédent travail (Fledrich et al., 2012). Une biopsie cutanée était prélevée chez les patients afin d'en extraire l'ARN et de réaliser de la PCR quantitative.

Au total, 8 gènes (*CDA*, *CTSA*, *GRIA*, *ENPP1*, *ANPEP*, *FN3KRP*, *GSTT2*, *PPARG*) parmi les 16 potentiels identifiés montraient un modèle d'expression corrélé à la sévérité de la maladie avec une sensibilité de 90%. Cependant, l'évaluation de la sévérité repose sur un score clinique, le CMTNS, qui est subjectif et donc à même d'être biaisé.

Pour tenter de contrecarrer ce biais, la suite de l'étude s'intéressait à l'évolution temporelle du profil transcriptionnel de ces gènes candidats à partir de données issues d'une biopsie cutanée réalisée précédemment qui était disponible pour 45 des patients inclus.

La combinaison de ces deux conditions permettait aux auteurs de proposer l'utilisation d'un total de 5 gènes candidats comme cibles potentielles de biomarqueurs du CMT1A : *CDA*, *CTSA*, *ENPP1*, *GSTT2* et *PPARG*. Leur implémentation dans les essais cliniques en cours pourrait permettre leur validation en routine.

Partie II : Matériel et Méthodes

1. Sélection des régions d'intérêt

a. Enhancers

Le choix des séquences régulatrices du gène *PMP22* s'est porté sur l'identification dans l'article de Jones et al. (2012) de régions pour lesquelles les auteurs ont réalisé des analyses de CHiP-Seq sur du nerf sciatique de rat P15, riches en cellules de Schwann. Ces analyses retrouvaient des zones bien en amont de *PMP22* et de *Tekt3* où la fixation de EGR2 et SOX10, qui sont des facteurs de transcription largement exprimés dans la cellule de Schwann, était importante. De ces analyses 4 régions se distinguaient = la région A située à -120kb en amont du site d'initiation de la transcription de *PMP22*, la région B à -115kb, la région C à -90kb ainsi qu'une région I3 située à +11kb dans l'intron 3 du gène.

De plus, une analyse en FAIRE (Formaldehyde Assisted Isolation of Regulatory Elements) retrouvait les caractéristiques de séquences régulatrices dans les 3 régions A, B et C, par opposition aux nombreux sites négatifs environnants, et également concernant le contrôle positif, représentée par la séquence dans l'intron 3 à +11kb. Ces caractéristiques reposent essentiellement sur la présence de chromatine ouverte.

Un BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) de ces 4 régions retrouvait une parfaite homologie entre les séquences humaines et celles du rat, nous avons donc déterminé les coordonnées génomiques des 4 Enhancers ainsi que leurs tailles respectives sur la version hg19 du génome humain.

- Enhancer A = Chr17 :15,313,425-15,313,130 → 296 pb (paires de bases)
- Enhancer B = Chr17 :15,309,684-15,309,288 → 397 pb
- Enhancer C = Chr17 :15,281,371-15,280,963 → 409 pb
- Enhancer I3 = Chr17 : 15,151,475-15,151,234 → 242 pb

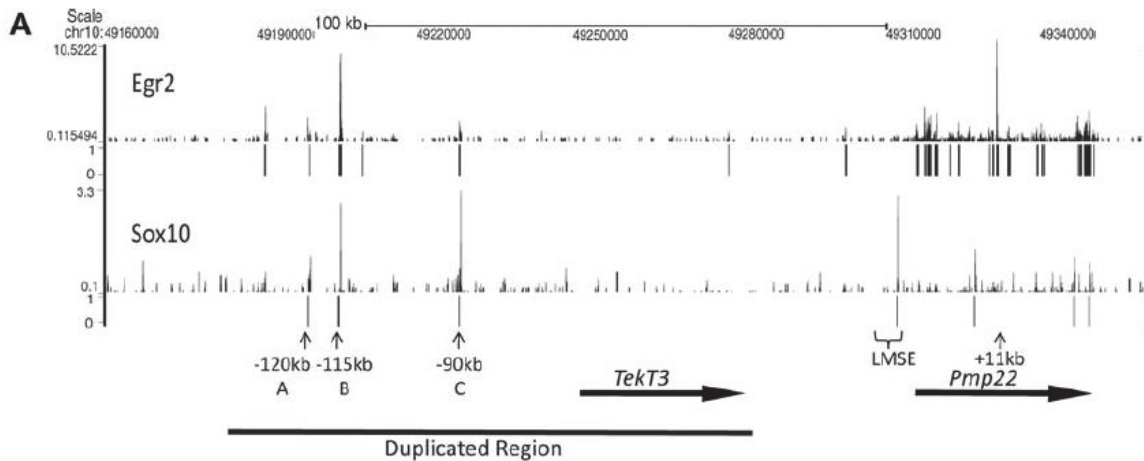


Figure 14 : Résultats d'analyse de ChIP-Seq (Jones et al., 2012) montrant les sites de fixation à EGR2 et SOX dans la région en amont de PMP22

b. Promoteurs

Pour sélectionner les régions promotrices nous nous sommes intéressés au travail de Maier et al. (2003) et leur étude sur la régulation de l'expression de PMP22 dans les cellules de Schwann et dans le neurone sensitif. Ainsi étaient décrits deux promoteurs impliqués dans la formation de transcrits alternatifs variant dans leur partie 5' non traduite avec notamment un exon 1A conduit par le promoteur 1 (ici nommé P1A), spécifique de la cellule de Schwann myélinisante et un exon 1B dirigé par le promoteur 2 (ici nommé P1B), exprimé dans les neurones moteurs et sensitifs, ainsi qu'au niveau du tronc cérébral et du cœur notamment.

Au cours de notre design d'amorce pour ces régions nous avons décidé de borner nos régions promotrices. Pour le promoteur 1A nous nous sommes intéressés à une séquence de 664pb englobant l'exon 1A et sa région 5'. Pour le promoteur 1B, le choix s'est porté sur un fragment de 1,7 kb englobant l'exon 1B et une partie de l'intron 1.

- Promoteur 1A = Chr17 :15,168,944-15,168,281 → 664 pb
- Promoteur 1B = Chr17 :15,167,489-15,165,736 → 1754 pb

2. Choix des plasmides

a. pGL3-Basic Vector de chez Promega®

Afin de réaliser notre étude nous avons sélectionné ce vecteur de 4818 paires de bases (pb) qui contient le gène rapporteur de la luciférase, permettant une analyse quantitative de facteurs influençant l'expression de gènes chez les mammifères.

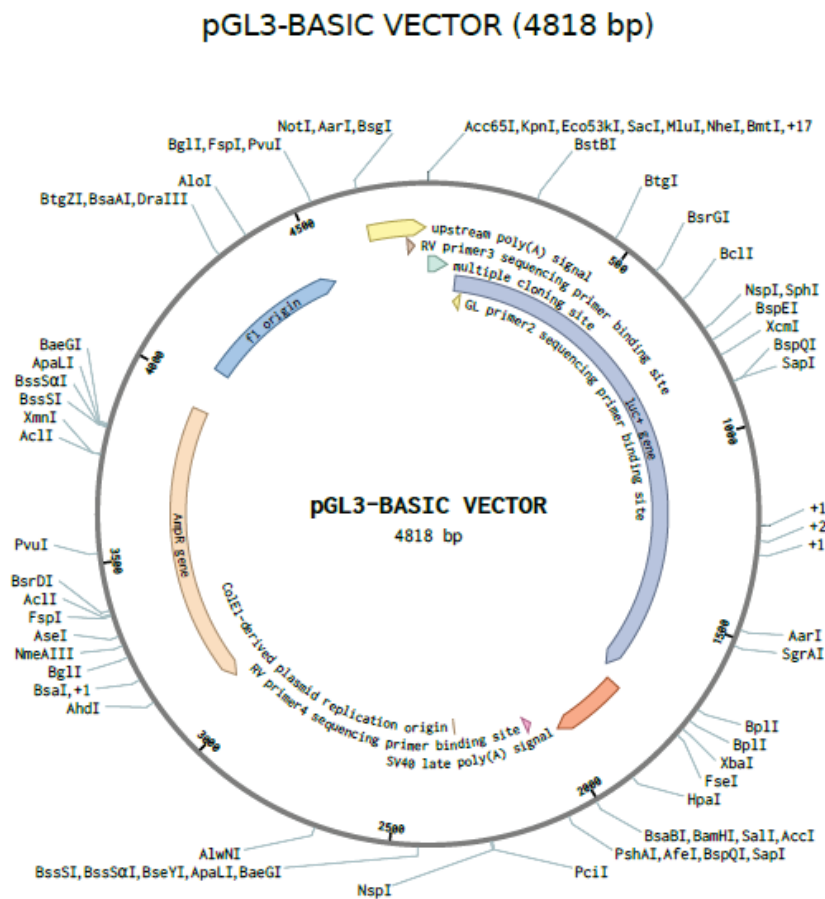


Figure 15 : Squelette du plasmide pGL3-BASIC VECTOR de Promega®

<https://france.promega.com/products/reporter-assays-and-transfection/reporter-vectors-and-cell-lines/pgl3-luciferase-reporter-vectors>

Ce vecteur contient : une cassette comportant le gène *Amp^r* de résistance à l'ampicilline, deux origines de réplifications : la première dérivée de *E. Coli* qui correspond à la 2318^e paire de base et la seconde qui est l'origine f1, dérivée de bactériophages filamenteux, que l'on retrouve entre la 4072^e et la 4527^e paire de base suivie d'une région Multiple Cloning Site (MCS)

regroupant un panel de séquences palindromiques permettant la digestion par des endonucléases, puis la *FireFly luciferase* issue de *Photinus pyralis* (luciole de la famille des *lampyridae*) et enfin une séquence polyA en 3' du gène.

b. pRL-SV40 de chez Promega™

Le plasmide pRL-SV40 a été sélectionné afin de servir de contrôle interne de transfection et pour déterminer un ratio relatif d'expression du signal mesuré de la luciférase.

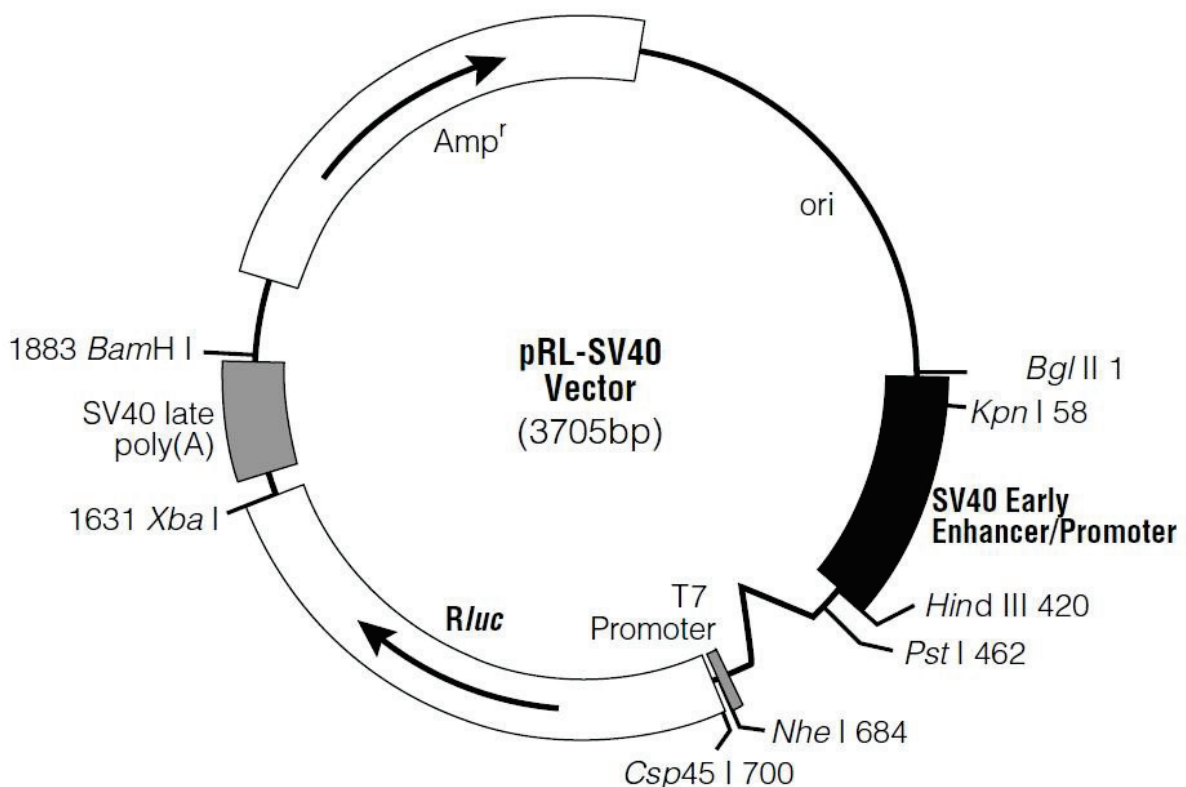


Figure 16 : Squelette du plasmide pRL-SV40 de Promega®

<https://france.promega.com/products/reporter-assays-and-transfection/reporter-vectors-and-cell-lines/prl-renilla-luciferase-control-reporter-vectors/?catNum=E2231>

Ce vecteur de 3705 paires de base contient : une cassette comportant le gène *AmpR* de résistance à l'ampicilline, une origine de réplication, une région promotrice issue du virus simien 40 (SV40) sélectionnée en sa qualité de puissant amplificateur, le gène rapporteur de la *Renilla luciferase* issue de *Renilla reniformis* (espèce de cnidaire au sein de la famille des *Renillidae*) ainsi qu'une séquence polyA en 3' du gène.

3. Protocole de construction de la banque de plasmides

a. Design des amorces

Pour la réalisation de nos constructions plasmidiques nous avons designé nos couples d'amorces spécifiques de nos régions d'intérêt.

Dans ce but nous avons employé un outil de design conçu pour le protocole In-Fusion® par ClonTech® (Société Takara®, <https://www.takarabio.com/learning-centers/cloning/in-fusion-cloning-tools>). Cet outil nous permettait de renseigner la séquence primaire complète du plasmide pGL3 puis de choisir la méthode que nous souhaitions appliquer pour linéariser notre vecteur.

Amorce	Séquence	Taille (pb)	Taille (pb) post insertion
Enhancer A - F	5' - CGATCTAAGTAAGCTCCGACCGCAGCTGAGAAC - 3'	296 + 30 = 326	5117
Enhancer A - R	5' - CCGGAATGCCAAGCTCTTCACGGAGATGGCATT - 3'		
Enhancer B - F	5' - CGATCTAAGTAAGCTTCTCCAAGGAAAGCCATCA - 3'	397 + 30 = 427	5218
Enhancer B - R	5' - CCGGAATGCCAAGCTAGTAGTTTCTGGATCCAG - 3'		
Enhancer C - F	5' - CGATCTAAGTAAGCTTCTGGGACTCCAAGGAG - 3'	409 + 30 = 439	5230
Enhancer C - R	5' - CCGGAATGCCAAGCTCTCAACCATAAAAATCAACTTT - 3'		
P1A - F	5' - CGATCTAAGTAAGCTCAGAATTCAGTGGGAGGG - 3'	626 + 30 = 656	5447
P1A - R	5' - CCGGAATGCCAAGCTCCAGAGTATATATCCACCT - 3'		
P1B - F	5' - CGATCTAAGTAAGCTTCTCCCTGAAAGGTTGATG - 3'	1754 + 30 = 1774	6575
P1B - R	5' - CCGGAATGCCAAGCTAATCACTTACAGCCCAAAGG - 3'		
E13 - F	5' - CGATCTAAGTAAGCTGCTGGGGGAGAAGTTGAA - 3'	242 + 30 = 272	5063
E13 - R	5' - CCGGAATGCCAAGCTTTTCAAAACACATGACCCC - 3'		

Tableau 6 : Séquences des amorces employées dans l'étude, taille des fragments de PCR et taille du plasmide après insertion de la séquence correspondante

Le protocole retenu de linéarisation consistait en une digestion enzymatique dans un premier temps par HindIII pour inclure nos inserts en amont du gène de la *firefly luciferase* au sein du Multiple Cloning Site ou BamH1 pour nos séquences amplificatrices dont le site de restriction est situé en 3' de la luciférase à proximité de la séquence signal polyA (AATAAA).

Enfin il restait à renseigner la séquence génomique de nos différentes régions étudiées. Nos couples d'amorces ainsi générés possédaient une partie de leurs séquences en 5' complémentaire du vecteur afin de permettre une intégration dirigée.

b. Linéarisation des plasmides

Afin de réaliser chaque construction, nous avons utilisé le plasmide pGL3-basic à la concentration de **500 ng/μL** (dosages réalisés sur NanoDrop™ One de Thermo Fischer®, Ref : 13-400-518).

Pour l'insertion de nos séquences en position de promoteur, nous avons réalisé la digestion par l'enzyme HindIII (Roche®, référence Cat. no. 10 656 321 001), à bout cohésif, dont la séquence palindromique reconnue est 5'-AAGCTT – 3'.

Pour l'insertion de nos séquences en position d'Enhancer, nous avons réalisé la digestion par l'enzyme BamHI (Roche®, référence Cat. no. 10 567 604 001), à bout cohésif également, dont la séquence palindromique reconnue est 5' – GGATCC – 3'.

Les deux digestions ont été effectuées selon le protocole fourni par le fabricant.

Afin de vérifier le bon déroulement de la manipulation, une vérification de la digestion sur gel d'agarose à 0,8% nous permettait de contrôler la présence d'une bande unique correspondant au vecteur digéré versus le plasmide circulaire qui sépare 2 formes. L'une, majoritaire, qui migre plus vite que la forme linéarisée, correspond à la configuration super enroulée et la seconde qui migre moins vite que la forme linéarisée et révèle la forme circulaire non super enroulée.

c. Ligation des produits de PCR dans les plasmides linéarisés

L'étape suivante consistait à mettre en présence nos fragments amplifiés par PCR et le plasmide digéré pour réaliser une réaction de ligation en utilisant le kit « In-Fusion » (Ozyme®, Cat. no. 639633) selon le protocole fourni par le fabricant et après détermination de la quantité optimale d'insert et de vecteur (In-Fusion® Molar Ratio Calculator, <https://www.takarabio.com/learning-centers/cloning/in-fusion-cloning-tools/in-fusion-molar-ratio-calculator>)

d. Transformation bactérienne

Nous avons sélectionné pour la transformation des bactéries compétentes *NEB-10 beta* (New England Biolabs®, Cat. N° C3019I)

Ces bactéries sont des souches d'*Escherichia coli DH5 alpha* qui sont très largement décrites dans la littérature (Froger et al., 2007 ; Chan et al., 2013) comme souches les plus efficaces en termes de transformation et qui permettent l'amplification du plasmide intégré.

Le protocole consistait en une incubation dans la glace des bactéries décongelées et du plasmide pendant 30 minutes avant de réaliser un choc thermique de 30 secondes à 42°C suivi immédiatement d'une mise au repos dans la glace de 5 minutes.

Le mix était ensuite placé dans un incubateur agitateur à bactéries 1 heure à 37°C en présence de milieu de culture S.O.C (ThermoFisher®, Cat. no. 15544034) avant d'être étalé sur une gélose contenant du milieu de culture et de l'Ampicilline puis incubé pour une durée de 16-18 heures dans une étuve à 37°C.

e. Screening des clones bactériens

Après une nuit d'incubation nous observions la présence sur nos géloses de colonies bactériennes correspondant à des clones ayant intégré un plasmide contenant la cassette de résistance à l'ampicilline.

Nous avons alors réalisé une étape de screening en piquant entre 6 et 8 colonies par boîte de culture puis en amplifiant par une étape de PCR, utilisant pour chaque condition, les amorces spécifiques du vecteur encadrant les sites de restriction HindIII (Amorce F : 5'-CTAGCAAATAGGCTGTCCC – 3' // Amorce R : 5' – CTTTATGTTTTGGCGTCTTCCA – 3') et BamHI (Amorce F : spécifique de l'insert // Amorce R : 5' – GACGATAGTCATGCCCCGCG -3').

Les produits de PCR obtenus étaient déposés dans des puits d'un gel d'agarose à 1% en présence de SYBR Safe (Invitrogen®, Cat. no S33102) puis soumis à un courant continu de 80V pendant 30 à 45 minutes pour être ensuite révélés sur le Transilluminateur GelDoc XR de Biorad®.

Les clones détectés positifs étaient ensuite incubés en maxi culture bactérienne : 100µL de culture primaire et 100 µL d'ampicilline (Sigma™, Cat. no A0166-5G) à 100mg/mL dans 100 mL

de milieu Luria Bertani , à 37°C, pour la nuit, avec une agitation constante à 220 rotations par minute.

f. Extraction et purification de l'ADN plasmidique

Pour réaliser l'extraction des plasmides de la maxi culture bactérienne nous avons employé le kit PureLink™ HiPure Plasmid Filter Maxiprep 25 (Invitrogen™, Cat. no K210017) qui est une extraction réalisée sur colonne permettant de ne récupérer que l'ADN plasmidique que nous avons ensuite repris dans 200 µL d'eau stérile.

L'ADN purifié était ensuite dilué au 10^e afin d'être dosé sur le NanoDrop™ One (Thermo Scientific™, Cat. ND-ONE-W), puis une étape de dilution nous permettait d'obtenir des plasmides à une concentration finale de 500 ng/µL.

g. Séquençage des plasmides purifiés

Le séquençage de chaque plasmide purifié contenant nos inserts était effectué sur séquenceur capillaire Applied Biosystems™ 3500 selon le protocole en vigueur au laboratoire en utilisant le BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems™ Cat. no. 4337450). Celui-ci est en effet plus indiqué pour le séquençage de plasmide en raison d'un moindre encombrement stérique que le BigDye® Terminator v3.1 Cycle (Applied Biosystems™ Cat. no. 4337455).

Les séquences ainsi obtenues étaient ensuite analysées sur Benchling™ afin de détecter une éventuelle erreur de la polymérase.

4. Constructions plasmidiques

Pour la réalisation de notre travail, nous avons réalisé 18 constructions à partir d'un plasmide pGL3-Basic Vector de Promega™, dans lequel nous avons inséré, en position de promoteur du gène rapporteur de la luciférase ou en position enhancer, différentes combinaisons de nos séquences d'intérêt du gène *PMP22* qui sont présentées ci-dessous (Tableau 7). Nos contrôles positifs étaient représentés par la séquence promotrice de *SH3TC2* ainsi que son Enhancer MCS5 (Multi-species Conserved Sequence 5), décrites dans le travail de Brewer et al. (2014).

Constructions plasmidiques	Séquence position promoteur	Séquence position enhancer
pGL3-vide (Ctrl -)	∅	∅
pGL3-P1A-vide	Promoteur 1A	∅
pGL3-P1A-EA	Promoteur 1A	Enhancer A
pGL3-P1A-EB	Promoteur 1A	Enhancer B
pGL3-P1A-EC	Promoteur 1A	Enhancer C
pGL3-P1A-EI3	Promoteur 1A	Enhancer I3
pGL3-P1B-vide	Promoteur 1B	∅
pGL3-P1B-EA	Promoteur 1B	Enhancer A
pGL3-P1B-EB	Promoteur 1B	Enhancer B
pGL3-P1B-EC	Promoteur 1B	Enhancer C
pGL3-P1B-EI3	Promoteur 1B	Enhancer I3
pGL3-EA-vide	Enhancer A	∅
pGL3-EB-vide	Enhancer B	∅
pGL3-EC-vide	Enhancer C	∅
pGL3-EI3-vide	Enhancer I3	∅
pGL3-vide-EA	∅	Enhancer A
pGL3-vide-EB	∅	Enhancer B
pGL3-vide-EC	∅	Enhancer C
pGL3-vide-EI3	∅	Enhancer I3
pGL3-PSH3TC2 (Ctrl +)	Promoteur <i>SH3TC2</i> (Brewer et al.)	∅
pGL3-MCS5SH3TC2 (Ctrl +)	Enhancer MCS5 (Brewer et al.)	∅

Tableau 7 : Constructions plasmidiques réalisées avec détails des séquences introduites

5. Culture cellulaire

a. Choix du type cellulaire

Dans l'objectif de notre étude nous souhaitons étudier les variations d'expression de la luciférase induites par les séquences régulatrices de *PMP22*. Nous avons ainsi sélectionné un type cellulaire approprié se rapprochant le plus possible des conditions d'expressions in-vivo des gènes impliqués dans le processus de myélinisation.

C'est dans ces conditions que le choix s'était porté sur les cellules S16 de *Rattus Norvegicus* (ATCC ; ref : ATCC-CRL-2941), très utilisées dans l'étude des gènes de la myélinisation et dont les caractéristiques avaient été décrites dans le travail de l'équipe de Hai et al. (2002) qui s'était appliquée à comparer les différentes lignées de cellules de Schwann connues et utilisées en recherche.

Les auteurs comparaient les niveaux endogènes d'ARNm et de protéines de cinq marqueurs des cellules de Schwann (*PMP22*, *PO*, *MBP*, *MAG* et *LNGF-R*) dans les cellules primaires ainsi que dans 6 lignées différentes (RT4-D6P2T, JS-1, RSC96, R3, S16 et S16Y) et dans des extraits de nerf sciatique de rat.

Les résultats permettaient de conclure que les lignées RT4-D6P2T et S16 se rapprochaient le plus des cellules de Schwann primaires et que celles-ci exprimaient les protéines spécifiques de la myéline à un niveau supérieur ou égal à celui détecté dans les cellules primaires. Les auteurs insistaient cependant sur la nécessité d'un choix minutieux de la lignée en fonction de l'expression intrinsèque du gène étudié.

b. Culture cellulaire et entretien

Le milieu employé était du DMEM High Glucose (Dulbecco's modified Eagle's medium, ATCC™, Ref: 30-2002), supplémenté de sérum de veau fœtal à 10% (Eurobio™, Ref : CVFSVF00 0U), 2 mM de L-Glutamine ainsi que de 1% de Pénicilline/Streptomycine 10K/10K (Lonza™, Ref : DE17-602E).

Les cellules étaient cultivées en flasque T25cm² de 50mL (Corning Incorporated™, Ref : 353108) dans 5 mL de milieu de culture à raison de 40 000 ou 80 000 cellules par mL en fonction du nombre de jour de culture (80 000 cellules par mL pour les cultures de 3 jours et

40 000 cellules par mL pour les cultures de 4 jours). Les flasques ainsiensemencées étaient placées à l'étuve à 37°C en présence de 5% de CO₂.

Le temps de doublement cellulaire moyen observé lors de nos expériences était de 28 heures.

Une fois les cellules S16 arrivées à confluence nous les réensemencions après trypsination (Lonza™, Ref : BE17-161F) et lavage au DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, SMDS™, Ref : 710545), puis comptage automatique des cellules à l'aide d'une AccuChip (Science Tec™, Ref : AD2K-200) au compteur ADAM-MC (NanoEnTek Inc™) après une étape de coloration par AccuStain Solution™. Le domaine de mesure du compteur cellulaire selon la notice fournisseur était compris entre 10⁴ et 10⁷ cellules par mL.

c. Protocole de co-transfection pGL3 + pRL-SV40

Après une étape de trypsination comme décrit ci-dessus nousensemencions une plaque de culture cellulaire blanche à fond transparent stérile de 96 puits (Greiner™, Ref : 655098) à raison de 8000 cellules / puits.

Le milieu de culture était changé au minimum 1 heure avant la transfection le jour suivant.

Nous avons réalisé la transfection à l'aide du kit FuGENE HD Transfection (Promega™, Ref : E2311). Une phase d'optimisation était nécessaire afin de déterminer la quantité optimale de plasmide test et contrôle ainsi que de FuGENE à incorporer pour obtenir la meilleure efficacité de transfection.

La première étape consistait à préparer un mix pour chacun des puits de culture contenant 200ng de plasmide test et 1ng de plasmide contrôle dans du milieu DMEM High Glucose non supplémenté et 0,6 µL de FuGENE (correspondant à un ratio FuGENE / ADN plasmidique de 3:1) ajouté après agitation. La durée d'incubation avant la mise au contact du tapis cellulaire était de 20 minutes.

Une fois la mise en contact effectuée nous effectuons une observation au microscope par réfringence de la présence de complexe de transfactions dans les puits sous la forme de gouttelettes lipidiques mobiles dans le milieu de culture.

d. Sélection de vecteurs contrôles positifs et négatifs

Afin de pouvoir comparer le signal de luminescence de nos différentes constructions plasmidiques nous avons utilisé comme contrôle positif un plasmide pGL3 contenant la région promotrice du gène *SH3TC2*, impliqué dans la maladie de Charcot-Marie-Tooth de type 4C, à transmission autosomique récessive, étudiée dans le travail de Brewer et al. (2014). En effet, dans leur étude, les auteurs ont réalisé la transfection de cellules S16 avec des plasmides comportant la région promotrice du gène ou 1 des 6 régions très conservées parmi les espèces, situées en aval de la partie codante (dénommées MCS pour Multi-Species Conserved Sequences). Les résultats retrouvaient ainsi une augmentation significative ($p \leq 0,001$) du signal de la luciférase de 30 fois comparée au signal émis par le plasmide vide contrôle.

Nous avons utilisé pour notre étude le même plasmide vide pGL3-Basic Vector en guise de contrôle négatif. Ce contrôle nous permettait d'effectuer la normalisation des ratios d'expression obtenus pour chaque expérience indépendante.

6. Méthode d'analyse par luminescence de l'activité luciférase : Dual-Glo® Luciferase Assay System (Promega™)

A 72h post transfection, la plaque de culture 96 puits était retirée de l'étuve et nous éliminions au maximum le milieu de culture par aspiration tout en veillant à ne pas rentrer en contact avec le tapis cellulaire.

Un mix de 150 μ L contenant du réactif Dual-Glo® Luciferase (Ref = E2920) et du DMEM en proportion égale était ensuite distribué dans chaque puits, avant une incubation à température ambiante de 20 minutes sur un agitateur de plaque à 500 rotations par minute.

La mesure de l'activité *Firefly luciferase* était ensuite réalisée sur l'automate Victor X4 Multimode Plate Reader de Perkin Elmer™ par une mesure pour chaque puits de la luminescence en point final (lecture à 5 secondes).

Pour mesurer ensuite l'activité *Renilla luciferase*, nous avons stoppé l'activité *Firefly* grâce au réactif Dual-Glo® Stop & Glo® du même kit, qui dans le même temps, fourni le substrat nécessaire à la mesure de la *Renilla luciferase*. L'étape d'incubation et la mesure de la luminescence était identique à celle réalisée pour la *Firefly luciferase*.

Pour chacune des étapes de mesure, le fournisseur recommandait une analyse effectuée dans les 2 heures après la mise en contact du substrat avec les échantillons. Toutes nos expériences ont été réalisées en accord avec les recommandations de Promega™.

Cette double mesure nous permettait de calculer un ratio normalisé de la luminescence *Firefly* / *Renilla luciferase* pour chaque échantillon, auquel nous soustrayions la luminescence observée dans des blancs cellulaires, correspondant au bruit de fond.

7. Identification de variants

a. Analyse des régions d'intérêt par séquençage haut débit (NGS)

Les études en séquençage haut débit au laboratoire sont réalisées par la technologie Illumina™. Dans ce but un panel de gène est élaboré à partir des séries phénotypiques OMIM concernant le Charcot-Marie-Tooth.

Les sondes de captures sont désignées par la société Roche. Parmi les gènes déjà intégrés au panel nous avons décidé lors de la dernière révision courant 2018 de rajouter les régions génomiques concernant les régions régulatrices de *PMP22*.

b. Cohorte de patients

Entre Septembre 2018 et Novembre 2019, nous avons réalisé 7 séries d'analyse génétique par séquençage à haut débit, représentant une cohorte de 168 patients atteints de neuropathie périphérique à priori d'origine génétique, adressés pour un diagnostic moléculaire. Cette cohorte ne comportait pas de patients présentant une duplication ou une délétion de *PMP22*.

8. Analyses statistiques

Pour la réalisation de nos tests statistiques nous avons employé le logiciel R avec la librairie dplyr. Un boxplot nous permettait d'évaluer la distribution des valeurs obtenues par nos rapports expérimentaux.

Dans la validation de nos expériences, après vérification de la distribution normale de nos valeurs ainsi que le respect de l'hypothèse d'homoscédasticité, nous avons réalisé un ANOVA pour nos comparaisons de variance.

Parmi les expériences pour lesquelles nous n'avons pas pu analyser les données selon ce modèle prédéfini à cause d'un trop faible nombre de valeurs, nous avons réalisé un test de Mann-Whitney-Wilcoxon afin de pooler les valeurs obtenues pour une même condition, puis nous avons entrepris un test de Student.

Dans l'analyse des variants du promoteur P1A, la réalisation de tests multiples nous a amené à corriger les *p-values* par la méthode d'ajustement de Bonferroni.

Partie III : Résultats expérimentaux

1. Séquences Enhancers isolées

a. En position de promoteur

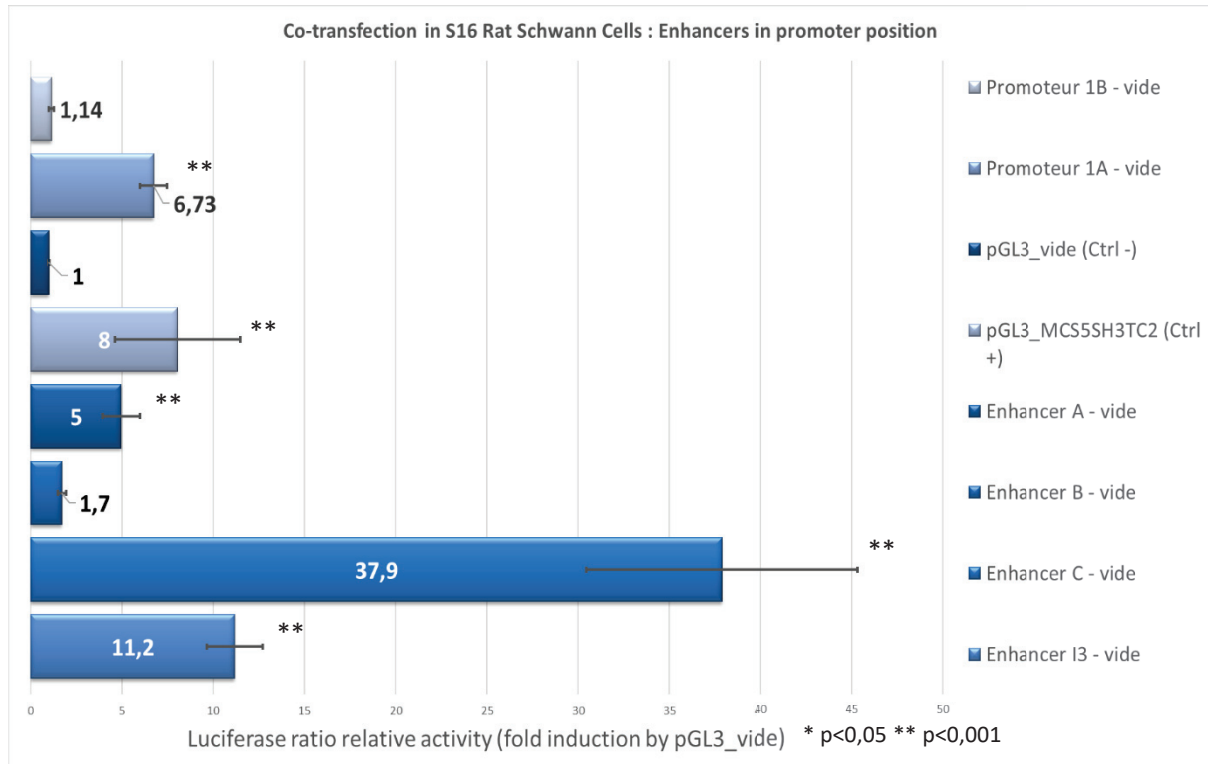


Figure 17 : Activité des séquences Enhancers isolées en position de promoteur

Les valeurs représentent le ratio Firefly/Renilla luciférase, la normalisation des ratios est effectuée par rapport au plasmide vide

Les Enhancer C et Enhancer I3 présentent une capacité à diriger l'expression de la luciférase, respectivement à **38** (30-45) et **11** (9,5-12,5) fois, lorsqu'elles sont placées en position de promoteur, à un niveau supérieur de ce qui est retrouvé pour les séquences promotrices seules.

La séquence du promoteur 1B ne montre pas la capacité d'induire seule l'expression du gène rapporteur (0,98-1,3). Les valeurs retrouvées pour le promoteur 1A (6,73 ; 6-7,4) montrait une activité minimale de cette séquence à des niveaux équivalents au contrôle positif.

b. En position d'Enhancer

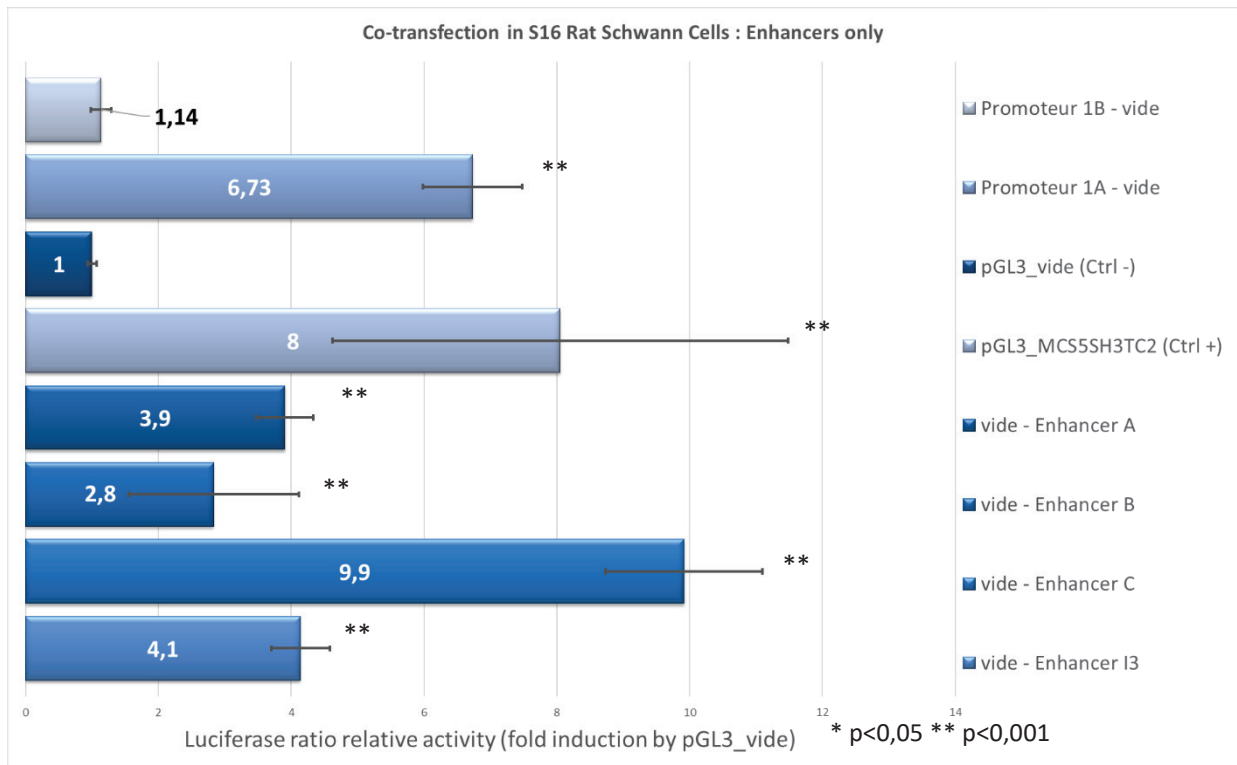


Figure 18 : Activité des séquences Enhancers isolées en position d'Enhancer

Les valeurs représentent le ratio Firefly/Renilla luciférase, la normalisation des ratios est effectuée par rapport au plasmide vide

Dans cette même expérience, parmi les séquences régulatrices, placées dans la région 3' de la queue polyA de la luciférase en position d'Enhancer, seul l'Enhancer C démontrait une capacité significative à induire une augmentation de l'expression **10** fois (8,8-11) supérieure au plasmide vide.

2. Etude des séquences promotrices

a. Promoteur 1A : seul et en combinaison

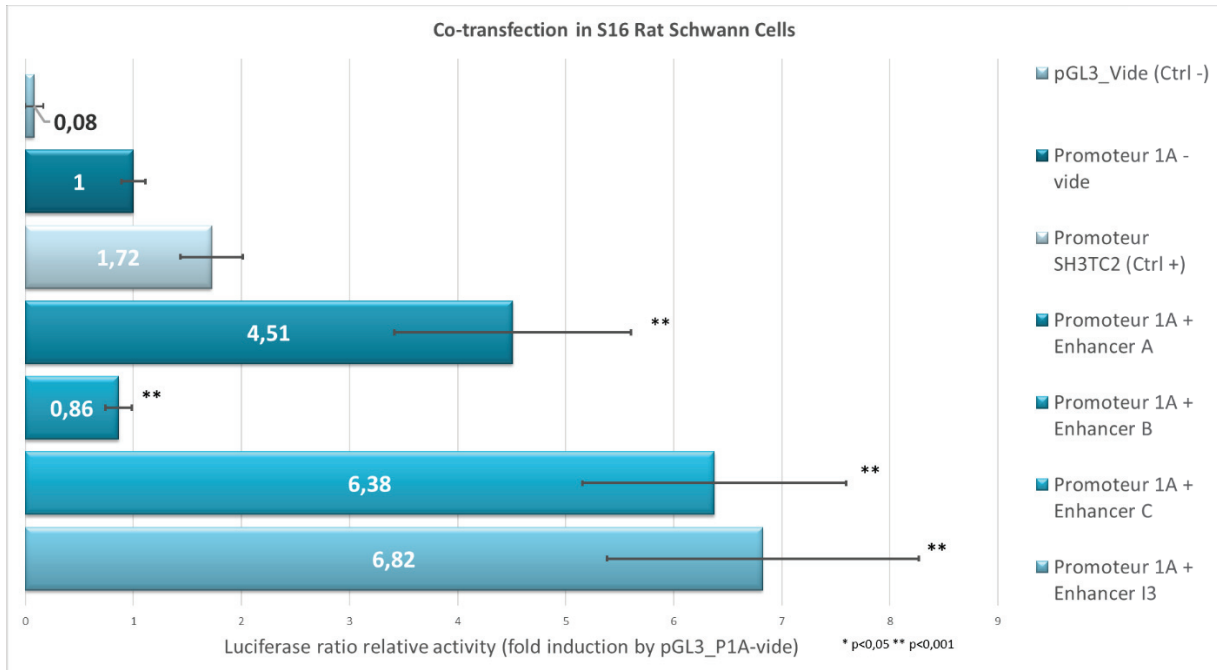


Figure 19 : Activité de la séquence du promoteur 1A seul et en combinaison

Les valeurs représentent le ratio Firefly/Renilla luciférase, la normalisation des ratios est effectuée par rapport au promoteur 1A seul

Le niveau d'expression du contrôle positif étudiant le promoteur de *SH3TC2* était retrouvé à des niveaux similaires à ce qui était décrit dans le travail de Brewer et al. (2014), à 21 fois la valeur du plasmide vide.

Les résultats montraient une augmentation statistiquement significative ($p < 0,001$) de l'expression luciférase pour les constructions contenant les Enhancer A, C et E13 associées au promoteur 1A par rapport à la séquence promotrice seule. Cette augmentation de l'expression sur la totalité des 3 expériences indépendantes était de **4,51** fois (3,41-5,61) pour l'Enhancer A ; **6,38** fois (5,16-7,6) pour l'Enhancer C et **6,82** fois (5,38-8,26) pour l'Enhancer I3.

Le plasmide contenant la région correspondant à l'Enhancer B montrait une réduction significative du signal mesurée à **0,86** fois (0,74-0,98).

b. Promoteur 1B : seul et en combinaison

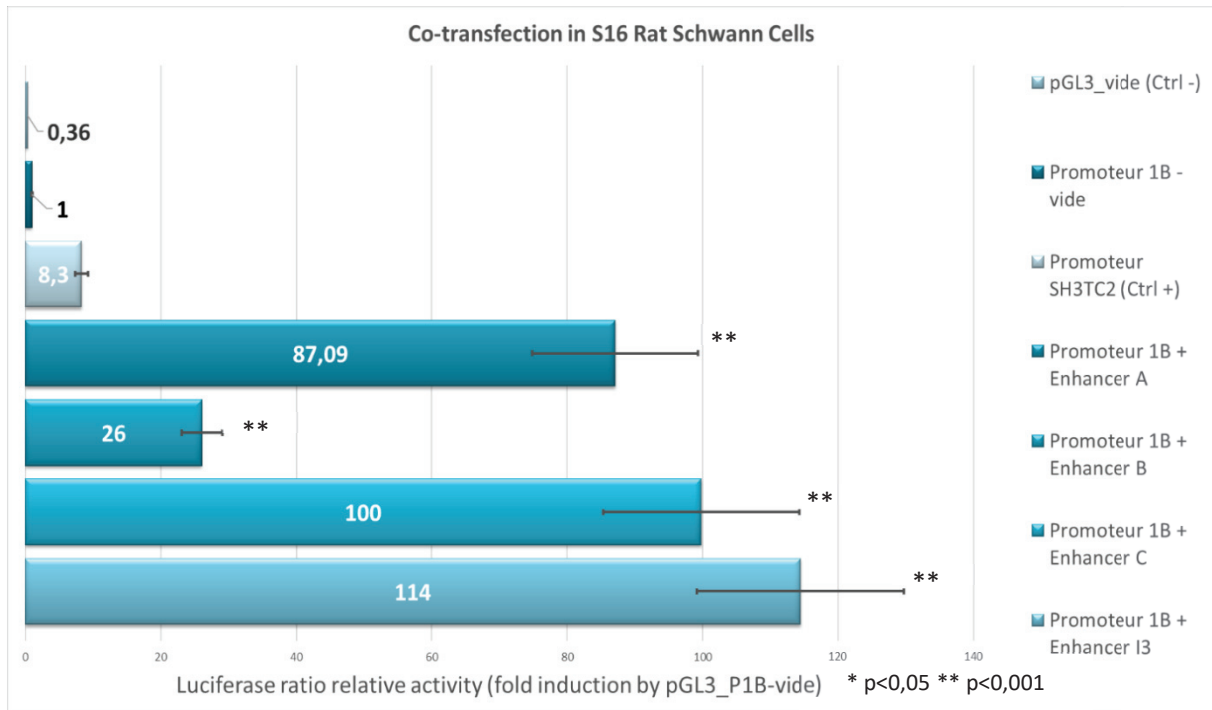


Figure 20 : Activité de la séquence du promoteur 1B seul et en combinaison

Les valeurs représentent le ratio Firefly/Renilla luciférase, la normalisation des ratios est effectuée par rapport au promoteur 1B seul

Le profil d'expression était comparable à nos expériences concernant le promoteur 1A.

L'**Enhancer B** montrait l'augmentation la plus faible de la série à **26** fois le niveau du promoteur seul. En ce qui concerne les **Enhancer A, C et I3**, l'activité de la luciférase était mesurée à environ **100** fois celle retrouvée en l'absence de région régulatrice avec le promoteur 1B.

3. Analyse de la cohorte de patient

a. Couverture des régions ajoutées au panel de gène

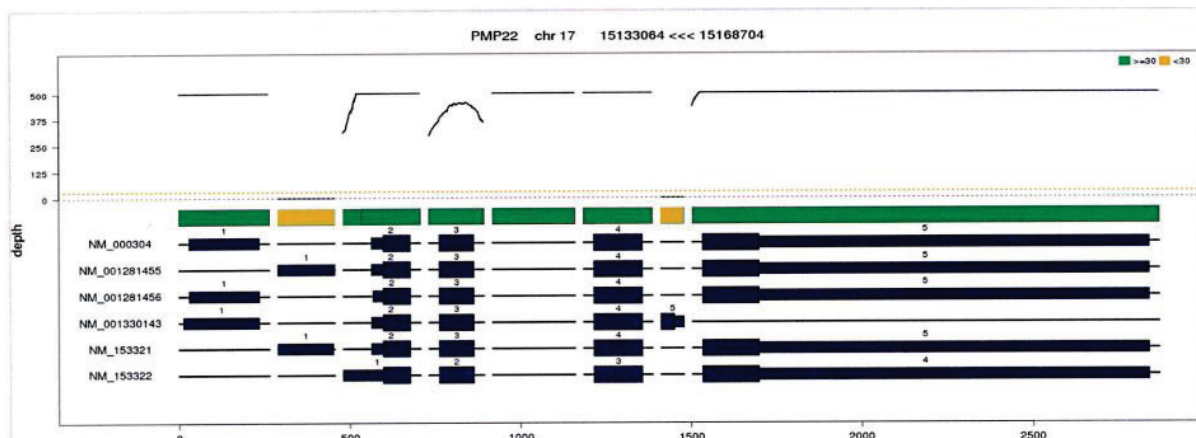


Figure 21 : Couverture moyenne du gène *PMP22* issue du panel NGS des neuropathies périphériques

##samples:			min	mean	%>=30X	
chr17	15133063	15134427	PMP22:NM_000304:exon5	435	893.8	100%
chr17	15142757	15142958	PMP22:NM_000304:exon4	513	643.3	100%
chr17	15151234	15151475	PMP22_Enhancer_I3	567	907.8	100%
chr17	15162380	15162540	PMP22:NM_000304:exon3	297	409	100%
chr17	15163936	15164108	PMP22:NM_000304:exon2	541	745.3	100%
chr17	15168440	15168704	PMP22:NM_000304:exon1.NC	565	782.9	100%
chr17	15280963	15281371	PMP22_Enhancer_C	533	787.2	100%
chr17	15309288	15309684	PMP22_Enhancer_B	383	784.1	100%
chr17	15313130	15313425	PMP22_Enhancer_A	547	852.7	100%

Tableau 8 : Couverture moyenne des régions d'intérêt issues des données du panel NGS des neuropathies périphériques

L'analyse de la couverture dans les runs de NGS montre une excellente couverture des régions régulatrices que nous avons rajouté dans le panel, en moyenne de 500X et 100% des séquences avec une couverture supérieure à 30X.

L'exon 1 du transcrit NM_001281455, qui correspond au transcrit alternatif 1B, n'est en revanche pas couvert.

b. Résultats de séquençage des régions régulatrices

Entre Septembre 2018 et Mars 2019, 168 patients ont bénéficié d'une analyse à visée diagnostique reposant sur le séquençage haut débit d'un panel de gènes définis grâce aux séries phénotypiques OMIM.

Les résultats limités aux séquences étudiées dans ce travail sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Séquence régulatrice	Variant	dbSNP	Fréquence gnomAD			Occurrence
			All	Afr	Europe	
Enhancer B	Chr17:g.15309414C>T	rs75832742	All = 0,004 (1/250)	Afr = 0,014 (1/72)	Europe = 0,00032 (1/3125)	2/168
Enhancer C	Chr17:g.15280985A>G	rs16951428	All = 0,048 (1/21)	Afr = 0,10 (1/10)	Europe = 0,029 (1/34)	12/168
Enhancer C	Chr17:g.15280986C>A	rs181667154	All = 0,019 (1/52)	Latino = 0,05 (1/20)	Europe = 0,027 (1/37)	8/168
Enhancer C	Chr17:g.15281032T>A	rs113035304	All = 0,005 (1/200)	Afr = 0,019 (1/52)	Europe = 0,0009 (1/1111)	1/168
Enhancer C	Chr17:g.15281336T>C	rs112733234	All = 0,005 (1/200)	Afr = 0,019 (1/52)	Europe = 0,0009 (1/1111)	1/168
Enhancer I3	Chr17:g.15151470C>T	∅	∅	∅	∅	1/168
Promoteur 1A	Chr17:g.15168522T>G	rs140650630	All = 0,008 (1/125)	Afr = 0,029 (1/34)	Europe = 0,00025 (1/4000)	1/168
Promoteur 1A	Chr17:g.15168577G>C	rs560442424	All = 0,002 (1/500)	Afr = 0,006 (1/167)	Europe = 0,000058 (1/17241)	1/168

Tableau 9 : Variants identifiés par analyse NGS sur une cohorte de 168 patients

Les informations concernant chaque variant ont été récupérées sur la base de données publique gnomAD (<https://gnomad.broadinstitute.org>, version du génome humain GRCh37 / hg19).

Le variant dans l'Enhancer C **g.15280986C>A** était retrouvé associé au variant **g.15280985A>G** chez les 8 patients identifiés.

Les variants **g.15281032T>A** et **g.15281336T>C** dans l'Enhancer C étaient présents chez le même patient.

Seul le variant **g.15151470C>T** dans l'Enhancer I3 était inconnu des bases de données publiques.

L'analyse des données récupérées sur la base gnomAD concernant la fréquence des allèles dans les différentes populations contrôles nous permet d'identifier des allèles relativement

fréquents dans les populations Africaine/Afro-Américaines avec des fréquences comprises entre 0,6 et 10%.

Concernant la population Caucasienne, la plupart des allèles sont assimilés à des variants rares de fréquence $<1/1000$ hormis les 2 polymorphismes présents dans l'Enhancer C.

Dans le cadre de cette étude, nous avons écartés les polymorphismes de notre analyse et nous sommes concentrés sur les variants rares.

Nous avons donc étudié les patients présentant le variant **g.15309414C>T** de l'Enhancer B, l'association **g.15281032T>A** et **g.15281336T>C** dans l'Enhancer C ainsi que les deux variants identifiés dans la région du promoteur 1A (**g.15168522T>G** et **g.15168577G>C**).

Nous n'avons pu étudier le variant inconnu identifié dans l'Enhancer I3. En effet, l'analyse de séquence retrouvait ce variant au sein de l'amorce que nous avons désigné pour notre étude, ne nous permettant pas de pouvoir produire une construction plasmidique contenant la séquence modifiée.

4. Etude *in vitro* des variants d'intérêt identifiés

a. Variant identifié dans l'Enhancer B = g.15309414C>T

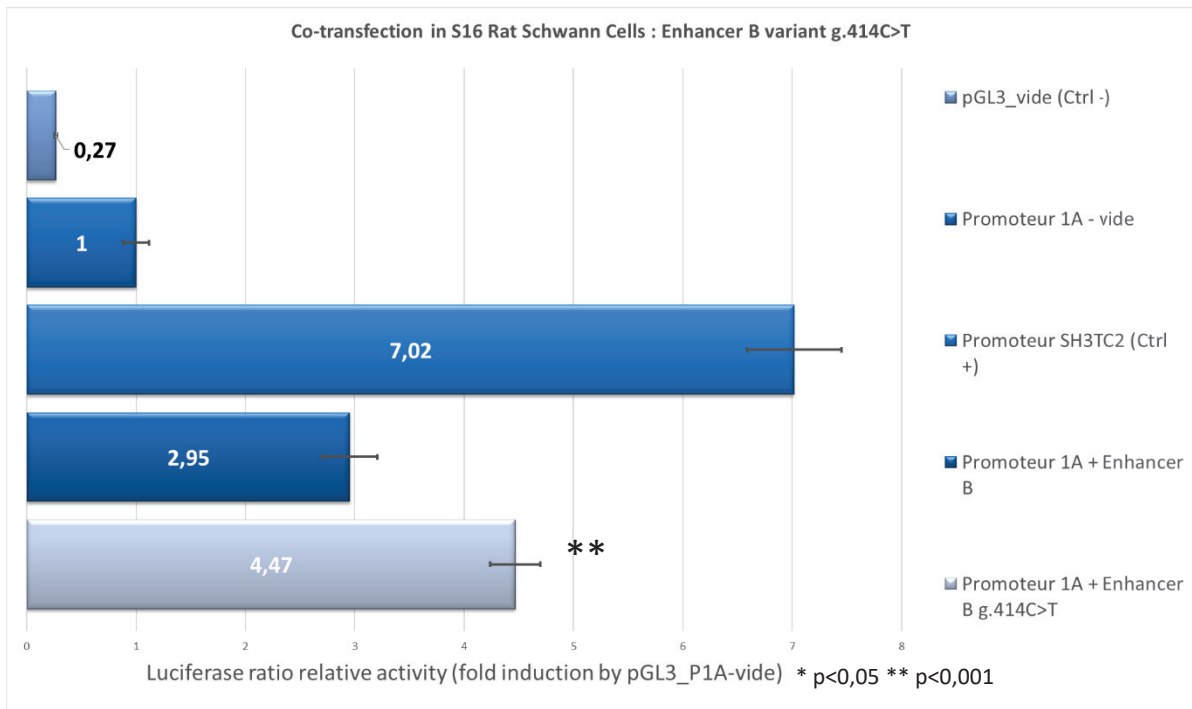


Figure 22 : Activité de l'Enhancer B comprenant le variant g.15309414C>T

Les valeurs représentent le ratio Firefly/Renilla luciférase, la normalisation des ratios est effectuée par rapport au promoteur 1A seul

Le variant présent dans l'Enhancer B entraîne une augmentation du signal mesuré de la luciférase de **50%**, statistiquement significative ($p=0,00001$), par rapport à la séquence wild-type. L'activité de la combinaison du promoteur 1A avec l'Enhancer B est cependant inférieure au signal mesuré concernant le contrôle positif constitué par le promoteur seul de *SH3TC2*.

b. Variants identifiés dans l'Enhancer C = **g.15281032T>A** et **g.15281336T>C**

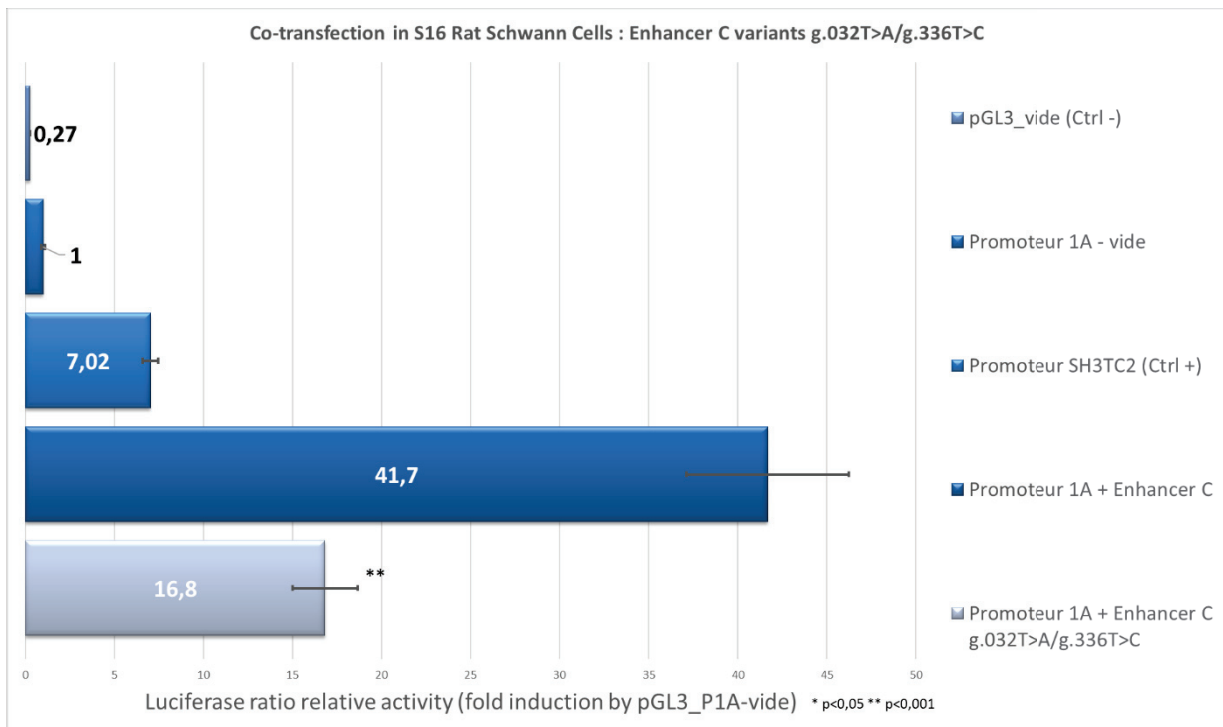


Figure 23 : Activité de l'Enhancer C comprenant les variants g.15281032T>A et g.15281336T>C

Les valeurs représentent le ratio Firefly/Renilla luciférase, la normalisation des ratios est effectuée par rapport au promoteur 1A seul

Les effets de la présence de ces deux variants dans la séquence régulatrice montraient une diminution significative ($p < 0,00001$) du signal luciférase mesuré de plus de **2 fois** par rapport à la construction comportant la séquence wild-type.

c. Etude fonctionnelle des variants **g.15168522T>G** et **g.15168577G>C**
(Promoteur 1A)

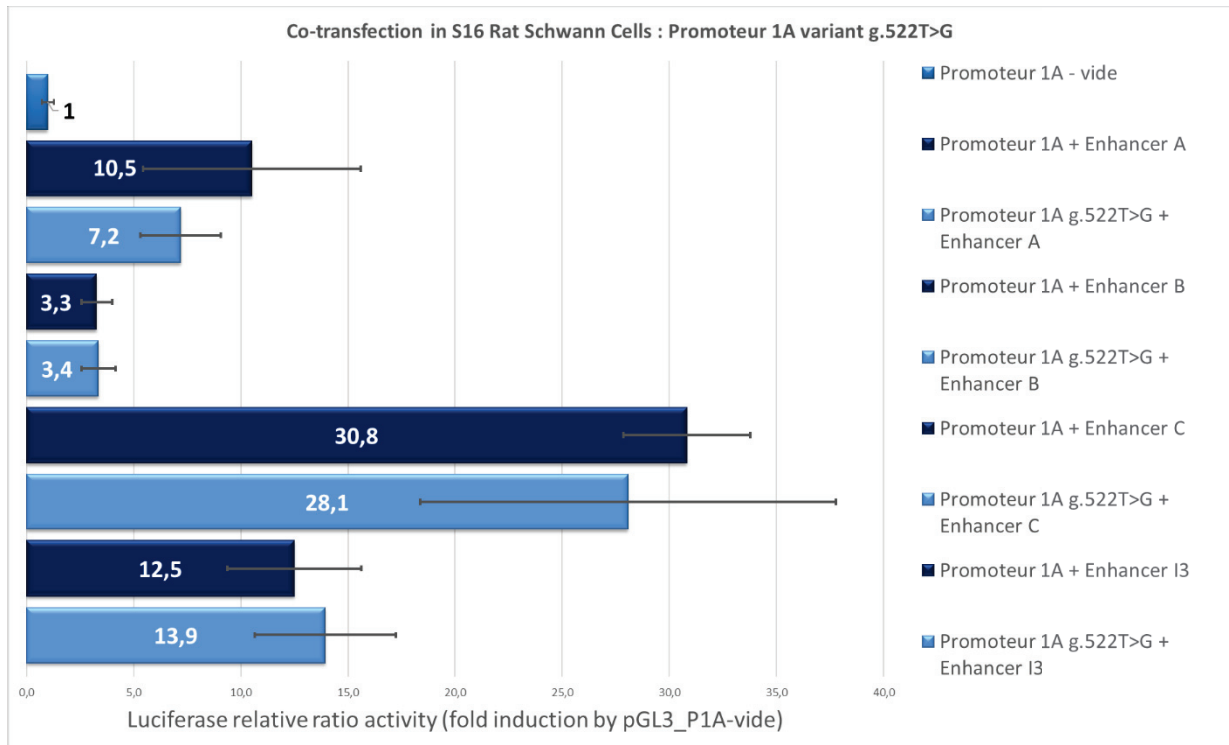


Figure 24 : Activité du promoteur 1A comprenant le variant g.15168522T>G

Les valeurs représentent le ratio Firefly/Renilla luciférase, la normalisation des ratios est effectuée par rapport au promoteur 1A seul

En bleu foncé sont représentés les ratios concernant la séquence WT, en bleu ciel les ratios concernant la séquence mutée

Le variant **g.15168522T>G** dans la séquence promotrice 1A ne montre pas d'effet sur l'expression de la luciférase. Les valeurs de luminescence observées ne présentent pas de différences significatives par rapport à la séquence promotrice WT.

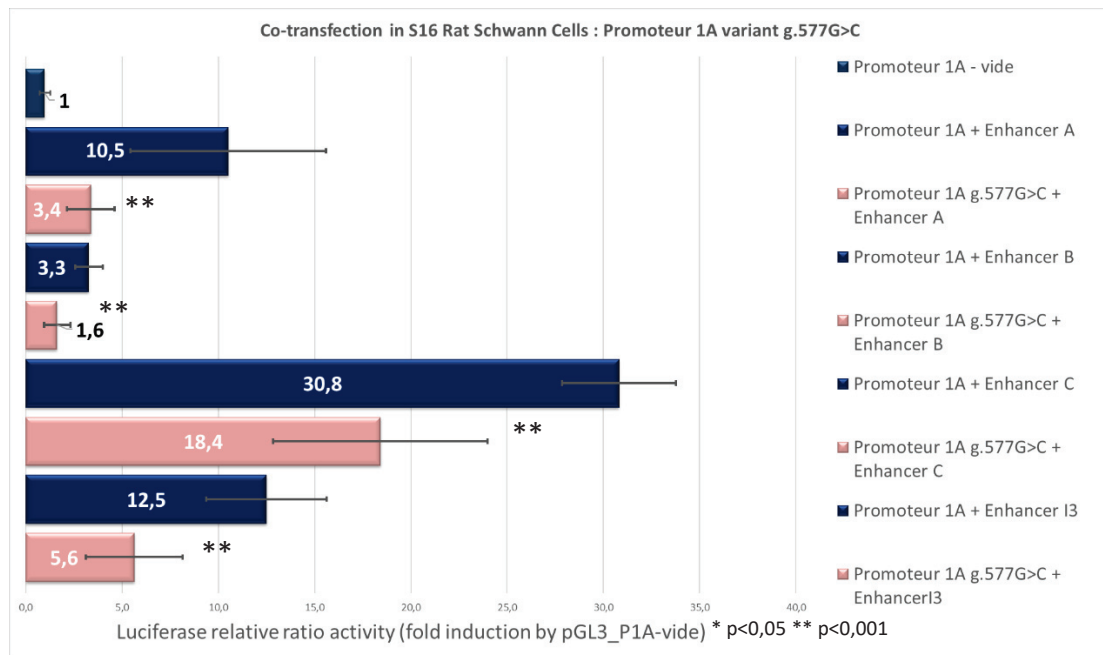


Figure 25 : Activité du promoteur 1A comprenant le variant g.15168577G>C
 Les valeurs représentent le ratio Firefly/Renilla luciférase, la normalisation des ratios est effectuée par rapport au promoteur 1A seul
 En bleu foncé sont représentés les ratios concernant la séquence WT, en rose les ratios concernant la séquence mutée

L'analyse du variant **g.15168577G>C** retrouve, dans chacune des constructions combinées du promoteur avec une de ses séquences régulatrices, une diminution significative d'environ **50%** de la luminescence émise.

Partie IV : Discussion

La maladie de Charcot-Marie-Tooth est la neuropathie périphérique héréditaire d'origine génétique la plus fréquente, avec une prévalence estimée à 1/2500 (Skre et al., 1971). Au sein de cette entité clinique, la microduplication en tandem de 1,5 Mb de la région du Chr17p11.2 contenant *PMP22* est l'anomalie génétique la plus fréquemment retrouvée, chez 50% des patients, et responsable de la forme clinique typique démyélinisante du CMT1A. La délétion réciproque de la même région est, elle, responsable de la neuropathie tomaculaire ou neuropathie périphérique héréditaire par hypersensibilité à la pression (HNPP). Dans la population Française, on estime à 30 000 le nombre de patients atteints d'une maladie de Charcot-Marie-Tooth, soit environ 15 000 patients porteurs d'une duplication de *PMP22*, et 15 000 porteurs d'une délétion.

Malgré sa place de gène majeur de la pathologie, il reste encore de nombreuses inconnues concernant *PMP22*, comme la structure cristallographique de la protéine qui n'a jamais pu être déterminée. De la même manière, il est admis que la pathologie, en dehors des rares mutations ponctuelles, est liée à un dosage génique, dans le cas de la microduplication et la microdélétion, correspondant respectivement à 150% et 50% de la normale. Cependant, il n'existe pas de valeur seuil à partir de laquelle une expression pathologique apparaît. L'existence de nombreux patients cliniquement asymptomatiques à l'intérieur de ces deux catégories (patients CMT1A et HNPP respectivement) ouvre la question de potentiels mécanismes qui pourraient être compensateurs. Ce domaine d'étude, encore trop peu renseigné, présente pourtant un intérêt majeur dans la compréhension de la variabilité d'expression clinique associée à une même atteinte génétique. Une des hypothèses de notre travail est que la présence du CNV récurrent, en gain ou en perte, associé à des variants dans les régions régulatrices entraîne un effet additif, positif ou négatif, sur l'expression du gène. Ce type de régulation pourrait nous éclairer sur des mécanismes ou effet de seuil que nous avons tendance à interpréter comme de la pénétrance incomplète.

La description récente (Weterman et al., 2010) de la duplication d'une région intergénique de 168kb, en amont de *PMP22* mais n'incluant pas le gène, comme responsable d'un phénotype clinique typique de CMT1A, mettait en lumière le rôle pathogène joué par les régions génomiques non codantes dans la régulation de l'expression. Ce nouveau champ d'étude a amené, quelques années plus tard, (Jones et al., 2011-2012) à la mise en évidence et la

caractérisation de trois séquences régulatrices potentielles présentes dans cette région, dénommées Enhancers A, B et C, situés à environ 100kb en amont de *PMP22*, ainsi que l'Enhancer I3, localisé dans l'intron 3 du gène.

Dans l'étude de Pantera et al. (2018), les auteurs réalisaient, *in vitro*, par utilisation de l'outil d'édition génomique CRISPR-Cas9, une délétion d'une région de 38kb qualifiée de « Super Enhancer » dans des cellules S16, contenant l'ensemble des séquences étudiées dans notre travail. Leur étude permettait de retrouver une diminution de 50% de la quantité de transcrite de *PMP22* dans les cellules délétées, rendant compte de la nécessité de toute cette région pour une expression complète du gène. Ceci représente des résultats importants dans l'étude des régions régulatrices mais ne rend pas compte du rôle indépendant de chaque séquence dans la synergie avec le promoteur, qui est un des objectifs de notre travail. De même, la revue de la littérature concernant les séquences régulatrices de *PMP22* n'a pas mis en évidence de travail permettant de donner un ordre de grandeur à la capacité des Enhancers à moduler l'expression d'un gène rapporteur en synergie avec une séquence promotrice. Enfin, l'analyse isolée des Enhancers de *PMP22* dans un modèle *in vitro* n'a jamais été testée, ce qui fait de l'objet de notre étude un sujet original et fonctionnel.

Le choix de l'utilisation des cellules de Schwann primaires de rat immortalisées (S16) est un choix classique d'après l'étude du travail de Hai et al. (2002), qui s'est employé à caractériser différentes lignées cellulaires en comparaison à des cellules de Schwann primaires et d'extraits de nerf sciatique de rat. L'étude des transcrits concernant les principaux gènes exprimés dans la myéline (*PMP22*, *PO*, *MBP*, *MAG*) retrouvait, pour les lignées S16 et RT4-D6P2T, une quantité de transcrits supérieure ou égale à ce qui était obtenu pour les cellules de Schwann primaires. Compte tenu de la fragilité des cellules primaires et du côté invasif que représente la biopsie d'un nerf périphérique chez un patient, les études *in vitro* concernant les gènes impliqués dans le processus de myélinisation sont, généralement, conduites dans les cellules S16.

Nous avons réalisé 18 constructions plasmidiques contenant les régions promotrices 1A et 1B du gène *PMP22* ainsi que les Enhancer A, B, C et I3, seules ou en combinaison (Tableau 7). Une fois les premières expériences réalisées sur les séquences WT, nous avons réalisé la construction des plasmides contenant des variants nucléotidiques identifiés par séquençage haut débit chez 168 patients tout venant, adressés, entre septembre 2018 et mars 2019, pour

le diagnostic moléculaire d'une neuropathie périphérique d'origine *a priori* génétique. Cette cohorte ne comportait aucun patient porteur d'une variation du nombre de copies (CNV) de *PMP22*.

Notre méthode d'analyse repose sur la co-transfection d'un plasmide test contenant le gène rapporteur de la *Firefly luciferase* avec un vecteur pRL-SV40, contenant la *Renilla luciferase* associé à un promoteur viral puissant. Ce vecteur, utilisé à une faible quantité, n'interfère pas avec le plasmide test et fait office de contrôle interne de transfection. Ce schéma de co-transfection permet la détermination d'un rapport d'expression *Firefly / Renilla luciferase*. L'utilisation d'un contrôle interne de transfection permet de tenir compte de l'efficacité de transfection variable entre chaque expérience.

Comme témoin positif, nous avons repris la séquence du promoteur de *SH3TC2* décrit par Brewer et al. (2014), responsable d'une forme démyélinisante de CMT et caractérisé dans les cellules S16. Les valeurs d'expression du plasmide contenant la séquence promotrice retrouvées dans nos expériences, entre 20 et 30 fois la valeur du plasmide pGL3-vide, sont similaires à ce que décrivaient les auteurs dans leur travail. Ceci nous permet de valider nos expériences par rapport à un réel promoteur caractérisé. Cela permet également de valider les valeurs d'expression obtenues concernant nos séquences d'intérêt. REFORMULER

Pour chacune des conditions testées, nous avons réalisé un minimum de trois expériences indépendantes avec 6 à 8 réplicats par expériences. Les résultats présentés dans les figures 17 à 20 sur la validation de notre modèle avec les séquences WT montrent une très bonne répétabilité et reproductibilité, comme en témoignent nos CV entre 10 et 20%. Ceci est relativement faible considérant les techniques employées de culture et transfection.

L'analyse par séquençage haut débit nous a permis d'identifier dans notre cohorte un total de 8 variants (Tableau 9) : un dans l'Enhancer B (g.15309414C>T), un dans l'Enhancer I3 (g.15151470C>T), deux dans le promoteur 1A (g.15168522T>G ; g.15168577G>C) et quatre dans l'Enhancer C (g.15280985A>G ; g.15280986C>A ; g.15281032T>A ; g.15281336T>C).

Nous avons testé en priorité les variants rares dans la population générale, excluant en première intention de notre travail deux des quatre variants rencontrés dans l'Enhancer C (g.15280985A>G et g.15280986C>A) en raison de leur fréquence dans la population générale,

respectivement de 5% et 2%. Au total, en incluant les plasmides contenant les séquences mutées, nous avons réalisé 10 constructions supplémentaires pour tester ces variants.

Il n'a pas été possible de réaliser l'étude fonctionnelle du variant de l'Enhancer I3, absent des bases de données publiques, en raison de sa présence au sein de l'amorce designée. Cette position entraînait une correction du variant lors de la première phase de PCR, dès lors, il ne nous a pas été possible de réaliser la ligation intraplasmidique d'une séquence mutée. La poursuite de l'étude de ce variant en élargissant la région étudiée paraît nécessaire pour redéfinir le niveau d'expression de la séquence WT élargie et ainsi étudier le retentissement potentiel de ce variant inconnu.

Les constructions contenant les séquences Enhancers isolées (Figure 17) révèlent la capacité de l'Enhancer C et de l'Enhancer I3, en position de promoteur, à induire l'expression de la luciférase à des valeurs significatives ($p < 0,001$) par rapport au contrôle négatif, respectivement de 38 et 11 fois. L'analyse détaillée des séquences génomiques de ces deux régions ne retrouvaient pas les séquences consensus classiques décrites dans les promoteurs (TATA box, CAAT box). Ces valeurs étaient supérieures à celles obtenues pour la séquence Enhancer MCS5 du promoteur *SH3TC2* (Brewer et al., 2014), qui correspond au contrôle positif de cette expérience. En revanche, les expériences concernant les Enhancers seuls (Figure 18), placés en aval de la luciférase, ne démontraient pas d'activité intrinsèque, en dehors de l'Enhancer C. Seule cette séquence montrait un signal significatif mesuré à 10 fois la valeur du plasmide vide, à un niveau égal à notre contrôle positif.

L'analyse des séquences promotrices montre une expression constitutive, dans les cellules S16, induite par le promoteur 1A seul (Figure 19), à un niveau équivalent au contrôle positif représenté par la séquence promotrice de *SH3TC2*. La séquence du promoteur 1B en revanche ne montre pas de capacité à induire, par elle seule, l'expression de la luciférase (Figure 20). L'addition des séquences régulatrices à nos constructions plasmidiques retrouve une activité amplificatrice avec une synergie de chaque Enhancer lorsqu'il est placé en amont du promoteur (Figures 19 et 20). Cette synergie était retrouvée avec un profil similaire concernant les quatre Enhancers dans leur association au promoteur 1A ou 1B. Les niveaux d'expression mesurés étaient beaucoup plus importants dans les constructions contenant le promoteur 1B, avec une augmentation de 26 fois dans la condition comportant l'Enhancer B, et une augmentation de plus de 100 fois dans les associations avec les Enhancer A, C et I3.

Dans les expériences testant la synergie des séquences activatrices avec le promoteur 1A, l'augmentation de l'expression était mesurée à des valeurs plus faibles, entre 4 et 8 fois par rapport à la construction représentée par la séquence promotrice 1A seule. Nos résultats des associations Enhancers-Promoteur retrouvent des niveaux d'expression supérieurs au contrôle positif, montrant la validité de notre approche expérimentale et l'existence d'une synergie.

Cette forte activation de l'expression objectivée concernant le promoteur 1B nous a d'abord surpris. En effet, le promoteur 1A est celui qui est décrit historiquement (Maier et al., 2003) avec une activité spécifique dans la cellule de Schwann myélinisante, tandis que le promoteur 1B est plutôt exprimé dans les cellules neuronales. Dès lors, nous ne nous attendions pas à observer un profil d'expression comparable. L'analyse des résultats du travail de Hai et al. (2002) sur la comparaison des différentes lignées cellulaires, retrouvait également une surexpression du promoteur 1B par rapport au 1A dans les cellules S16 comme le montrent les résultats de Northern Blot de leur étude (Figure 25). Dans les lignées analysées, seuls les extraits de nerf sciatique montraient une surexpression du promoteur 1A, ceci s'expliquant facilement par la présence d'axones et de cellules de Schwann myélinisantes dans les extraits tissulaires.

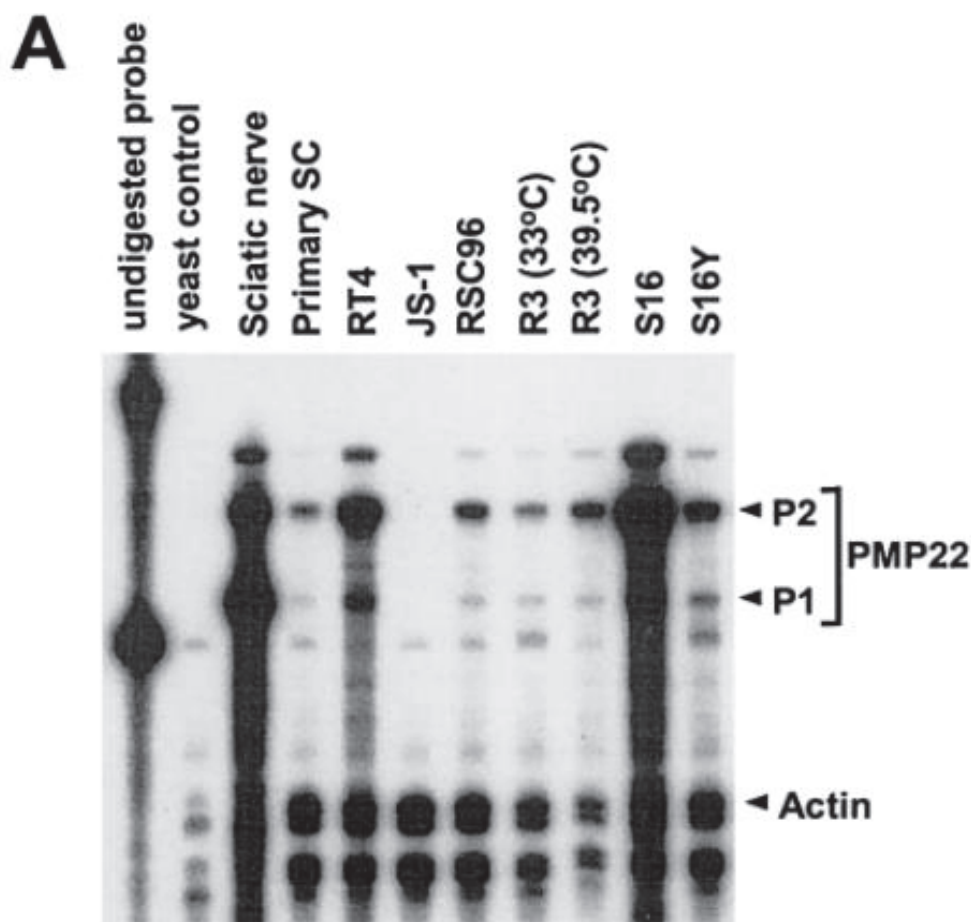


Figure 26 : Northern blot réalisé à partir d'ARN extrait de différentes lignées cellulaires pour l'étude des transcrits de *PMP22*

L'expression du transcrit P2 (promoteur 1B) est majoritaire dans toutes les lignées, sauf dans le nerf sciatique, par rapport au transcrit P1 (promoteur 1A)

Hai et al., 2002, Journal of Neuroscience Research

Ces résultats soulignent le rôle de l'environnement transcriptionnel dans l'expression génique et rappellent l'importance de la sélection rigoureuse des lignées cellulaires dans les études in-vitro.

Toutes nos constructions ont été analysées sur le promoteur 1A pour vérifier l'action de nos Enhancers sur son activité, dont l'expression est prépondérante dans un contexte myélinisant. Les cellules S16 n'étant pas myélinisantes, ceci explique les valeurs relativement faibles d'expression retrouvées dans cette étude. Nous n'avons pas retrouvé, dans la littérature, de caractérisation biologique du promoteur 1B ainsi que de la fonction de *PMP22* en dehors d'un contexte de myélinisation axonale. Dès lors, nous ne pouvons qu'émettre des hypothèses sur le devenir des transcrits alternatifs impliquant le promoteur 1B dans les cellules neuronales.

Une de ces hypothèses pourrait s'inscrire en dehors de la présence des facteurs de transcription essentiels à la maturation des cellules de Schwann et à la production de la myéline dans le cadre de la coopération cellulaire avec les axones de grands et moyens calibres (notamment la production de neuréguline-1 ou NRG1). Ce type d'environnement transcriptionnel favorisant la transcription alternative de l'exon 1B non codant pourrait par exemple entraîner la production d'un isoforme agissant comme un facteur régulateur de l'expression d'autres gènes impliqués dans la prolifération cellulaire. Cependant, la finalité biologique, dont l'absence de rôle du promoteur alternatif 1B dans les cellules de Schwann myélinisantes, ne nous a pas encouragé à utiliser cette séquence dans l'analyse de variants présents dans les Enhancers, malgré les forts niveaux de luminescence obtenus (Figure 20).

Notre travail a permis également, grâce à des variants identifiés en NGS, d'objectiver l'impact fonctionnel d'une variation nucléotidique dans une séquence régulatrice avec une diminution d'environ 50% pour l'association des variants g.15281032T>A et g.15281336T>C dans l'Enhancer C (Figure 23) et pour le variant g.15168577G>C du promoteur 1A (Figure 25). Le deuxième variant présent dans le promoteur 1A ne montrait aucune différence significative dans les niveaux de luciférase mesurés par rapport à la séquence WT (Figure 24). L'analyse du variant g.15309414C>T retrouvé dans l'Enhancer B (Figure 22), son faible impact sur la capacité d'expression associé à un signal inférieur au contrôle positif employé dans nos expériences ne nous apparaît pas biologiquement significatif.

Dans la réalisation de nos expériences, nous avons fait face à de nombreuses difficultés. Tout d'abord, la phase de construction de la librairie de plasmide s'est avérée être la partie de notre étude nous demandant le plus de rigueur dans l'établissement des constructions et la détermination des amorces. L'utilisation des outils disponibles sur le site du constructeur ClonTech™ nous a cependant apporté une aide majeure une fois pris en main. De plus, les étapes de culture cellulaire nous ont montré toute la rigueur et l'investissement nécessaire afin de pouvoir travailler avec un matériel de qualité pour la production de données fiables et reproductibles. Nous avons notamment été confrontés à des difficultés de transfection et de culture de souches cellulaires vieillissantes avec de multiples passages, ces cellules rentrant dans une sorte de routine avec un allongement de la durée de doublement cellulaire à presque 40 heures pour certaines souches, associée à une réduction de l'efficacité de transfection, objectivée dans certaines de nos expériences par des valeurs de *Renilla luciferase*

extrêmement basses, ce qui nous a contraint à réaliser d'autres séries de transfection sur des lignées plus jeunes, ne pouvant interpréter les résultats obtenus de manière sereine. Nous préconisons un maximum de 3 passages cellulaires pour une efficacité de transfection maximale et des résultats reproductibles, ainsi qu'une viabilité cellulaire (établie lors du comptage cellulaire par l'automate ADAM™) d'au moins 90%.

En résumé, les deux objectifs principaux de notre travail ont été atteints : confirmer *in vitro* le rôle des Enhancers, peu décrits dans la littérature, et tester pour la première fois un système avec des doubles constructions permettant de déterminer la synergie des séquences Enhancers avec le promoteur ainsi que des tests *in vitro* de variants identifiés chez des patients. Nous avons maintenant une idée de l'augmentation de l'activité d'un promoteur en présence de son Enhancer dans un système cellulaire. Nous ne pouvons cependant présenter les résultats de cette étude sans parler des limites de notre modèle. Tout d'abord, il paraît nécessaire de rappeler que cette étude se base sur des analyses *in vitro*, qui, même dans un cadre d'optimisation pour se rapprocher des conditions *in vivo*, ne peut reproduire à la perfection tous les événements se déroulant au sein du système nerveux périphérique, notamment les étapes précoces de développement du système nerveux qui sont cruciales. Le modèle S16 est commun à toutes les études sur lesquelles nous nous sommes appuyées.

De façon plus intrigante, les patients possédant un variant entraînant une baisse de 50% du signal mesuré, n'ont pas un phénotype de HNPP correspondant à une délétion de *PMP22*. Cela démontre la difficulté d'interprétation des variants nucléotidiques de signification indéterminée dans des régions qui ne sont pas bien caractérisées. Cependant, la capacité de notre travail à démontré un impact *in vitro* sur l'expression d'un gène rapporteur ouvre la voie à la poursuite de l'étude de ces séquences régulatrices.

Actuellement testé au laboratoire, un développement repose sur le traitement des cellules S16 à base de forskoline, activateur de l'adényl cyclase par l'intermédiaire d'un récepteur membranaire, permettant l'induction d'*EGR2*, facteur de transcription essentiel à la maturation des cellules et la sortie de la prolifération pour une entrée dans un stade de pré-myélinisation. Ce stade est associé à une modification de l'environnement transcriptionnel intra-cellulaire que nous souhaitons mettre en évidence grâce à une quantification absolue en PCR digitale des transcrits d'*EGR2*, *SOX10* et du transcrit 1A de *PMP22*. Cela nous permettrait d'ajouter une analyse quantitative à notre modèle de culture cellulaire.

Partie V : Perspectives

Les connaissances actuelles sur les régions régulatrices du génome sont encore limitées dans l'impact fonctionnel des variants de séquences non codantes sur l'expression génique. Ainsi, il paraît intéressant d'analyser ces régions dans le cadre d'analyses phénotypiques. Un projet en développement repose sur l'analyse de cohortes de patients porteurs d'une duplication ou d'une délétion de *PMP22*, pour lesquels nous disposons de scores cliniques (comme le CMTNS) permettant de les classer dans différentes catégories en fonction de leur degré d'atteinte clinique (léger, modéré, sévère). Cette cohorte pourrait être analysée au niveau des régions qui ont été au centre de ce travail afin de mettre en évidence des variants pouvant expliquer une différence d'atteinte phénotypique et ainsi établir des sous-groupes avec l'apport du génotype.

Une perspective d'intérêt réside également dans l'élargissement des régions étudiées dans le panel de gènes des neuropathies périphériques que nous réalisons au Centre de Biologie Est. Dans leur travail, Pantera et al. (2018) identifiaient un autre Enhancer potentiel situé à -165kb en amont de *PMP22* que nous souhaitons intégrer dans notre modèle d'étude. Ceci renforcerait nos connaissances sur les mécanismes de régulation du gène majeur du CMT.

Il serait souhaitable de poursuivre les analyses concernant les variants polymorphes que nous avons initialement décidé de pas inclure dans ce travail et élargir la séquence sélectionnée pour l'Enhancer I3 afin de chercher un impact potentiel du variant g.15151470C>T, inconnu des bases de données, que nous avons identifié lors de notre étude.

Enfin, nous souhaitons mettre en place un développement technique supplémentaire par la réalisation de nouvelles constructions plasmidiques contenant un assemblage des Enhancers étudiés pour rechercher une potentialisation du signal et la synergie qui peut exister entre ces différentes séquences régulatrices. La taille cumulée des Enhancers, de moins de 2kb représente un fragment que nous pouvons facilement insérer dans un plasmide pGL3.

Au total, notre travail valide un modèle original d'étude fonctionnelle des promoteurs et Enhancers. Le protocole est désormais implanté au sein du laboratoire. La méthode fait appel à une grande panoplie de techniques disponibles en biologie moléculaire, allant de la réalisation classique de PCR au design d'amorces pour la réalisation d'une banque de plasmides test, en passant par le clonage, la culture cellulaire et une technique de

luminescence. Tout en étant conscient des limites du modèle, ce type d'approche nous paraît être un outil de recherche et diagnostic potentiel important dans la caractérisation de variants identifiés en séquençage haut débit, dont le nombre explose avec la généralisation des examens de NGS produisant tous les jours une plus grande quantité de données génomiques. La problématique de la classification de ces nombreux variants de signification indéterminée dans les régions non codantes est également centrale puisque nous ne disposons pas, à l'heure actuelle, d'outils bioinformatiques de prédiction *in silico* adaptés.

Partie VI : Bibliographie

1. Adlkofer K, Frei R, Neuberger DH-H, Zielasek J, Toyka KV, Suter U. Heterozygous peripheral myelin protein 22-deficient mice are affected by a progressive demyelinating tomaculous neuropathy. *Journal of Neuroscience*. 1997;17(12):4662-71.
2. Allen RD, Weiss DG, Hayden JH, Brown DT, Fujiwake H, Simpson M. Gliding movement of and bidirectional transport along single native microtubules from squid axoplasm: evidence for an active role of microtubules in cytoplasmic transport. *J Cell Biol*. mai 1985;100(5):1736-52.
3. Antonellis A, Bennett WR, Menhenniott TR, Prasad AB, Lee-Lin S-Q, NISC Comparative Sequencing Program, et al. Deletion of long-range sequences at Sox10 compromises developmental expression in a mouse model of Waardenburg-Shah (WS4) syndrome. *Hum Mol Genet*. 15 janv 2006;15(2):259-71.
4. Attarian S, Vallat J-M, Magy L, Funalot B, Gonnaud P-M, Lacour A, et al. An exploratory randomised double-blind and placebo-controlled phase 2 study of a combination of baclofen, naltrexone and sorbitol (PXT3003) in patients with Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Orphanet J Rare Dis*. 18 déc 2014;9:199.
5. Barreto LCLS, Oliveira FS, Nunes PS, de França Costa IMP, Garcez CA, Goes GM, et al. Epidemiologic Study of Charcot-Marie-Tooth Disease: A Systematic Review. *Neuroepidemiology*. 2016;46(3):157-65.
6. Berciano J, Berciano MT, Combarros O. Original descriptions of peroneal muscular atrophy. *Muscle Nerve*. août 2003;28(2):251-2.
7. Berciano J, Gallardo E, García A, Pelayo-Negro AL, Infante J, Combarros O. New insights into the pathophysiology of pes cavus in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A duplication. *J Neurol*. sept 2011;258(9):1594-602.
8. Bienfait HME, Baas F, Koelman JHTM, de Haan RJ, van Engelen BGM, Gabreëls-Festen A a. WM, et al. Phenotype of Charcot-Marie-Tooth disease Type 2. *Neurology*. 15 mai 2007;68(20):1658-67.
9. Birouk N, Gouider R, Le Guern E, Gugenheim M, Tardieu S, Maisonobe T, et al. Charcot-Marie-Tooth disease type 1A with 17p11.2 duplication. Clinical and electrophysiological phenotype study and factors influencing disease severity in 119 cases. *Brain*. mai 1997;120 (Pt 5):813-23.
10. Blair IP, Nash J, Gordon MJ, Nicholson GA. Prevalence and origin of de novo duplications in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A: first report of a de novo duplication with a maternal origin. *Am J Hum Genet*. mars 1996;58(3):472-6.

11. Bouché P, Gherardi R, Cathala HP, Lhermitte F, Castaigne P. Peroneal muscular atrophy. Part 1. Clinical and electrophysiological study. *J Neurol Sci.* nov 1983;61(3):389-99.
12. Braathen GJ, Sand JC, Lobato A, Høyer H, Russell MB. Genetic epidemiology of Charcot-Marie-Tooth in the general population. *Eur J Neurol.* janv 2011;18(1):39-48.
13. Brennan A, Dean CH, Zhang AL, Cass DT, Mirsky R, Jessen KR. Endothelins Control the Timing of Schwann Cell Generation in Vitro and in Vivo. *Developmental Biology.* 15 nov 2000;227(2):545-57.
14. Brewer MH, Ma KH, Beecham GW, Gopinath C, Baas F, Choi B-O, et al. Haplotype-specific modulation of a SOX10/CREB response element at the Charcot-Marie-Tooth disease type 4C locus SH3TC2. *Hum Mol Genet.* 1 oct 2014;23(19):5171-87.
15. Britsch S, Goerich DE, Riethmacher D, Peirano RI, Rossner M, Nave K-A, et al. The transcription factor Sox10 is a key regulator of peripheral glial development. *Genes Dev.* 1 janv 2001;15(1):66-78.
16. Chan W-T, Verma CS, Lane DP, Gan SK-E. A comparison and optimization of methods and factors affecting the transformation of Escherichia coli. *Biosci Rep.* 12 déc 2013;33(6).
17. Chance PF, Alderson MK, Leppig KA, Lensch MW, Matsunami N, Smith B, et al. DNA deletion associated with hereditary neuropathy with liability to pressure palsies. *Cell.* 15 janv 1993;72(1):143-51.
18. Chumakov I, Milet A, Cholet N, Primas G, Boucard A, Pereira Y, et al. Polytherapy with a combination of three repurposed drugs (PXT3003) down-regulates Pmp22 over-expression and improves myelination, axonal and functional parameters in models of CMT1A neuropathy. *Orphanet J Rare Dis.* 10 déc 2014;9:201.
19. Cottalorda J, Violas P, Seringe R, French Society of Pediatric Orthopaedics. Neuro-orthopaedic evaluation of children and adolescents: a simplified algorithm. *Orthop Traumatol Surg Res.* oct 2012;98(6 Suppl):S146-153.
20. Davis CJ, Bradley WG, Madrid R. The peroneal muscular atrophy syndrome: clinical, genetic, electrophysiological and nerve biopsy studies. I. Clinical, genetic and electrophysiological findings and classification. *J Genet Hum.* déc 1978;26(4):311-49.
21. Decker L, Desmarquet-Trin-Dinh C, Taillebourg E, Ghislain J, Vallat J-M, Charnay P. Peripheral Myelin Maintenance Is a Dynamic Process Requiring Constant Krox20 Expression. *J Neurosci.* 20 sept 2006;26(38):9771-9.

22. Dyck PJ, Lambert EH. Lower motor and primary sensory neuron diseases with peroneal muscular atrophy. I. Neurologic, genetic, and electrophysiologic findings in hereditary polyneuropathies. *Arch Neurol.* juin 1968;18(6):603-18.
23. Filliatreau G. Les moteurs moléculaires du transport axonal. *M/S Médecine sciences* [revue papier, ISSN : 0767-0974], 1988, Vol 4, N° 6; p373-377 [Internet]. 1988 [cité 19 févr 2019]; Disponible sur: <http://www.ipubli.inserm.fr/handle/10608/3835>
24. Fledrich R, Mannil M, Leha A, Ehbrecht C, Solari A, Pelayo-Negro AL, et al. Biomarkers predict outcome in Charcot-Marie-Tooth disease 1A. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2017;88(11):941-52.
25. Fledrich R, Schlotter-Weigel B, Schnizer TJ, Wichert SP, Stassart RM, Meyer zu Hörste G, et al. A rat model of Charcot-Marie-Tooth disease 1A recapitulates disease variability and supplies biomarkers of axonal loss in patients. *Brain.* 1 janv 2012;135(1):72-87.
26. Froger A, Hall JE. Transformation of plasmid DNA into E. coli using the heat shock method. *J Vis Exp.* 2007;(6):253.
27. Gabriel JM, Erne B, Pareyson D, Sghirlanzoni A, Taroni F, Steck AJ. Gene dosage effects in hereditary peripheral neuropathy. Expression of peripheral myelin protein 22 in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A and hereditary neuropathy with liability to pressure palsies nerve biopsies. *Neurology.* déc 1997;49(6):1635-40.
28. Gherardi R, Bouché P, Escourolle R, Hauw JJ. Peroneal muscular atrophy. Part 2. Nerve biopsy studies. *J Neurol Sci.* nov 1983;61(3):401-16.
29. Giambonini-Brugnoli G, Buchstaller J, Sommer L, Suter U, Mantei N. Distinct disease mechanisms in peripheral neuropathies due to altered peripheral myelin protein 22 gene dosage or a Pmp22 point mutation. *Neurobiol Dis.* avr 2005;18(3):656-68.
30. Gudmundsson B, Olafsson E, Jakobsson F, Lúthvígsson P. Prevalence of symptomatic Charcot-Marie-Tooth disease in Iceland: a study of a well-defined population. *Neuroepidemiology.* 2010;34(1):13-7.
31. Hadianfard MJ, Ashraf A. Hip dysplasia associated with a hereditary sensorimotor polyneuropathy mimics a myopathic process. *Ann Indian Acad Neurol.* 2012;15(3):211-3.
32. Hai M, Bidichandani SI, Patel PI. Identification of a positive regulatory element in the myelin-specific promoter of the PMP22 gene. *J Neurosci Res.* 15 sept 2001;65(6):508-19.
33. Hai M, Muja N, DeVries GH, Quarles RH, Patel PI. Comparative analysis of Schwann cell lines as model systems for myelin gene transcription studies. *J Neurosci Res.* 15 août 2002;69(4):497-508.

34. Harding AE, Thomas PK. The clinical features of hereditary motor and sensory neuropathy types I and II. *Brain*. juin 1980;103(2):259-80.
35. Hayasaka K, Himoro M, Sato W, Takada G, Uyemura K, Shimizu N, et al. Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 1B is associated with mutations of the myelin P0 gene. *Nat Genet*. sept 1993;5(1):31-4.
36. Heigwer F, Kerr G, Boutros M. E-CRISP: fast CRISPR target site identification. *Nat Methods*. févr 2014;11(2):122-3.
37. Herringham WP. MUSCULAR ATROPHY OF THE PERONEAL TYPE AFFECTING MANY MEMBERS OF A FAMILY. *Brain*. 1 juill 1888;11(2):230-6.
38. Jones EA, Brewer MH, Srinivasan R, Krueger C, Sun G, Charney KN, et al. Distal enhancers upstream of the Charcot-Marie-Tooth type 1A disease gene PMP22. *Hum Mol Genet*. 1 avr 2012;21(7):1581-91.
39. Jones EA, Lopez-Anido C, Srinivasan R, Krueger C, Chang L-W, Nagarajan R, et al. Regulation of the PMP22 gene through an intronic enhancer. *J Neurosci*. 16 mars 2011;31(11):4242-50.
40. Jouaud M, Mathis S, Richard L, Lia A-S, Magy L, Vallat J-M. Rodent models with expression of PMP22: Relevance to dysmyelinating CMT and HNPP. *J Neurol Sci*. 21 janv 2019;398:79-90.
41. Juneja M, Burns J, Saporta MA, Timmerman V. Challenges in modelling the Charcot-Marie-Tooth neuropathies for therapy development. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. janv 2019;90(1):58-67.
42. Kazamel M, Boes CJ. Charcot Marie Tooth disease (CMT): historical perspectives and evolution. *J Neurol*. 2015;262(4):801-5.
43. Kidd GJ, Ohno N, Trapp BD. Biology of Schwann cells. *Handb Clin Neurol*. 2013;115:55-79.
44. Kiepura AJ, Kocharński A. Charcot-Marie-Tooth type 1A drug therapies: role of adenylyl cyclase activity and G-protein coupled receptors in disease pathomechanism. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 2018;78(3):198-209.
45. Klein CJ, Duan X, Shy ME. Inherited neuropathies: clinical overview and update. *Muscle Nerve*. oct 2013;48(4):604-22.
46. Koehler PJ, Baas F. Hereditary neuropathy with liability to pressure palsies. Diagnosis in the first family (1947) confirmed. *J Peripher Nerv Syst*. déc 2012;17(4):412-3.

47. Latour P, Boutrand L, Levy N, Bernard R, Boyer A, Claustrat F, et al. Polymorphic short tandem repeats for diagnosis of the Charcot-Marie-Tooth 1A duplication. *Clin Chem. mai 2001;47(5):829-37.*
48. Lee J-S, Chang EH, Koo OJ, Jwa DH, Mo WM, Kwak G, et al. Pmp22 mutant allele-specific siRNA alleviates demyelinating neuropathic phenotype in vivo. *Neurobiol Dis. avr 2017;100:99-107.*
49. Li J, Parker B, Martyn C, Natarajan C, Guo J. The PMP22 Gene and Its Related Diseases. *Mol Neurobiol. avr 2013;47(2):673-98.*
50. Li Y, Rivera CM, Ishii H, Jin F, Selvaraj S, Lee AY, et al. CRISPR Reveals a Distal Super-Enhancer Required for Sox2 Expression in Mouse Embryonic Stem Cells. *PLoS One [Internet]. 8 déc 2014 [cité 6 juin 2018];9(12).* Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4259346/>
51. Lopes J, LeGuern E, Gouider R, Tardieu S, Abbas N, Birouk N, et al. Recombination hot spot in a 3.2-kb region of the Charcot-Marie-Tooth type 1A repeat sequences: new tools for molecular diagnosis of hereditary neuropathy with liability to pressure palsies and of Charcot-Marie-Tooth type 1A. French CMT Collaborative Research Group. *Am J Hum Genet. juin 1996;58(6):1223-30.*
52. Lupski JR, de Oca-Luna RM, Slaugenhaupt S, Pentao L, Guzzetta V, Trask BJ, et al. DNA duplication associated with Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Cell. 26 juill 1991;66(2):219-32.*
53. Maday S, Twelvetrees AE, Moughamian AJ, Holzbaur ELF. AXONAL TRANSPORT: CARGO-SPECIFIC MECHANISMS OF MOTILITY AND REGULATION. *Neuron. 22 oct 2014;84(2):292-309.*
54. Madrid R, Bradley WG, Davis CJ. The peroneal muscular atrophy syndrome. Clinical, genetic, electrophysiological and nerve biopsy studies. Part 2. Observations on pathological changes in sural nerve biopsies. *J Neurol Sci. mai 1977;32(1):91-122.*
55. Maier M, Berger P, Nave K-A, Suter U. Identification of the regulatory region of the peripheral myelin protein 22 (PMP22) gene that directs temporal and spatial expression in development and regeneration of peripheral nerves. *Mol Cell Neurosci. mai 2002;20(1):93-109.*
56. Maier M, Castagner F, Berger P, Suter U. Distinct elements of the peripheral myelin protein 22 (PMP22) promoter regulate expression in Schwann cells and sensory neurons. *Mol Cell Neurosci. nov 2003;24(3):803-17.*
57. Manganelli F, Tozza S, Pisciotta C, Bellone E, Iodice R, Nolano M, et al. Charcot-Marie-Tooth disease: frequency of genetic subtypes in a Southern Italy population. *J Peripher Nerv Syst. déc 2014;19(4):292-8.*

58. Mannil M, Solari A, Leha A, Pelayo-Negro AL, Berciano J, Schlotter-Weigel B, et al. Selected items from the Charcot-Marie-Tooth (CMT) Neuropathy Score and secondary clinical outcome measures serve as sensitive clinical markers of disease severity in CMT1A patients. *Neuromuscular Disorders*. 1 nov 2014;24(11):1003-17.
59. Mathis S, Corcia P, Tazir M, Camu W, Magdelaine C, Latour P, et al. Peripheral myelin protein 22 gene duplication with atypical presentations: a new example of the wide spectrum of Charcot-Marie-Tooth 1A disease. *Neuromuscul Disord*. juin 2014;24(6):524-8.
60. Mathis S, Magy L, Vallat J-M. Therapeutic options in Charcot-Marie-Tooth diseases. *Expert Rev Neurother*. avr 2015;15(4):355-66.
61. Matsunami N, Smith B, Ballard L, Lensch MW, Robertson M, Albertsen H, et al. Peripheral myelin protein-22 gene maps in the duplication in chromosome 17p11.2 associated with Charcot-Marie-Tooth 1A. *Nat Genet*. juin 1992;1(3):176-9.
62. Mirsky R, Woodhoo A, Parkinson DB, Arthur-Farraj P, Bhaskaran A, Jessen KR. Novel signals controlling embryonic Schwann cell development, myelination and dedifferentiation. *Journal of the Peripheral Nervous System*. 2008;13(2):122-35.
63. Murphy SM, Herrmann DN, McDermott MP, Scherer SS, Shy ME, Reilly MM, et al. Reliability of the CMT neuropathy score (second version) in Charcot-Marie-Tooth disease. *J Peripher Nerv Syst*. sept 2011;16(3):191-8.
64. Murphy SM, Laura M, Fawcett K, Pandraud A, Liu Y-T, Davidson GL, et al. Charcot-Marie-Tooth disease: frequency of genetic subtypes and guidelines for genetic testing. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. juill 2012;83(7):706-10.
65. Nobbio L, Sturla L, Fiorese F, Usai C, Basile G, Moreschi I, et al. P2X7-mediated Increased Intracellular Calcium Causes Functional Derangement in Schwann Cells from Rats with CMT1A Neuropathy. *J Biol Chem*. 21 août 2009;284(34):23146-58.
66. Palau F, Löfgren A, De Jonghe P, Bort S, Nelis E, Sevilla T, et al. Origin of the de novo duplication in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A: unequal nonsister chromatid exchange during spermatogenesis. *Hum Mol Genet*. déc 1993;2(12):2031-5.
67. Pantera H, Moran JJ, Hung HA, Pak E, Dutra A, Svaren J. Regulation of the neuropathy-associated Pmp22 gene by a distal super-enhancer. *Hum Mol Genet*. 16 mai 2018;
68. Parmantier E, Braun C, Thomas JL, Peyron F, Martinez S, Zalc B. PMP-22 expression in the central nervous system of the embryonic mouse defines potential transverse segments and longitudinal columns. *J Comp Neurol*. 10 févr 1997;378(2):159-72.
69. Parmantier E, Cabon F, Braun C, D'Urso D, Müller HW, Zalc B. Peripheral myelin protein-22 is expressed in rat and mouse brain and spinal cord motoneurons. *Eur J Neurosci*. 1 mai 1995;7(5):1080-8.

70. Paschal BM, Shpetner HS, Vallee RB. MAP 1C is a microtubule-activated ATPase which translocates microtubules in vitro and has dynein-like properties. *J Cell Biol.* sept 1987;105(3):1273-82.
71. Passage E, Norreel JC, Noack-Fraissignes P, Sanguedolce V, Pizant J, Thirion X, et al. Ascorbic acid treatment corrects the phenotype of a mouse model of Charcot-Marie-Tooth disease. *Nat Med.* avr 2004;10(4):396-401.
72. Raasakka A, Ruskamo S, Kowal J, Han H, Baumann A, Myllykoski M, et al. Molecular structure and function of myelin protein P0 in membrane stacking. *Sci Rep.* 24 janv 2019;9(1):642.
73. Raeymaekers P, Timmerman V, Nelis E, De Jonghe P, Hoogendijk JE, Baas F, et al. Duplication in chromosome 17p11.2 in Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 1a (CMT 1a). The HMSN Collaborative Research Group. *Neuromuscul Disord.* 1991;1(2):93-7.
74. Ramchandren S. Charcot-Marie-Tooth Disease and Other Genetic Polyneuropathies. *Continuum (Minneapolis, Minn).* 2017;23(5, Peripheral Nerve and Motor Neuron Disorders):1360-77.
75. Ramdharry G. Peripheral nerve disease. *Handb Clin Neurol.* 2018;159:403-15.
76. Rautenstrauss B, Fuchs C, Liehr T, Grehl H, Murakami T, Lupski JR. Visualization of the CMT1A duplication and HNPP deletion by FISH on stretched chromosome fibers. *J Peripher Nerv Syst.* 1997;2(4):319-22.
77. Reiter LT, Murakami T, Koeuth T, Pentao L, Muzny DM, Gibbs RA, et al. A recombination hotspot responsible for two inherited peripheral neuropathies is located near a mariner transposon-like element. *Nat Genet.* mars 1996;12(3):288-97.
78. Rigoard P, Buffenoir K, Wager M, Bauche S, Giot J-P, Robert R, et al. Organisation anatomique et physiologique du nerf périphérique. *Neurochirurgie.* 1 mars 2009;55:S3-12.
79. Sabéran-Djoneidi D, Sanguedolce V, Assouline Z, Lévy N, Passage E, Fontés M. Molecular dissection of the Schwann cell specific promoter of the PMP22 gene. *Gene.* 2 mai 2000;248(1-2):223-31.
80. Saporta ASD, Sottile SL, Miller LJ, Feely SME, Siskind CE, Shy ME. Charcot-Marie-Tooth disease subtypes and genetic testing strategies. *Ann Neurol.* janv 2011;69(1):22-33.
81. Schneider C, King RM, Philipson L. Genes specifically expressed at growth arrest of mammalian cells. *Cell.* 9 sept 1988;54(6):787-93.
82. Shy ME, Chen L, Swan ER, Taube R, Krajewski KM, Herrmann D, et al. Neuropathy progression in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Neurology.* 29 janv 2008;70(5):378-83.

83. Sivera R, Sevilla T, Vílchez JJ, Martínez-Rubio D, Chumillas MJ, Vázquez JF, et al. Charcot-Marie-Tooth disease: genetic and clinical spectrum in a Spanish clinical series. *Neurology*. 29 oct 2013;81(18):1617-25.
84. Skre H. Genetic and clinical aspects of Charcot-Marie-Tooth's disease. *Clin Genet*. 1974;6(2):98-118.
85. Sociali G, Visigalli D, Prukop T, Cervellini I, Mannino E, Venturi C, et al. Tolerability and efficacy study of P2X7 inhibition in experimental Charcot-Marie-Tooth type 1A (CMT1A) neuropathy. *Neurobiol Dis*. nov 2016;95:145-57.
86. Souayah N, Seltzer WK, Brannagan TH, Chin RL, Sander HW. Rare myelin protein zero sequence variant in late onset CMT1B. *J Neurol Sci*. 15 déc 2007;263(1-2):177-9.
87. Sturtz FG, Chazot G, Vandenberghe AJ. Charcot-Marie-Tooth disease from first description to genetic localization of mutations. *J Hist Neurosci*. janv 1992;1(1):47-58.
88. Suter U, Moskow JJ, Welcher AA, Snipes GJ, Kosaras B, Sidman RL, et al. A leucine-to-proline mutation in the putative first transmembrane domain of the 22-kDa peripheral myelin protein in the trembler-J mouse. *Proc Natl Acad Sci USA*. 15 mai 1992;89(10):4382-6.
89. Suter U, Snipes GJ, Schoener-Scott R, Welcher AA, Pareek S, Lupski JR, et al. Regulation of tissue-specific expression of alternative peripheral myelin protein-22 (PMP22) gene transcripts by two promoters. *J Biol Chem*. 14 oct 1994;269(41):25795-808.
90. Suter U, Welcher AA, Ozelik T, Snipes GJ, Kosaras B, Francke U, et al. Trembler mouse carries a point mutation in a myelin gene. *Nature*. 19 mars 1992;356(6366):241-4.
91. Timmerman V, Strickland AV, Züchner S. Genetics of Charcot-Marie-Tooth (CMT) Disease within the Frame of the Human Genome Project Success. *Genes (Basel)*. 22 janv 2014;5(1):13-32.
92. Valentijn LJ, Baas F, Wolterman RA, Hoogendijk JE, van den Bosch NH, Zorn I, et al. Identical point mutations of PMP-22 in Trembler-J mouse and Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Nat Genet*. déc 1992;2(4):288-91.
93. Vallat J-M, Mathis S, Funalot B. The various Charcot-Marie-Tooth diseases. *Curr Opin Neurol*. oct 2013;26(5):473-80.
94. van Paassen BW, van der Kooi AJ, van Spaendonck-Zwarts KY, Verhamme C, Baas F, de Visser M. PMP22 related neuropathies: Charcot-Marie-Tooth disease type 1A and Hereditary Neuropathy with liability to Pressure Palsies. *Orphanet J Rare Dis*. 19 mars 2014;9:38.

95. Verhamme C, van Schaik IN, Koelman JHTM, de Haan RJ, Vermeulen M, de Visser M. Clinical disease severity and axonal dysfunction in hereditary motor and sensory neuropathy Ia. *J Neurol.* déc 2004;251(12):1491-7.
96. Wakamatsu Y, Maynard TM, Weston JA. Fate determination of neural crest cells by NOTCH-mediated lateral inhibition and asymmetrical cell division during gangliogenesis. *Development.* 2000;127(13):2811-21.
97. Walker JL, Nelson KR, Heavilon JA, Stevens DB, Lubicky JP, Ogden JA, et al. Hip abnormalities in children with Charcot-Marie-Tooth disease. *J Pediatr Orthop.* févr 1994;14(1):54-9.
98. Weis J, Claeys KG, Roos A, Azzedine H, Katona I, Schröder JM, et al. Towards a functional pathology of hereditary neuropathies. *Acta Neuropathol.* 2017;133(4):493-515.
99. Weterman MAJ, van Ruissen F, de Wissel M, Bordewijk L, Samijn JPA, van der Pol WL, et al. Copy number variation upstream of PMP22 in Charcot-Marie-Tooth disease. *Eur J Hum Genet.* avr 2010;18(4):421-8.
100. Wu R, Lv H, Zhang W, Wang Z, Zuo Y, Liu J, et al. Clinical and Pathological Variation of Charcot-Marie-Tooth 1A in a Large Chinese Cohort. *Biomed Res Int.* 2017;2017:6481367.
101. Young P, De Jonghe P, Stögbauer F, Butterfass-Bahloul T. Treatment for Charcot-Marie-Tooth disease. *Cochrane Database Syst Rev.* 23 janv 2008;(1):CD006052.
102. Yuan A, Rao MV, Veeranna, Nixon RA. Neurofilaments at a glance. *J Cell Sci.* 15 juill 2012;125(14):3257-63.
103. Zhao HT, Damle S, Ikeda-Lee K, Kuntz S, Li J, Mohan A, et al. PMP22 antisense oligonucleotides reverse Charcot-Marie-Tooth disease type 1A features in rodent models. *J Clin Invest.* 2 janv 2018;128(1):359-68.



Nom, prénom du candidat : BENQUEY Thibaut

CONCLUSIONS

Le syndrome de Charcot-Marie-Tooth représente la forme la plus fréquente de neuropathie périphérique héréditaire avec une fréquence estimée à 1/2500. L'anomalie la plus courante est une microduplication de 4,5 Mb en 17p11.2 contenant le gène PMP22 qui compte pour 50% des patients CMT. La délétion du gène est également responsable d'une neuropathie apparentée nommée HNPP ou neuropathie focale.

Jeus avons travaillé sur la validation d'un système *in vitro* de transfection, dans des cellules de Schwann primaires de rat (SAB), pour l'analyse des promoteurs et enhanceurs connus de PMP22 afin d'évaluer l'impact potentiels de variants des régions non codantes sur la transcription du gène.

Les deux promoteurs P4A et P4B ont été testés ainsi que quatre enhanceurs identifiés dans les travaux de Jones et al.

Dix huit constructions d'enhanceurs et de promoteurs, seul ou en combinaison, ont été évaluées, couplées avec le gène rapporteur de la luciférase.

Les résultats montrent une amplification du signal par les enhanceurs de 4 à 7 fois dans les constructions contenant le promoteur 4A et de 25 à 40 fois dans celles contenant le promoteur 4B.

Jeus avons ensuite testé 5 variants identifiés à partir d'une série de 463 patients analysés par séquençage nouvelle génération. L'étude fonctionnelle retrouvait une diminution significative de l'expression de la luciférase pour trois d'entre eux : P1A: g.15168577G>C ; EnhancerC: g.15281032T>A et EnhancerC: g.15281336T>C.

En conclusion, le système testé est fonctionnel et original. Jeus envisageons de poursuivre l'étude de variants identifiés dans ces séquences régulatrices en collaboration avec d'autres laboratoires ainsi que la possibilité de généraliser ce modèle à l'étude d'autres gènes pour la caractérisation de variants.

Le Président de jury,
Nom et Prénom
Signature

VU,
Le Doyen de la Faculté de Médecine
et de Maïeutique Lyon-Sud Charles Mérieux

Professeur Carole BURILLON

Neuropathies périphériques dues au dosage génique de *PMP22* : étude fonctionnelle des Enhancers et application en pratique diagnostique

BENQUEY Thibaut - Thèse Médecine – Lyon 2019 – n°83

RÉSUMÉ

La maladie de Charcot-Marie-Tooth (CMT) représente la neuropathie périphérique héréditaire d'origine génétique la plus fréquente avec une prévalence estimée de 1/2500. A l'heure actuelle, plus de 80 gènes sont décrits comme étant responsables de la maladie. L'anomalie génétique la plus commune, rencontrée chez 50% des patients, est une microduplication de 1,5Mb localisée sur le Chr17p11.2, dans laquelle se trouve le gène *PMP22*, codant une protéine de la myéline périphérique, et responsable du CMT démyélinisant de type 1A. La délétion de la même région est, elle, responsable de la neuropathie périphérique par hypersensibilité à la pression (HNPP). Une description récente de patients présentant un phénotype clinique typique de CMT1A, ne présentant pas la microduplication classique mais une duplication d'une région de 186kb, en amont du gène, a permis d'identifier dans cette zone trois séquences régulatrices potentielles de *PMP22*, appelées Enhancers A, B et C. Ce travail identifiait également un Enhancer I3 dans l'intron 3 du gène.

L'objectif principal de ce travail était de valider un modèle *in vitro* analysant la capacité de ces Enhancers à moduler l'expression des deux promoteurs alternatifs 1A et 1B de *PMP22*. Dix-huit constructions plasmidiques, contenant le gène rapporteur de la luciférase, ont été testées dans des cellules de Schwann primaires de rat (S16). Dans un second temps, nous avons caractérisé l'impact fonctionnel de 5 variants nucléotidiques identifiés par séquençage haut débit (NGS) dans nos régions d'intérêt, chez 168 patients tout venant, adressés entre septembre 2018 et mars 2019, pour le diagnostic moléculaire d'une neuropathie périphérique *a priori* d'origine génétique.

Nos résultats objectivent la capacité des séquences régulatrices testées à induire l'expression d'un gène rapporteur dans un modèle *in vitro*, avec une augmentation pour les Enhancers C et I3, respectivement de 38 et 11 fois par rapport au plasmide vide. Nous montrons ensuite l'existence d'une synergie pour les constructions contenant l'association d'une séquence Enhancer avec le promoteur 1A avec une augmentation de la luminescence de 4 à 10 fois. Enfin, l'analyse des variants identifiés par NGS retrouve, chez deux patients, une diminution de l'expression de la luciférase de 50% pour l'association de deux variants dans l'Enhancer C (g.15281032T>A et g.15281336T>C) ainsi que pour le variant g.15168577G>C dans le promoteur 1A.

Ces résultats valident notre approche fonctionnelle et la capacité de notre modèle à objectiver l'impact éventuel d'une variation nucléotidique dans les régions non codantes sur l'expression de *PMP22*. Cependant, l'absence de corrélation nette entre une réduction d'activité *in vitro* et le phénotype des deux patients nous fait suspecter des mécanismes plus fins de régulation de l'expression et pourrait représenter une limite de notre modèle.

Notre travail s'inscrit dans l'approche fonctionnelle de l'analyse de variants, qui représente un domaine d'étude grandissant avec la production de données génomiques toujours plus importantes grâce à l'utilisation en routine de techniques de séquençage à haut débit. En effet, le nombre de variants de signification indéterminée en augmentation, notamment dans les régions non codantes et régulatrices de gènes, nécessite la mise en place d'outils permettant leur étude, dans un cadre où les algorithmes de prédiction *in silico* sont, à l'heure actuelle, dans l'impossibilité de prédire un rôle pathogène.

MOTS CLES : Etude fonctionnelle *PMP22*
Régions régulatrices
CMT1A
Modèle *in vitro*

JURY : Président : Professeur Damien SANLAVILLE
Membres : Professeur Christine VINCIQUERRA
Docteur Gaëtan LESCA
Docteur Philippe LATOUR

DATE DE SOUTENANCE : 26 Avril 2019

ADRESSE DE L'AUTEUR : 7, place Bellecour 69002 Lyon
Benquey.thibaut@gmail.com