

Proposition de Stage M2 S4 NEUROSCIENCES **Année Universitaire 2010-2011**

1. Equipe d'Accueil de Master (EAM) :

Intitulé et numéro de l'Unité : Institut de Biologie de l'Ecole Normale Supérieure, ENS, INSERM U1024, CNRS UMR 8197

Nom du Responsable de l'Unité : Antoine Triller

Nom du Responsable de l'Équipe : Patrick Charnay

Intitulé de l'équipe d'accueil : Développement du Système Nerveux

Adresse : ENS, 46 rue d'Ulm, 75230 Paris Cedex 05

Nom du responsable de l'encadrement : Laurence Decker

Tél. : 01 44 32 39 12

Fax. : 01 44 32 39 88

E-mail : decker@wotan.ens.fr

2. Titre du sujet : Mécanismes moléculaires du contrôle précoce de la myélinisation par les cellules de Schwann

3. Description du sujet :

Les cellules de Schwann sont en charges de la myélinisation du système nerveux périphérique (SNP). Nous avons établi que ce processus est gouverné par un facteur de transcription, *Krox20*, qui contrôle l'expression des gènes de myéline (1,2). Nous avons également montré que l'expression de *Krox20* lui-même est dépendante du contact entre la cellule de Schwann et l'axone (3) et que cette expression est pilotée par deux enhanceurs différents, actifs l'un pendant la phase embryonnaire et l'autre après la naissance (4, 5). Cependant les détails des mécanismes qui aboutissent à l'activation de ces deux enhanceurs suite à l'interaction cellulaire ne sont pas connus. Récemment, nous avons établi que l'interaction avec des neurones suffit à activer l'expression de *Krox20* dans d'autres types cellulaires que les cellules de Schwann, en particulier des fibroblastes. Cette interaction peut être réalisée en co-culture, un système que nous maîtrisons parfaitement. Ceci est très surprenant car il était admis que l'activation de *Krox20*, qui constitue la première étape de la myélinisation, était très spécifique des cellules de Schwann et nécessitait de complexes communications avec les neurones. Nos résultats suggèrent donc que l'activation de *Krox20* pourrait reposer sur un mécanisme beaucoup plus simple et nécessiter par exemple l'activation d'une seule voie de transduction. Le projet proposé vise justement à identifier ce mécanisme, ce qui est très important non seulement du point de vue fondamental, mais également en pathologie, considérant le rôle essentiel de *Krox20* dans la myélinisation du SNP et l'incidence des maladies affectant ce processus. Tout d'abord il s'agira d'identifier quel enhancer est contrôlé par le contact axonal dans les fibroblastes. Pour cela nous disposons de deux lignées de souris transgéniques dans lesquelles le gène de la β -galactosidase, que l'on peut détecter facilement in situ, est placé sous contrôle des enhanceurs embryonnaire ou postnatal, respectivement. Nous allons préparer des fibroblastes à partir de ces deux lignées, les cultiver en présence de neurones et déterminer si la β -galactosidase est produite dans les fibroblastes dans ces conditions. Si c'est le cas pour l'une ou les deux lignées, ceci établira que le(s) enhancer(s) correspondants répondent à la stimulation. Ensuite nous tenterons de déterminer la voie de signalisation impliquée. Nous avons montré que dans ces co-cultures nous pouvons bloquer efficacement l'expression d'un gène par électroporation d'un siRNA correspondant. Ce type d'expérience étant relativement léger à mettre en œuvre, nous pouvons envisager de cibler systématiquement un ou plusieurs gène-clef de chacune des voies de signalisation connues de façon à déterminer si elle est requise pour l'activation de *Krox20* (dans ce cas les fibroblastes utilisés proviendront d'une lignée knock-in dans

laquelle le gène de la GFP est insérée dans le locus *Krox20*, ce qui facilite considérablement la détection de l'activation du locus). Dans un troisième temps, lorsque la voie de signalisation sera identifiée, nous tenterons de la connecter au enhancer qui gouverne l'expression de *Krox20*, en recherchant au sein de la séquence nucléotidique de ce dernier des sites de fixation pour les effecteurs de cette voie. Si de telles séquences sont identifiées, nous y introduirons des mutations et vérifierons que celles-ci abolissent l'activité de réponse du enhancer au contact axonal. Ces travaux devraient donc permettre d'identifier des éléments essentiels du contrôle précoce de la myélinisation par les cellules de Schwann.

1. Topilko, P., Schneider-Maunoury, S., Levi, G., Baron-Van Evercooren, A., Ben Younes Chennoufi, A., Seitanidou, T., Babinet, C. and Charnay, P. (1994). *Krox-20* controls myelination in the peripheral nervous system. *Nature*, **371**, 796-799.
2. Decker, L., Desmarquet, C., Taillebourg, E., Ghislain, J., Vallat J.-M. and Charnay, P. Myelin maintenance is a dynamic process requiring constant *Krox20* expression. (2006). *J. Neurosci.*, **26**, 9771-9779.
3. Murphy, P., Topilko, P., Schneider-Maunoury, S., Seitanidou, T., Baron-van Evercooren, A. and Charnay, P. (1996). The regulation of *Krox-20* expression reveals important steps in the control of peripheral glial cell development. *Development*, **122**, 2847-2857.
4. Ghislain, J., Desmarquet-Trin-dinh, C., Jaegle, M., Meijer, D., Charnay, P. and Frain, M. Characterisation of cis-acting sequences reveals a biphasic, axon-dependent regulation of *Krox20* during Schwann cell development. (2002). *Development*, **129**, 155-166.
5. Ghislain, J. and Charnay, P. Control of myelination in Schwann cells: a *Krox20* cis-regulatory element integrates Oct6, Brn2 and Sox10 activities. (2006). *EMBO Reports*, **7**, 52-58.

4. Publications (5 parmi les plus significatives, au cours des quatre dernières années).

Desmazi  res, A., Decker, L., Vallat, J.-M., Charnay, P. and Gilardi-Hebenstreit, P. Disruption of *Krox20*-Nab interaction leads to a peripheral neuropathy with biphasic evolution. (2008). *J. Neurosci.*, **28**, 5891-5900.

Wassef, M., Chomette, D., Pouilhe, M., Stedman, A., Havis, E., Desmarquet-Trin Dinh, C., Schneider-Maunoury, S., Gilardi-Hebenstreit, P., Charnay, P. and Ghislain, J. Rostral hindbrain patterning involves direct activation of a *Krox20* transcriptional enhancer by Hox/Pbx and Meis factors. (2008). *Development*, **135**, 3369-3378.

Desmazi  res, A., Charnay, P. and Gilardi-Hebenstreit, P. *Krox20* controls the transcription of its various targets in the developing hindbrain according to multiple modes. (2009). *J. Biol. Chem.*, **284**, 10831-10840.

Esain, V., Postlethwait, J.H., Charnay, P. and Ghislain, J. FGF-receptor signalling controls neural cell diversity in the zebrafish hindbrain by regulating *olig2* and *sox9*. (2010). *Development*, **137**, 33-42.

Coulpier, F., Decker, L., Vallat, J.-M., Funalot, B., Garcia-Bragado, F., Charnay, P. and Topilko, P. Transgression of the CNS/PNS boundary in the absence of Schwann cells or *Egr2/Krox20* function. (2010). *J. Neurosci.*, sous presse.