

INTRODUCTION.....	1
<u>I - Développement du système nerveux central (SNC) des Vertébrés</u>	1
1. <u>Mécanismes généraux de la mise en place du SNC.....</u>	1
1.1. Le phénomène de neurulation et l'induction neurale.....	1
1.2. Régionalisation du primordium neural	4
1.2.1. Formation et dérivés des territoires céphaliques.....	4
1.2.2. Mécanismes moléculaires de la régionalisation antéro-postérieure	4
1.2.2.1. Mécanismes moléculaires liés à l'induction neurale.....	4
1.2.2.2. Signaux postériorisant le tube neural.....	5
1.2.2.3. Organismes locaux.....	7
1.2.3. Mécanismes moléculaires de la régionalisation dorso-ventrale.....	8
1.3. Détermination neuronale.....	9
2. <u>Organisation segmentée du rhombencéphale.....</u>	10
2.1. Notion de métamérie et description d'un primordium segmenté, le rhombencéphale.....	10
2.2. Les rhombomères, unités de lignage cellulaire et leurs structures associées...11	11
2.2.1. Les populations neuronales et les nerfs crâniens efférents.....	11
2.2.2. Les cellules de crête neurale et leur devenir.....	12
2.3. Les rhombomères, unités d'expression génétique.....	16
3. <u>Mécanismes de segmentation du rhombencéphale.....</u>	17
3.1. Processus de compartimentation et de tri cellulaire.....	17
3.2. Mécanismes moléculaires impliqués dans la formation des rhombomères	19
3.2.1. Régionalisation précoce et gradients de morphogènes.....	20
3.2.1.1. Rôle du gradient d'acide rétinoïque dans la mise en place du rhombencéphale postérieur.....	20
3.2.1.2. Rôle des FGF dans le développement du rhombencéphale antérieur....	22
3.2.1.3. Le rôle potentiel de la voie Wnt.....	23
3.2.2. Affinement de l'organisation rhombomérique.....	23
3.2.2.1. Divers gènes intègrent les différents gradients morphogènes et participent à la spécification des territoires rhombomériques	23

3.2.2.2. <i>Les gènes Hox et leurs cofacteurs</i>	26
3.2.2.3. <i>Les facteurs jouant un rôle permissif</i>	30
3.3. <i>Krox20</i>, un gène maître du développement du rhombencéphale	31
3.3.1. Caractéristiques du gène <i>Krox20</i> et du facteur qu'il code.....	31
3.3.2. L'expression de <i>Krox20</i> dans le rhombencéphale et sa régulation.....	31
3.3.3. Rôle de <i>Krox20</i> dans la segmentation.....	32
3.3.4. Modulation de l'activité de <i>Krox20</i> par ses cofacteurs.....	35
<u>II - Développement du système nerveux périphérique des Vertébrés</u>	39
1. <u>Présentation générale du système nerveux périphérique</u>	39
1.1. Description anatomique du système nerveux périphérique.....	39
1.2. Aspects fonctionnels des fibres myélinisées.....	40
1.3. Organisation cellulaire et moléculaire des fibres myélinisées.....	41
1.3.1. Acquisition de la myélinisation au cours de l'évolution.....	41
1.3.2. Caractéristiques de la gaine de myéline internodale.....	43
1.3.3. Organisation de la région nodale.....	45
1.3.4. Contacts axogliaux au niveau des fibres myélinisées.....	46
1.3.4.1. <i>Jonctions axogliales au niveau des paranoeuds</i>	46
1.3.4.2. <i>Jonctions axogliales au niveau juxtaparanodal</i>	47
1.3.4.3. <i>Jonctions gliales internodales</i>	47
2. <u>Développement des cellules gliales et myélinisation du système nerveux périphérique</u>	
2.1. Les cellules gliales du SNP sont des dérivés de cellules de crête neurale, dont la survie et la différenciation dépendent notamment de signaux axonaux.....	48
2.1.1. Le lignage cellulaire des cellules de Schwann.....	48
2.1.2. Les signaux régulant la survie et la différenciation des cellules de Schwann..	51
2.2. Les différentes étapes de la myélinisation.....	53
2.2.1. Mécanismes moléculaires préparant la myélinisation.....	53
2.2.2. La formation de la gaine de myéline.....	55
2.2.3. Croissance des axones et segments myélinisés.....	58
2.3. Les cellules de Schwann sont des régulateurs majeurs du développement nerveux.....	59

2.3.1. Contrôle de la formation des nœuds de Ranvier.....	59
2.3.2. Contrôle de la survie et de l'organisation neuronale.....	59
2.3.3. Contrôle de la mise en place du périneurium.....	60
3. Rôle de Krox20 dans le processus myélinisation.....	60
3.1. L'expression de <i>Krox20</i> et sa régulation au cours du développement des cellules de Schwann.....	60
3.1.1. Deux membres de la famille des <i>Krox/Egr</i> , <i>Krox20</i> et <i>Krox24</i> , sont exprimés dans les cellules Schwann de façon complémentaire.....	60
3.1.2. Séquences régulatrices et facteurs impliqués dans la régulation de <i>Krox20</i> ...	62
3.2. L'altération de l'activité de Krox20 conduit à de graves défauts du processus de myélinisation.....	64
3.3. Des mutations ponctuelles de Krox20 ont été caractérisées dans des neuropathies humaines.....	67
RESULTATS.....	72
A - Résumé des résultats présentés dans l'article 1.....	72
B – Texte de l'article 1.....	72
C – Résumé des résultats présentés dans l'article 2.....	73
D – Texte de l'article 2.....	73
DISCUSSION.....	74
1. Rôles et régulations de l'activité de Krox20 au cours de la segmentation du rhombencéphale.....	74
1.1. Modèle proposé pour l'initiation de l'expression de <i>Krox20</i> dans le rhombencéphale	75
1.2. Intervention potentielle des cofacteurs de Krox20 dans la mise en place des territoires r3 et r5.....	77
1.3. Rôle des cofacteurs de Krox20 dans l'acquisition et le maintien de l'identité des rhombomères 3 et 5.....	79
1.4. Intervention potentielle des facteurs Nab dans l'extinction de Krox20.....	82

2. Rôle de Krox20 au niveau du système nerveux périphérique (SNP)	83
2.1. Les souris homozygotes <i>Krox20</i>^{I268F} développent des troubles liés à un défaut de myélinisation du SNP	83
2.1.1. Description des défauts observés chez les souris <i>Krox20</i> ^{I268F/I268F}	83
2.1.2. Les souris <i>Krox20</i> ^{I268F} comme modèle de Charcot-Marie-Tooth	86
2.1.3. Altérations moléculaires observées au cours du processus de myélinisation chez les animaux <i>Krox20</i> ^{I268F}	88
2.1.4. Comparaison du modèle murin <i>Krox20</i> ^{I268F} avec les modèles murins précédemment développés.	90
2.2. Les souris <i>Krox20</i>^{I268F/I268F} présentent des défauts au niveau des nerfs crâniens	
2.2.1. Description des défauts observés dans notre modèle et comparaison avec les modèles précédemment développés.	93
2.2.2. Les anomalies observées pourraient être liées à un défaut de cellules de crête neurale.	93
2.2.3. Les fusions des nerfs crâniens pourraient être liées à une altération de fonction des cellules de capsule frontière.	94
3. Rôle de l'interaction entre facteurs Krox/Egr et Nab dans différents systèmes	96
3.1. Les Nab sont exprimés sous le contrôle de Krox20 et d'autres Egr	96
3.2. Les Nab sont impliqués dans une boucle de régulation négative	96
3.3. Les Nab jouent également un rôle d'agonistes de Krox20 et des Egr	98
CONCLUSION	100
REFERENCES	101

INTRODUCTION

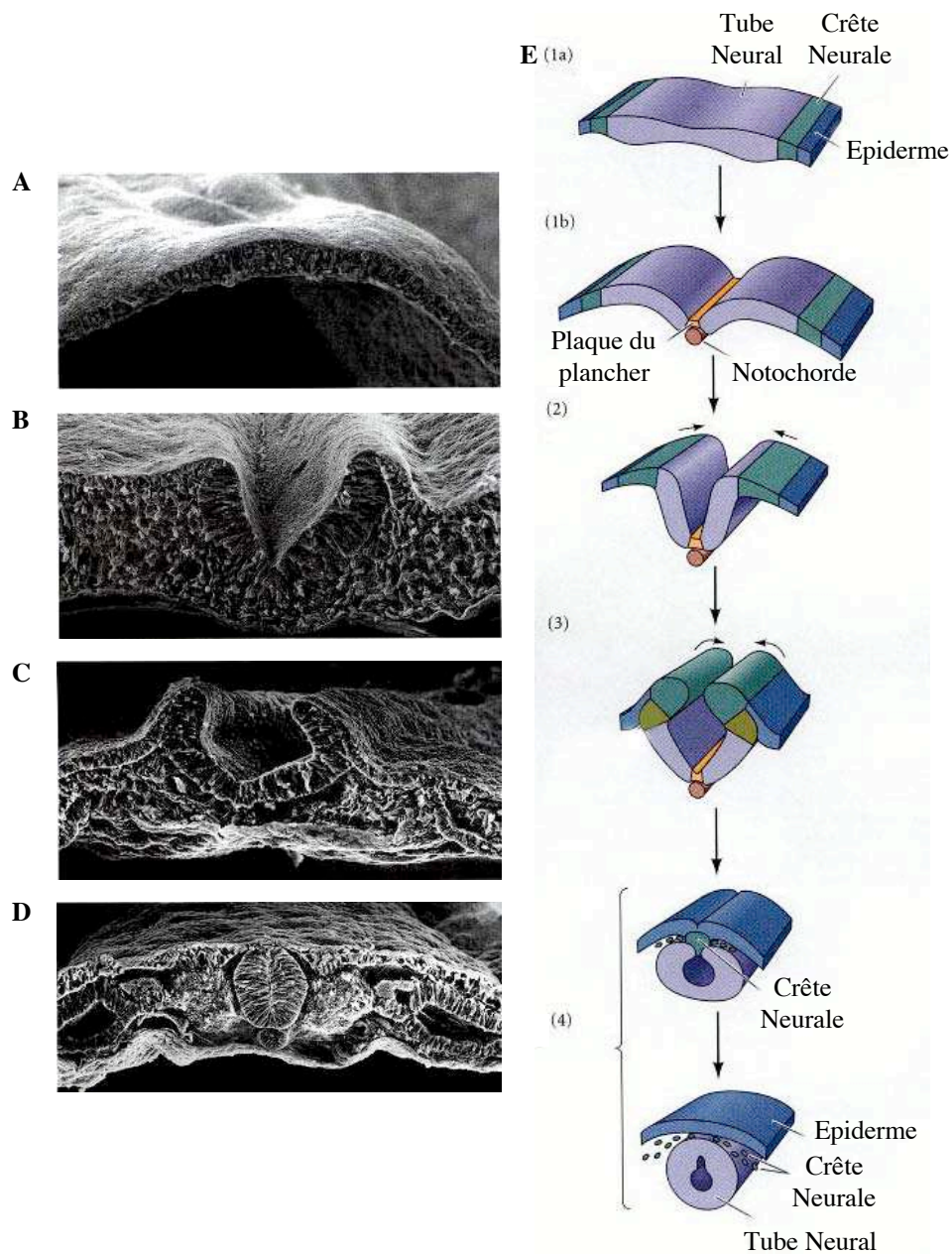


Figure 1 : Formation du tube neural

La plaque neurale se forme à partir de la zone médiane dorsale de l'épiderme (A). Il y a ensuite invagination de la plaque (B), soulèvement (C) puis fusion des bourrelets neuraux, aboutissant à la fermeture du tube (D).

E - Représentation schématique des différentes étapes de la neurulation

D'après Scott F. Gilbert, Developmental Biology, 7th edition, 2003

Le système nerveux des vertébrés dérive du feuillet ectodermique embryonnaire, qui participe également à la formation de l'épiderme, de la crête neurale et des placodes sensorielles. Son développement requiert successivement des processus d'induction, de régionalisation, de détermination et de différenciation, s'accompagnant de mouvements morphogénétiques assurant la formation du tube neural. Ces mécanismes aboutissent à la mise en place d'un système de communication reposant sur un réseau organisé de neurones, associés à des cellules de « soutien », les cellules gliales, qui assurent en réalité des fonctions complexes. L'élaboration du réseau neuronal nécessite la spécification des cellules neurales, la migration des neurones et l'allongement des axones vers les cellules-cibles, puis la formation de synapses avec ces dernières, et enfin un affinement des connexions synaptiques, avec élimination de certaines ramifications et mort de quelques cellules. On distingue chez les vertébrés le système nerveux central (SNC), formé de l'encéphale et de la moelle épinière, du système nerveux périphérique (SNP), qui comprend toutes les autres structures nerveuses. Le premier assure l'intégration et le traitement de l'information tandis que le second permet l'acquisition de l'information et la transmission des réponses.

Au cours de ma thèse, je me suis intéressée à certains mécanismes impliqués dans la régionalisation précoce du système nerveux central, en utilisant dans un premier temps l'embryon de poulet comme modèle, puis en générant un modèle murin, qui m'a également permis d'étudier des mécanismes associés à la mise en place du système nerveux périphérique et des aspects pathologiques pouvant les affecter.

I - Développement du système nerveux central des Vertébrés

1. Mécanismes généraux de la mise en place du SNC

1.1. Le phénomène de neurulation et l'induction neurale

La neurulation fait suite chez l'embryon à la gastrulation, qui aboutit à l'agencement des trois feuillets cellulaires primitifs, avec un feuillet interne nommé endoderme, un feuillet intermédiaire, le mésoderme, et un feuillet externe, l'ectoderme. Contrairement aux cellules ectodermiques adjacentes, qui se sont aplaties durant cette phase, les cellules ectodermiques dorsales se sont allongées et forment ainsi une structure épithéliale monocouche nommée plaque neurale (figure 1). Durant la neurulation, cette structure va être affectée par des mouvements morphogénétiques, la plaque se creusant en gouttière, puis ses bords s'épaississant et se soulevant pour former les bourrelets neuraux. L'enroulement progressif des bourrelets courbe la plaque jusqu'à ce qu'ils puissent se toucher et fusionnent dorsalement,

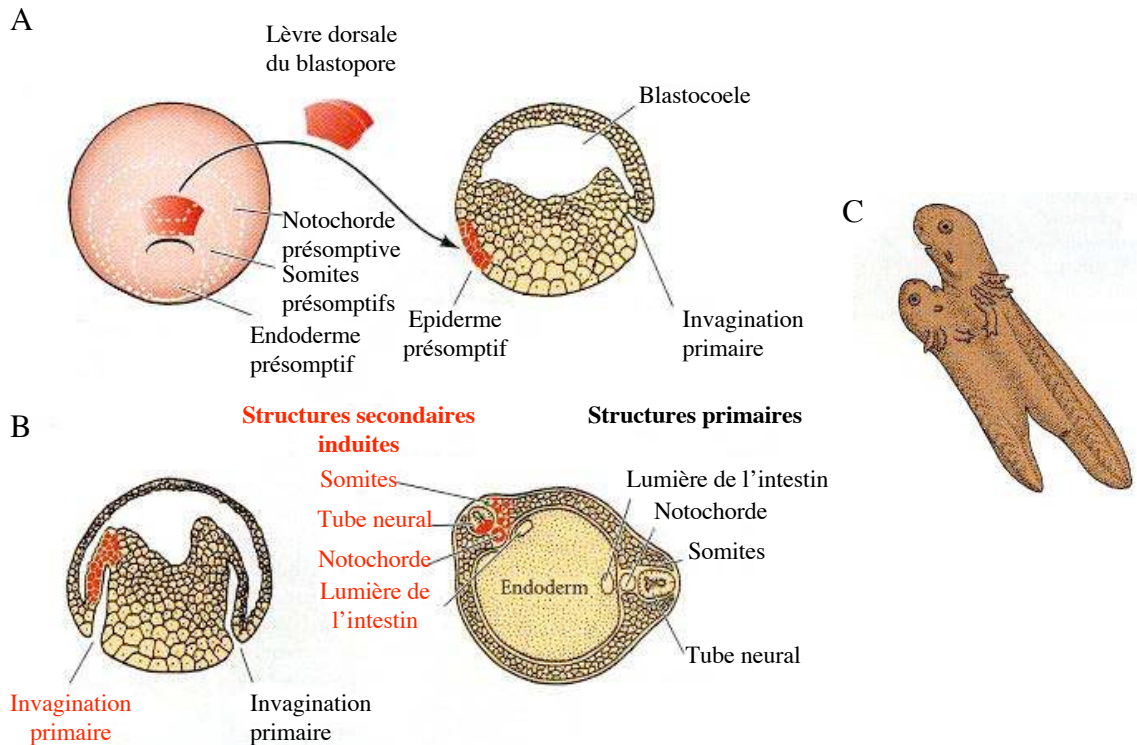


Figure 2 : Induction d'un second axe embryonnaire par la lèvre dorsale du blastopore

A - Schéma de l'expérience de Spemann et Mangold : la lèvre blastoporale d'une jeune gastrula est transplantée au niveau ventral d'un embryon de même stade.

B - Le tissu greffé s'invagine pour former un second axe complet, constitué du greffon (en rouge) mais également de tissu issu de l'hôte, aboutissant au développement d'un second têtard (C).

D'après Scott F. Gilbert, Developmental biology, 7th edition, 2003

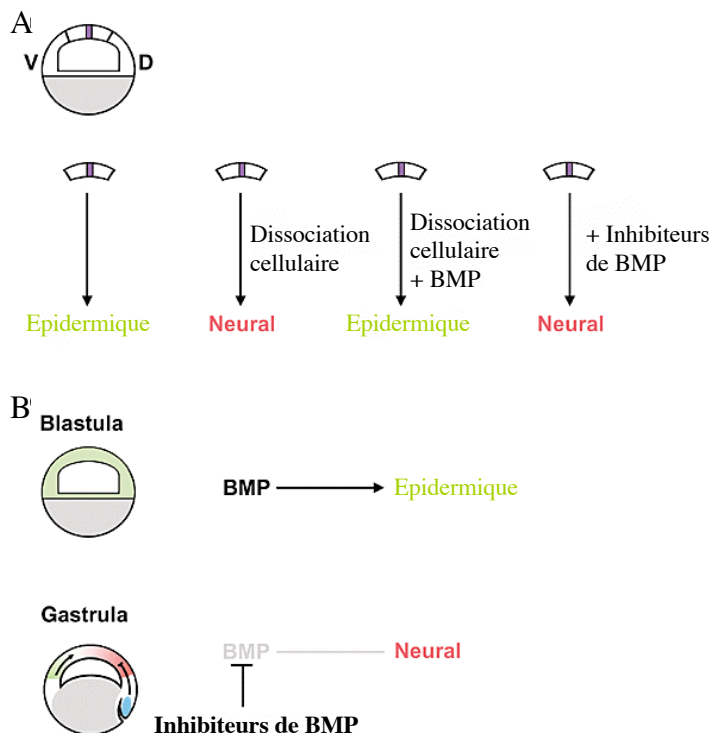


Figure 3 : Modèle de l'induction neurale par défaut

A - Mise en évidence du rôle des BMP dans l'induction neurale par étude *in vitro*. V : ventral, D : dorsal

B - Au stade blastula, les BMP sécrétés par l'ectoderme induisent l'identité épidermique et inhibent l'identité neurale. Lors de la gastrulation, l'organisateur (bleu) exprime des inhibiteurs des BMP, tels que Noggin, Chordin et la Follistatine.

Ceci permet à l'ectoderme de se différencier en tissu neural, son identité par défaut (rouge).

D'après Wilson et Edlund, 2001

formant un tube neural parallèle à l'axe antéro-postérieur de l'embryon. Ce tube neural s'individualise de l'épiderme présomptif sous-jacent grâce à des modifications d'adhérence des cellules. Si la neurulation se produit simultanément sur toute la plaque neurale chez les Amphibiens, elle débute dans la région céphalique chez le poulet et en plusieurs points de l'axe chez les Mammifères, pour s'étendre ensuite antérieurement et postérieurement dans les deux cas.

La formation de la plaque neurale nécessite une phase d'induction, au cours de laquelle les cellules du feuillet ectodermique de l'embryon reçoivent des signaux provenant des tissus adjacents, en particulier du mésoderme relocalisé à proximité de l'ectoderme par les mouvements morphogénétiques lors de la gastrulation, et sont ainsi spécifiées en précurseurs neuraux.

Les premières données relatives à l'induction neurale sont dues à l'expérience de Spemann et Mangold en 1924, qui ont réalisé des greffes de lèvres dorsales du blastopore de jeune gastrula de triton au niveau de l'ectoderme ventral d'embryons receveurs (figure 2). La greffe de ce groupe de cellules mésodermiques aboutit à la formation d'un second axe embryonnaire complet au niveau ventral de l'embryon hôte, organisé suivant son axe antéro-postérieur. La région greffée, capable d'induire la différenciation de l'épiderme en tissu neural, est appelé organisateur de Spemann. Des équivalents fonctionnels à cet organisateur décrit chez les Amphibiens ont ensuite été caractérisés dans d'autres modèles de vertébrés : le bouclier chez les Téléostéens et le nœud de Hensen chez les Sauropsidés et les Mammifères (Beddington, 1994; Sherbet and Lakshmi, 1967; Shih and Fraser, 1996). Chacune de ces structures est apte à induire du tissu neural en allogreffe comme en xénogreffe, montrant qu'elles émettent des signaux neuralisants et suggérant que la nature de ces signaux est de plus conservée phylogénétiquement.

Par la suite, des expériences *in vitro* ont permis de montrer que des explants ectodermiques issus du pôle animal de blastula ou jeune gastrula de Xénope se différenciaient en épiderme s'ils étaient cultivés intacts, mais qu'en cas de dissociation préalable des explants, les cellules adoptaient une identité neurale (figure 3, Godsave and Slack, 1989; Grunz and Tacke, 1989). Ces résultats suggéraient que l'identité par défaut des cellules ectodermiques était une identité neurale et qu'il existait des signaux diffusibles réprimant l'identité neurale de façon non autonome. Un argument en faveur du modèle par défaut était que le blocage de la voie des TGF β induit la différenciation d'explants ectodermiques en tissu neural *in vitro* (Hemmati-Brivanlou and Melton, 1992; Hemmati-Brivanlou and Melton, 1994) et qu'inversement BMP4, membre de la famille des TGF β , bloque la différenciation neurale des

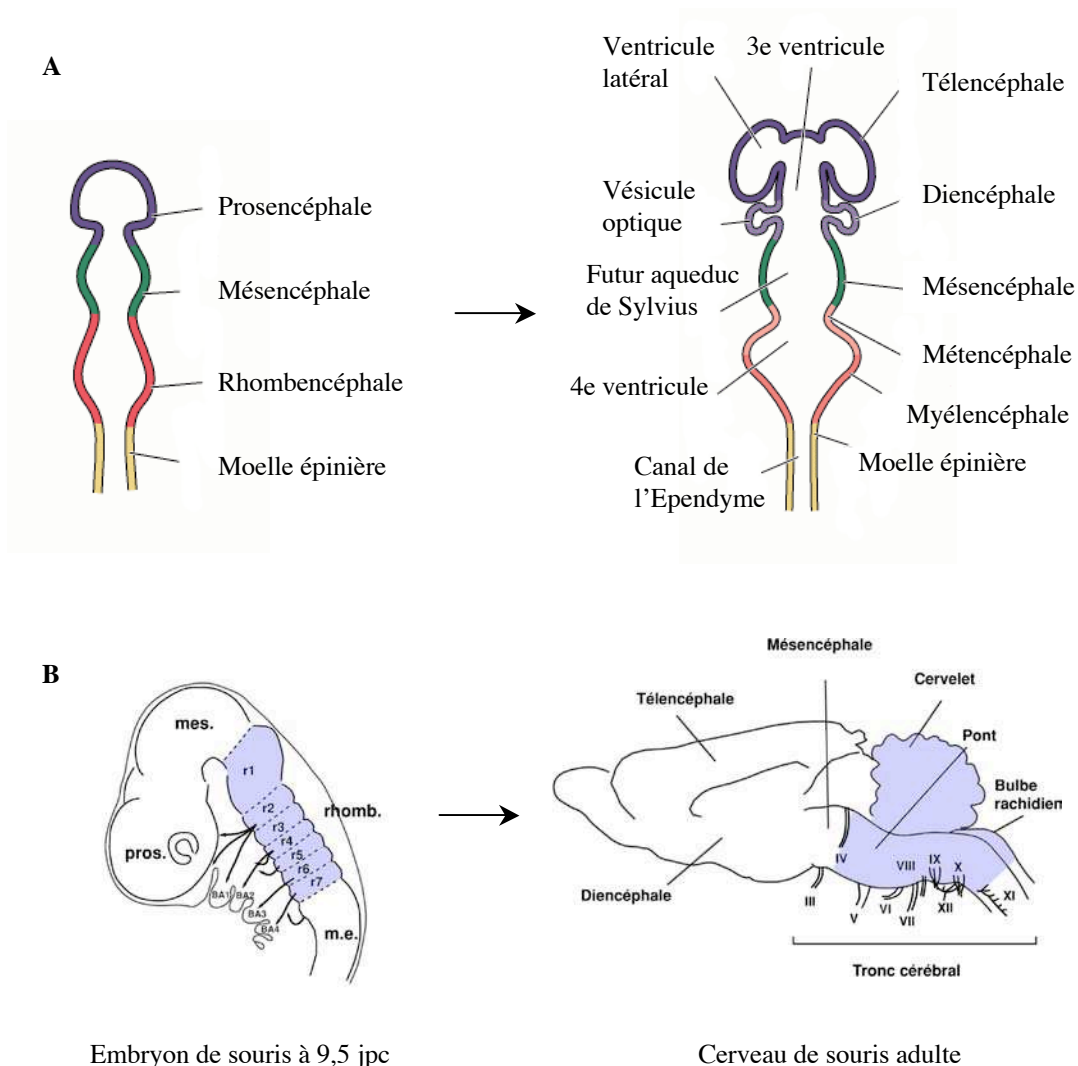


Figure 4 : Spécification régionale du cerveau embryonnaire et devenir chez l'adulte

A - Le tube neural se subdivise tout d'abord en trois vésicules, le prosencéphale, le mésencéphale et le rhombencéphale, la moelle épinière se différenciant à partir de la partie postérieure du tube. Ultérieurement, le prosencéphale se divise en télencéphale et diencéphale, tandis que le rhombencéphale donne le métencéphale et le myélencéphale. Ces vésicules constituent les prémices des divisions fonctionnelles du futur cerveau, les cavités qu'elles renferment constituant par la suite les ventricules cérébraux.

B - Le rhombencéphale est la vésicule la plus postérieure du cerveau embryonnaire des vertébrés. Il est à l'origine des structures postérieures du cerveau adulte : le cervelet, le pont et le bulbe rachidien. Il participe également à la formation des nerfs crâniens III à XI.

En violet, le rhombencéphale et ses structures dérivées. pros. : prosencéphale, més. : mésencéphale, rhomb. : rhombencéphale, m.e. : moelle épinière, BA : arc branchial.

D'après Purves, Neurosciences, 2^e édition, 1999

cellules ectodermiques dissociées et leur confère un devenir épidermique (Wilson and Hemmati-Brivanlou, 1995). De plus, il a été montré que divers facteurs inhibant l'activité des BMP par interaction directe avec ces facteurs ou avec leurs récepteurs, sont sécrétés par l'organisateur de Spemann et possèdent une activité neuralisante (Piccolo, 96 ; Hansen et al., 97 ; Iemura, 98). Enfin, *in vivo*, BMP4 et BMP7 sont initialement exprimés dans tout l'ectoderme, puis, lors de l'apparition de l'organisateur de Spemann, l'expression s'éteint dans le neuroderme présomptif (Fainsod et al., 1994), probablement sous l'action de leurs inhibiteurs sécrétés par l'organisateur.

Cependant, ce modèle a depuis lors été remis en cause et l'on sait actuellement que la répression des BMP n'est ni nécessaire ni suffisante à l'induction neurale, et qu'il existe donc probablement également des signaux promouvant la différenciation neurale. Le premier élément contredisant le modèle par défaut est l'existence d'une activation de marqueurs neuraux avant le début de la gastrulation, tels que *Sox3*, *Cyp26* ou ERNI (Kudoh et al., 2004; Penzel et al., 1997; Streit et al., 2000; Wilson et al., 2000), suggérant une spécification plus précoce du tissu neural. De plus, des expériences d'ablation chirurgicale de l'organisateur chez le poisson-zèbre, le Xénope et les amniotes (Shih and Fraser, 1996; Wilson and Edlund, 2001) ont montré que le système nerveux pouvait se former en son absence et des résultats similaires ont été obtenus après ablation génétique, dans le cas d'un mutant de la voie Nodal chez le poisson-zèbre ou du mutant HNF3 β chez la souris (Ang and Rossant, 1994; Gritsman et al., 1999; Klingensmith et al., 1999; Shimizu et al., 2000). Il peut exister des structures capables de relayer l'organisateur en son absence, mais le fait que le tissu neural semble spécifié avant la sécrétion des signaux inhibiteurs des BMP laisse penser qu'en réalité ils agissent en aval, puis éventuellement en parallèle d'autres facteurs de spécification.

Chez les Anamniotes, la voie Wnt canonique, active avant et durant la gastrulation dans l'ectoderme dorsal, est nécessaire et suffisante à la répression de BMP4, et pourrait donc assurer le rôle de répression des BMPs avant la gastrulation (Baker et al., 1999). Au contraire, chez le poulet, la voie Wnt active les BMPs et favorise un destin épidermique en diminuant la capacité des cellules épiblastique à répondre au FGF, qui joue un rôle neuralisant précoce. Ce rôle des FGF repose sur une répression des BMP, mais également sur un phénomène d'induction indépendant de ces facteurs (Wilson et al., 2001). On peut également ajouter à ce modèle l'action parallèle des IGF, également capables d'induire un destin neural au sein de l'ectoderme (Pera et al., 2001).

Par ailleurs, d'autres structures semblent nécessaires à la formation du système nerveux antérieur (prosencephale) chez les Amniotes, tel l'endoderme viscéral antérieur (AVE) chez la

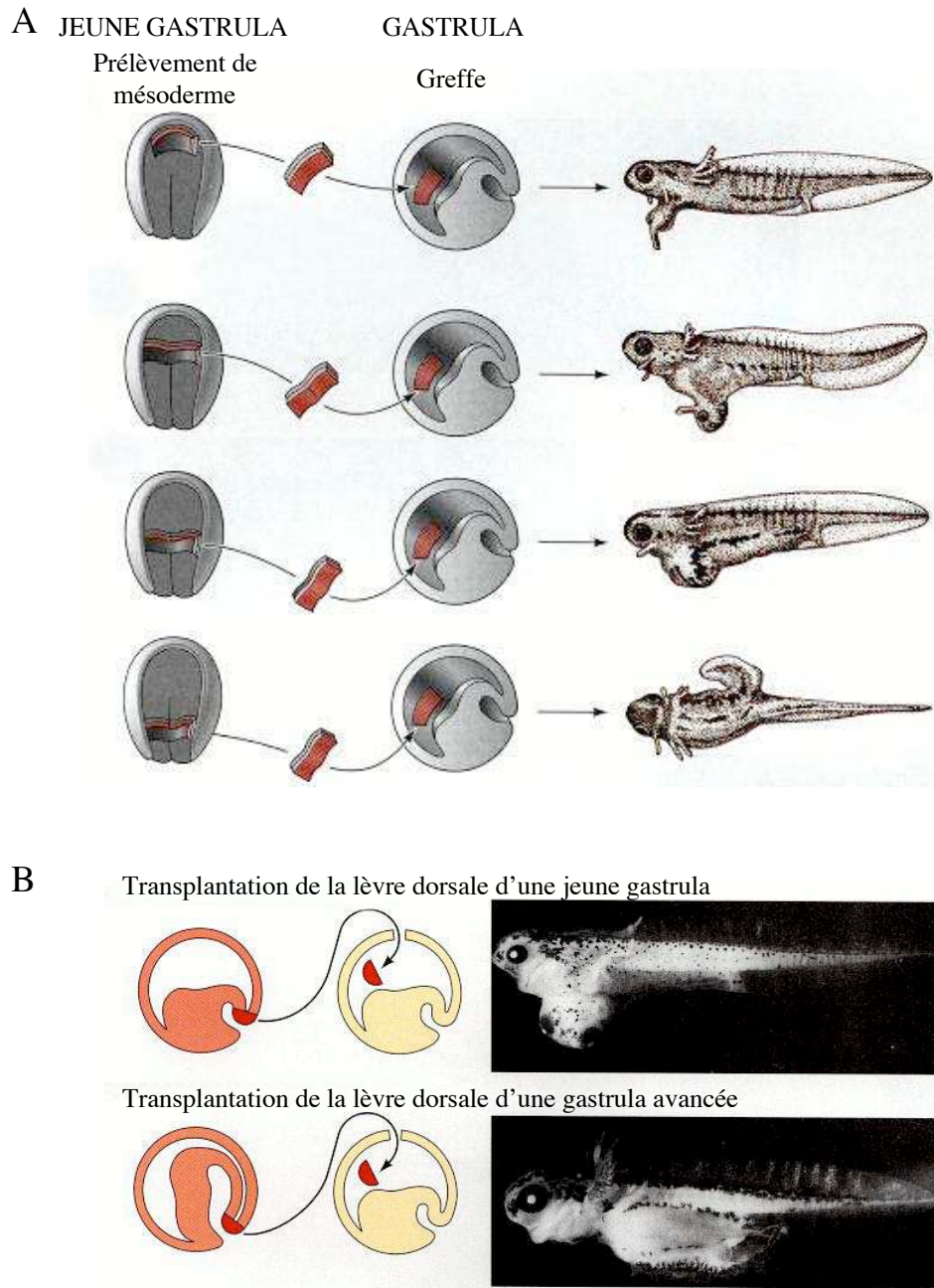


Figure 5 : Evolutions spatiales et temporelles des propriétés de l'organisateur

A - Expérience de Mangold (1933). Menée chez l'Urodèle, cette étude consiste en la greffe de régions du toit de l'archentéron, contenant du mésoderme axial, dans le blastocoele d'un embryon hôte. Elle a permis de montrer que des greffons prélevés à différents niveaux antéro-postérieurs induisent chez l'hôte des structures axiales différentes, des greffons antérieurs induisant des structures antérieures et des greffons postérieurs des structures postérieures.

B - Expérience de Spemann. Les propriétés de l'organisateur évoluent au cours de la gastrulation. Une greffe de la région de l'organisateur prélevée sur une jeune gastrula induit des structures antérieures dorsales, une greffe de la même région d'une gastrula âgée induit des structures plus postérieures.

D'après Stern, 2001 et Scott F.Gilbert, Developmental Biology, 7th edition, 2003

souris ou l'hypoblaste chez le poulet (Eyal-Giladi, 1970; Thomas and Beddington, 1996). Cependant, ces structures à elles-seules ne peuvent induire du tissu neural et ne sont donc pas des organisateurs à part entière (Tam and Steiner, 1999).

1.2. Régionalisation du primordium neural

1.2.1. Formation et dérivés des territoires céphaliques

La première manifestation visible de la régionalisation du système nerveux central est la formation le long de l'axe antéro-postérieur de constriction successives alternant avec des renflements, correspondant aux vésicules céphaliques (figure 4). Les trois premières vésicules se forment rostralement, dès la fermeture du tube neural à ce niveau. Elles définissent déjà les principales subdivisions du futur SNC : le prosencéphale (ou cerveau antérieur), le mésencéphale (ou cerveau moyen), le rhombencéphale (ou cerveau postérieur) et la moelle épinière. Parallèlement à la fermeture caudale du tube, une nouvelle constriction apparaît au niveau du prosencéphale. La vésicule la plus antérieure est dite télencéphalique et donnera naissance aux hémisphères cérébraux, aux bulbes olfactifs et aux ganglions de la base, la seconde, dite diencephalique, formera chez l'adulte le thalamus, l'hypothalamus, la rétine et le nerf optique, ainsi que la partie neurale de la glande hypophysaire. Le mésencéphale participe à la formation du tectum optique, du tegmentum et du cervelet. Enfin, le rhombencéphale donne naissance au métencéphale, qui forme chez l'adulte une partie du cervelet et le pont, et au myélencéphale, primordium du bulbe rachidien et des nerfs craniens IV à XII. Il n'y a pas d'individualisation morphologique marquée entre le rhombencéphale postérieur et la moelle épinière, qui participe chez l'adulte au contrôle moteur et sensoriel du tronc et des membres via les nerfs spinaux.

1.2.2. Mécanismes moléculaires de la régionalisation antéro-postérieure

Bien avant l'apparition de la subdivision morphologique du tube neural, une régionalisation de la plaque neurale se met en place, chacune des cellules recevant une information de position, lui indiquant sa localisation selon les axes antéro-postérieur et dorso-ventral.

1.2.2.1. Mécanismes moléculaires liés à l'induction neurale

Deux modèles principaux sont proposés pour rendre compte de la régionalisation antéro-postérieure de la plaque neurale. Le premier, proposé dans les années 1930 suite aux expériences d'Otto Mangold (figure 5A), repose sur le fait que chez la gastrula de triton, un

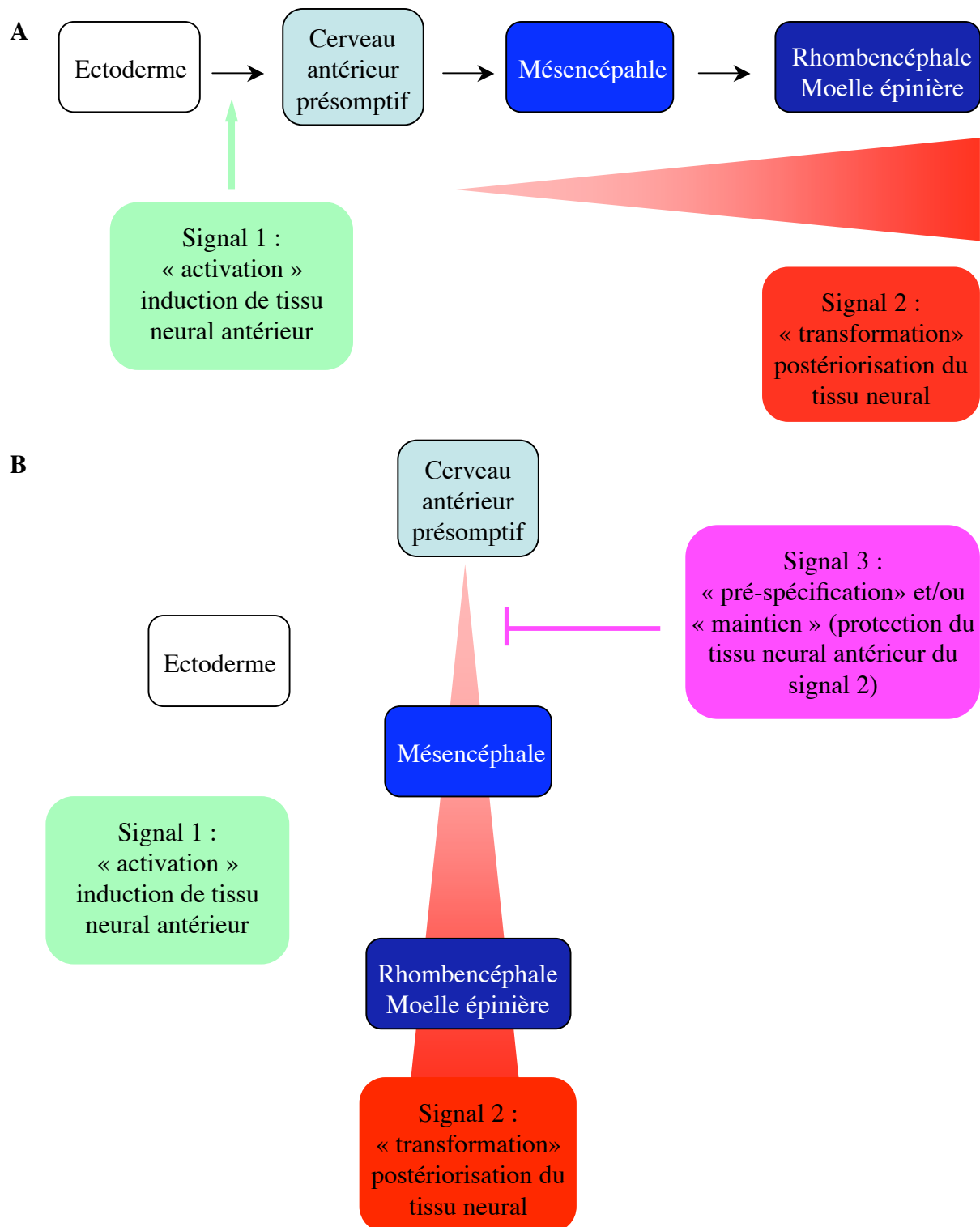


Figure 6 : Modèle d'activation-transformation de Nieuwkoop et évolution de ce modèle

A - Le modèle de Nieuwkoop propose une induction neurale en deux étapes, avec une induction initiale du cerveau antérieur, puis une postériorisation. Les signaux activateurs et transformants sont produits par l'organisateur.

B - Une modification de ce modèle intègre des données plus récentes en incluant un troisième signal assurant la compétence de l'ectoderme aux signaux activateurs et en protégeant le cerveau antérieur des signaux transformants postériorisants.

D'après Stern, 2001

greffon prŽlevŽ ^ diffŽrents niveaux AP de l'organisateur va induire des structures distinctes de type antŽrieur ou postŽrieur. Ce modŽle propose donc l'existence de plusieurs organisateurs induisant les diffŽrentes parties du systŽme nerveux (pour Stern, 2001). ParallŽlement, Spemann montre que les capacitŽs inductrices de l'organisateur Žvoluent avec le temps, un organisateur prŽcoce induisant plutŽt des structures antŽrieures et un organisateur tardif des structures postŽrieures (figure 5B). Il est alors proposŽ que l'organisateur a des propriŽtŽs inductives distinctes dans l'espace et dans le temps, d'oÙ dŽcoule la diversitŽ des identitŽs antŽre et postŽrieures du neurectoderme.

Dans les annŽes 1950, Nieuwkoop propose le modŽle d'activation/transformation, une premiŽre Žtape conduisant ^ l'acquisition d'une identitŽ neurale purement antŽrieure, suivie d'une seconde Žtape de postŽriorisation, une partie du tissu antŽrieur se transformant en une seconde vague de structures distinctes dans l'espace et dans le temps, d'oÙ dŽcoule la diversitŽ des identitŽs antŽre et postŽrieures du neurectoderme.

terminale avec le domaine à doigts-de-zinc de Krox20 (Gillian and Svaren, 2004). Cette interaction, étudiée dans des cultures cellulaires, réprime l'activité inductrice de Krox20 sur des constructions rapportrices et sur un promoteur endogène, celui d'IGF2. Elle a également été montrée comme inhibant l'action positive de Krox20 sur l'élément régulateur intronique du gène de myéline P0, au même titre que les Nab (LeBlanc et al., 2006). Cette répression semble médiée dans certains cas par l'intervention des complexes de modification chromatinienne de type HDAC.

Le dernier cofacteur décrit pour Krox20 est le facteur HCF-1 (Host Cell Factor 1). Le facteur HCF-1 humain est synthétisé sous forme d'un précurseur de 2035 acides aminés, subissant par la suite des clivages auto-catalytiques au niveau de six sites répétés nommés HCF-pro composés de 26 acides aminés chacun. Les parties N-terminale et C-terminale restent par la suite associées entre elles de façon non-covalente via l'interaction des domaines SAS (Self-Association Sequence). Les autres domaines caractérisés au niveau de cette protéine sont en partie N-terminale un domaine Kelch (par homologie avec la drosophile) correspondant à un domaine β -propeller et un domaine basique, la partie C-terminale contenant un domaine acide activateur transcriptionnel et une séquence de localisation nucléaire (pour revue, voir Wysocka and Herr, 2003). Il existe chez les Mammifères deux facteurs de la famille HCF, HCF-1 et HCF-2, dont les implications fonctionnelles sont moins connues, tandis qu'un seul gène homologue aux HCF a été caractérisé à ce jour chez le poulet. HCF-1 est un facteur ubiquitaire d'abord caractérisé pour son interaction avec la protéine VP16 du Virus Herpes Simplex (Gerster and Roeder, 1988) et dont le domaine de transactivation est important pour l'activité inductrice de VP16 (Gerster and Roeder, 1988). HCF-1 interagit également avec divers facteurs cellulaires, notamment des facteurs de transcription, le plus souvent via son domaine β -propeller localisé dans la partie N-terminale de la protéine (Freiman and Herr, 1997; Lu and Misra, 2000; Lu et al., 1997; Lu et al., 1998), comme c'est le cas pour son interaction avec VP16 (Wysocka and Herr, 2003). Un certain nombre d'interaction d'HCF-1 avec des facteurs de transcription sont cependant médiés par un domaine plus central de la protéine, présentant un caractère basique. HCF-1 interagit également avec des enzymes de modification des histones, comme la désacétylase Sin3 ou la méthyltransférase Set1, suggérant un rôle d'HCF-1 à plusieurs niveaux dans le processus transcriptionnel (Wysocka et al., 2003).

Les facteurs interagissant avec HCF-1 via son domaine β -propeller possèdent habituellement un domaine HBM (HCF Binding Motif) du type D/EHXY (Freiman and Herr, 1997; Lu and Misra, 2000; Lu et al., 1998; Mahajan et al., 2002; Wysocka et al., 2003). Ce type de motif a été caractérisé au niveau du second domaine acide de Krox20, et une étude

menée par co-transfection dans des cultures cellulaires a montré que l'élimination de ce domaine conduit à une baisse d'activation de constructions rapportrices en présence de Krox20 et HCF-1, suggérant qu'HCF-1 jouerait un rôle de co-activateur (Luciano and Wilson, 2003).

Les données présentées dans cette première partie d'introduction montrent que le phénomène de segmentation du rhombencéphale joue un rôle majeur lors du développement des vertébrés et que l'activité du facteur Krox20 est capitale durant ce processus, par la régulation de diverses cibles transcriptionnelles permettant la définition d'une alternance entre territoires d'identité paire et territoires d'identité impaire. Les mécanismes moléculaires sous-jacents et le rôle de ses cofacteurs pour la régulation de son activité sont encore peu connus *in vivo*. Nous avons donc réalisé une étude structure-fonction du facteur Krox20 par des expériences d'électroporation chez l'embryon de poulet afin de mieux caractériser les domaines impliqués dans ses diverses activités lors du développement du rhombencéphale et nous avons également étudié de façon détaillée le rôle de l'interaction de Krox20 avec deux de ses interacteurs, Nab et HCF-1, lors de ce processus. Cette étude, dont les résultats sont présentés dans l'article 1, a permis de montrer que la régulation par Krox20 de ses cibles transcriptionnelles au niveau du rhombencéphale est un processus complexe impliquant divers domaines de la protéine régulant chacun une ou plusieurs cibles transcriptionnelles, suggérant l'existence de classes de gènes finement co-régulés, possiblement en rapport avec leur fonction durant la segmentation. Nos données confèrent de plus pour la première fois un rôle *in vivo* à l'interaction entre Krox20 et HCF-1, suggérant qu'elle est essentielle pour la capacité de Krox20 à s'autoactiver et à induire *Nab*. HCF-1 jouerait donc un rôle majeur dans le contrôle de l'expression et de l'activité de Krox20, par son implication à la fois dans les boucles de régulation positive et négative de Krox20. En effet, nos données confirment un rôle de répresseur global de l'activité positive de Krox20 pour les *Nab*. Afin de mieux caractériser le rôle de cette interaction, à la fois au niveau du système nerveux central et périphérique, nous avons généré une lignée de souris portant la mutation ponctuelle abolissant l'interaction entre Krox20 et Nab, cette mutation étant par ailleurs associée à une pathologie grave du système nerveux périphérique chez l'homme. La seconde partie de l'introduction concerne plus particulièrement ce second projet de thèse.

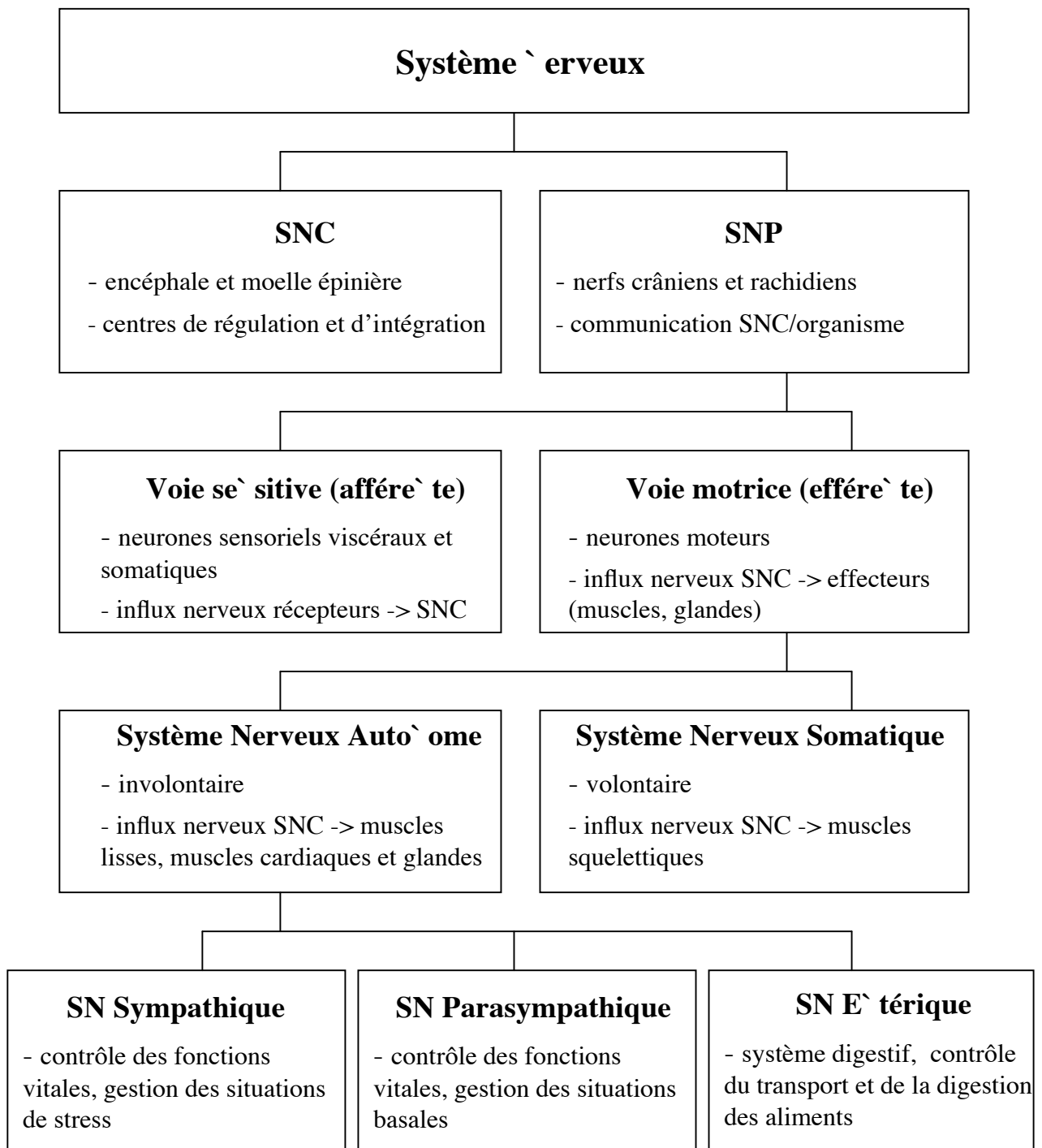


Figure 25 : Divisions fonctionnelles du système nerveux des vertébrés

SN : système nerveux, SNC : système nerveux central, SNP : système nerveux périphérique

II - Développement du système nerveux périphérique des Vertébrés

1. Présentation générale du système nerveux périphérique

1.1. Description anatomique du système nerveux périphérique

Le système nerveux périphérique (SNP) est classiquement subdivisé en deux ensembles : le système nerveux somatique et le système nerveux autonome (figure 25). La composante somatique est associée aux mouvements volontaires et réflexes ; elle innerve les muscles du tronc et des membres, les articulations et les tendons. La composante autonome contrôle les fonctions végétatives telles que la constriction et la dilatation des vaisseaux, la contraction des viscères et la sécrétion des glandes, ainsi que le rythme cardiaque et le rythme respiratoire. La partie autonome du SNP comporte elle-même deux voies parallèles aux rôles souvent antagonistes, les composantes sympathique et parasympathique. La première permet de mobiliser l'organisme dans des conditions de stress par augmentation de l'afflux sanguin et des rythmes cardiaque et respiratoire, via la libération de noradrénaline au niveau synaptique. La seconde assure le maintien des fonctions vitales à l'état basique, le neurotransmetteur associé étant l'acétylcholine.

Le système nerveux périphérique possède deux composantes anatomiques principales : d'une part, les ganglions crâniens et rachidiens (ou DRG, pour Dorsal Root Ganglia), zones où s'accumulent les corps cellulaires neuronaux et des cellules de soutien, d'autre part l'ensemble des nerfs crâniens et rachidiens, faisceaux d'axones associés à des cellules de soutien qui émergent respectivement de l'encéphale et de la moelle épinière de façon régulière.

Chez les mammifères, il existe une trentaine de paires bilatérales de nerfs rachidiens (figure 26), émergeant au niveau de chacune des vertèbres de la colonne vertébrale. Les nerfs rachidiens sont tous de nature mixte, c'est-à-dire présentant une composante sensitive et une composante motrice. Chaque nerf possède deux points d'attache à la moelle épinière : la racine dorsale, qui ne contient que les axones des neurones sensoriels, dont les corps cellulaires sont localisés au niveau des DRG, et la racine ventrale, ne comprenant que des projections motrices. Les deux racines se rejoignent à l'arrière du DRG du nerf considéré. Les nerfs crâniens, présentés plus haut (introduction I.2.2.1 et figure 11), ne seront pas décrits en détail ici. On peut cependant rappeler que si certains d'entre eux sont également de type mixte (V, VII, IX, X, XI), d'autres sont purement sensitifs (I, II et VIII) ou purement moteurs (III, IV, VI et XI).

Les axones et les ganglions sensitifs du SNP collectent des informations à la surface ou à l'intérieur du corps et les transmettent au système nerveux central. Les cellules nerveuses des ganglions sensitifs projettent leurs axones vers la périphérie, leurs extrémités aboutissant au

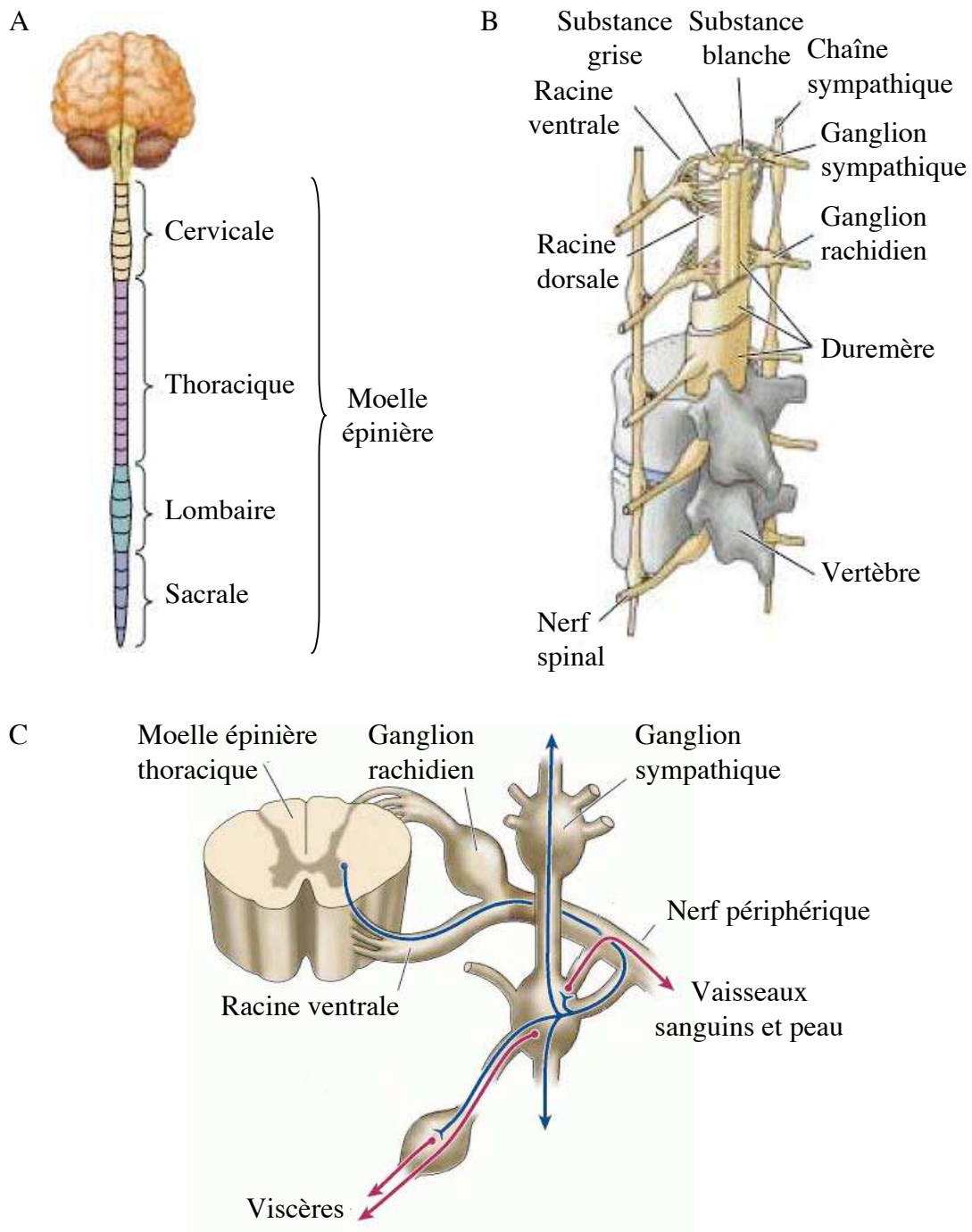


Figure 26 : Anatomie du système nerveux

A - Représentation schématique en vue longitudinale du système nerveux central, comprenant le cerveau et la moelle épinière, dont les principales sous-parties sont indiquées.

B - Agrandissement d'une partie de la moelle épinière et des nerfs périphériques associés. Les nerfs rachidiens émergent de façon régulière de la moelle épinière selon l'axe antéro-postérieur. Les chaînes sympathiques sont organisées selon l'axe antéro-postérieur, parallèlement à la moelle épinière.

C - Représentation schématique d'un segment de moelle épinière et du nerf périphérique associé. Les motoneurones issus de la moelle épinière sont représentés en bleu. Ils forment des synapses avec les neurones autonomes situés dans les ganglions sympathiques. Les neurones sensitifs autonomes et somatiques (non représentés) projettent directement vers leurs cibles.

D'après Purves, Neurosciences, 2^e édition, 1999

niveau de récepteurs spécialisés opérant la transduction des informations d'une large gamme de stimuli. Les prolongements centraux de ces cellules pénètrent dans la moelle épinière ou le tronc cérébral, dont les cellules relayent les informations reçues après intégration vers diverses parties du cerveau. Les axones moteurs du SNP, dont les corps cellulaires sont localisés dans le SNC, connectent les neurones moteurs du tronc cérébral ou de la moelle aux muscles et aux viscères. On distingue les motoneurones somatiques, qui innervent les muscles squelettiques, comme nous l'avons vu précédemment, des motoneurones végétatifs, composant le système nerveux autonome. Les ganglions sympathiques et parasympathiques sont eux-mêmes innervés par des neurones pré-ganglionnaires situés dans la moelle épinière. Enfin, le système nerveux autonome présente une composante relativement indépendante, le système nerveux entérique, malgré son innervation sympathique et parasympathique. Le système nerveux entérique comprend en effet un abondant réseau intrinsèque de neurones sensitifs, d'interneurones et de neurones moteurs reliant les différentes parties de l'intestin et permettant leur coordination. Les messages sensoriels issus des viscères modulent l'activité du système végétatif, les fibres afférentes des nerfs VII, IX et X projetant par exemple vers le noyau solitaire, impliqués dans divers réflexes végétatifs essentiels. Par ailleurs, certaines fibres sensibles des nerfs sympathiques, dites nociceptives, sont associées à la génération de la sensation de douleur.

1.2. Aspects fonctionnels des fibres myélinisées

Dès les années 1880, Ramon y Cajal décrivait la morphologie de différentes classes de neurones. Il montrait en particulier qu'ils sont distincts les uns des autres, organisés en réseau, et qu'ils possèdent de nombreuses ramifications, dont la taille peut être de l'ordre du mètre. Un neurone est une cellule hautement différenciée dont l'organisation stéréotypée comprend tout d'abord un corps cellulaire ou soma, avec des dendrites (figure 27A). C'est au niveau de ces dernières que les neurones reçoivent des informations, la morphologie et la taille des dendrites influençant la capacité d'intégration du neurone. Le corps cellulaire est poursuivi par un segment initial au niveau duquel sont générés les potentiels d'action, correspondant au moyen de coder le message élaboré après intégration des informations reçues. Ce message est relayé par conduction le long de l'axone sous forme d'une différence de potentiel transmembranaire, qui se propage par la génération de flux d'ions à travers des canaux Na^+ voltage-dépendant créant des variations de distribution de charge de part et d'autre de la membrane (figure 27B). Ce message électrique est ensuite transmis aux cellules en aval du neurone (neurones du réseau ou cellules effectrices), généralement par traduction en message chimique via la libération de neurotransmetteur au niveau de synapses.

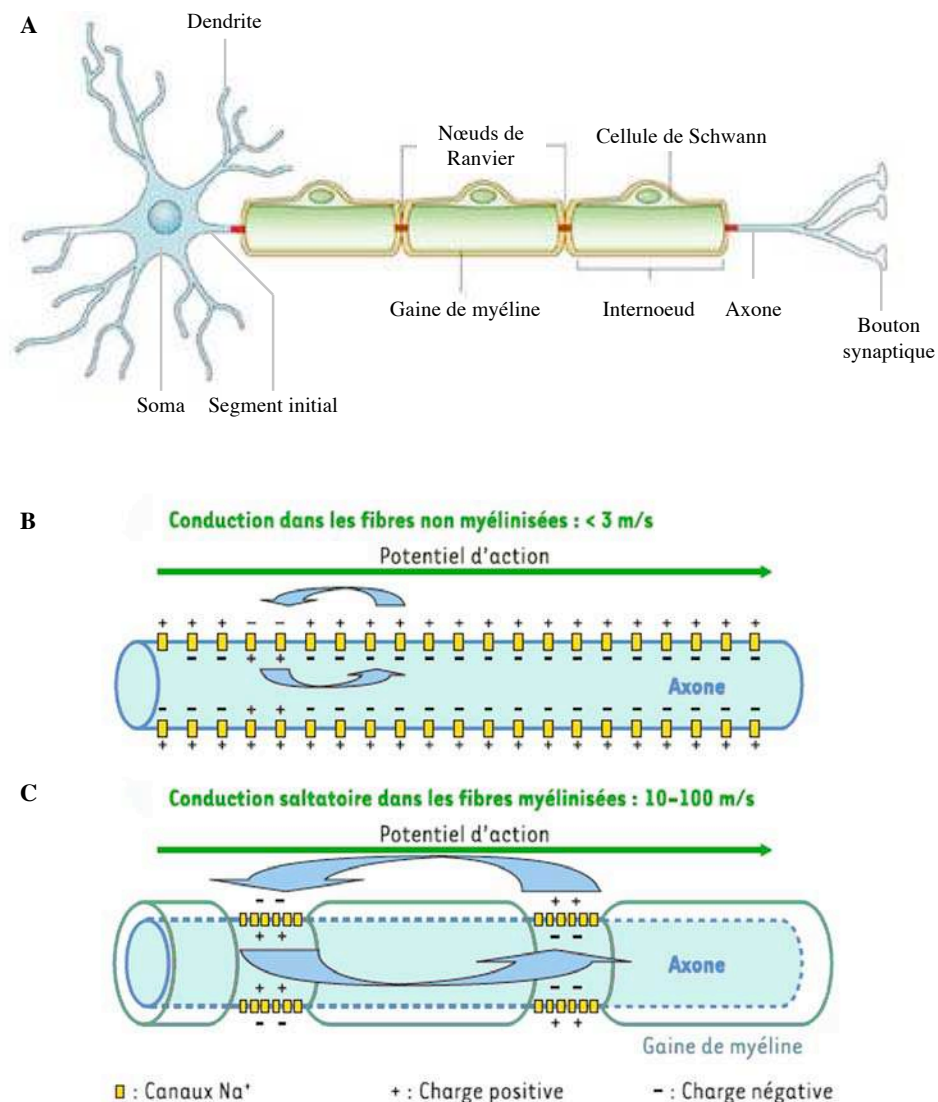


Figure 27 : Fibres myélinisées et conduction de l'influx nerveux

A - Organisation des fibres myélinisées. Le neurone reçoit au niveau de ses dendrites les informations qui sont intégrées au niveau du corps cellulaire et qui peuvent conduire à la génération de potentiels d'action au niveau du segment initial. Les trains de potentiels d'action sont ensuite propagés le long de l'axone et sont transformés en un message chimique (cas des synapses chimiques) relayé vers les cibles du neurone (neurone en aval, fibres musculaires,...)

B et C - Conduction de l'influx nerveux le long de fibres non myélinisées et myélinisées. Les potentiels d'action sont propagés via des flux d'ions Na⁺ à des travers des canaux voltage-dépendants, modifiant la répartition de charge de part et d'autre de la membrane. Dans les fibres non myélinisées (B), la distribution homogène des canaux Na⁺ voltage-dépendants le long de l'axone induit une transmission continue des potentiels d'action, d'où une faible vitesse de propagation. Dans les fibres myélinisées (C), les canaux sont localisés uniquement au niveau des nœuds de Ranvier, assurant ainsi une conduction saltatoire rapide.

D'après Poliak et Peles, 2003 et Oguievetskaia et *al.*, 2005

L'efficacité du système nerveux périphérique pour la transmission des informations entre l'organisme et le système nerveux central repose en grande partie sur la vitesse de conduction du message, parfois relayé sur des distances importantes. Une première adaptation, développée notamment chez les invertébrés, est l'augmentation du diamètre des axones, qui améliore la vitesse de conduction. Cependant, le développement de ce système, qui induit un accroissement important de l'encombrement et de la masse des fibres nerveuses, reste limité. Chez les vertébrés, une alternative a été mise en place par accumulation de canaux Na^+ voltage-dépendants au niveau de régions régulièrement espacées sur l'axone, définissant des zones spécialisées nommées nœuds de Ranvier. Les régions comprises entre deux nœuds, dites internœuds, possèdent une longueur variable dépendant du diamètre de l'axone et sont myélinisées par des cellules gliales, correspondant aux cellules de Schwann dans le SNP et aux oligodendrocytes dans le SNC. Ces cellules génèrent une gaine isolante autour de l'axone, augmentant ainsi la résistance et diminuant la conduction au niveau de la membrane des segments myélinisés. Ce processus limitant les flux ioniques transmembranaires aux régions nodales induit une conduction saltatoire du message électrique, augmentant d'autant la vitesse de propagation des potentiels d'action (figure 27B). Il faut noter qu'au niveau des nerfs existent également des fibres nerveuses de faible diamètre non myélinisées (diamètre inférieur à $1\text{ }\mu\text{m}$), dont l'axone est généralement entouré par des cellules de Schwann non myélinisantes, chacune gainant plusieurs axones non myélinisés.

1.3. Organisation cellulaire et moléculaire des fibres myélinisées

1.3.1. Acquisition de la myélinisation au cours de l'évolution

La formation d'une gaine de myéline compacte dans le système nerveux périphérique et central est une spécificité des Gnathostomes, les vertébrés à mâchoire, tandis que les poissons agnathes en sont totalement dépourvus (Bullock et al., 1984). L'apparition de la gaine de myéline remonterait à environ 440 millions d'années, mais ses caractéristiques initiales restent à l'état de supposition. Par ailleurs, on retrouve chez certains invertébrés (annélides, crustacés, mollusques et arthropodes) des pseudo-gaines formées par des cellules gliales autour des axones. Si elles permettent également une amélioration de la conduction le long des nerfs, leur organisation diffère profondément de la gaine de myéline des Gnathostomes, laissant ouverte l'hypothèse d'une acquisition indépendante au cours de l'évolution (Waehneldt, 1990).

Il est intéressant de noter qu'il existe cependant au niveau de la myéline des vertébrés un type de jonction axo-gliale particulière rappelant les jonctions septées des invertébrés (figure 28). De plus, les homologues de protéines impliquées au niveau de ces dernières, la protéine

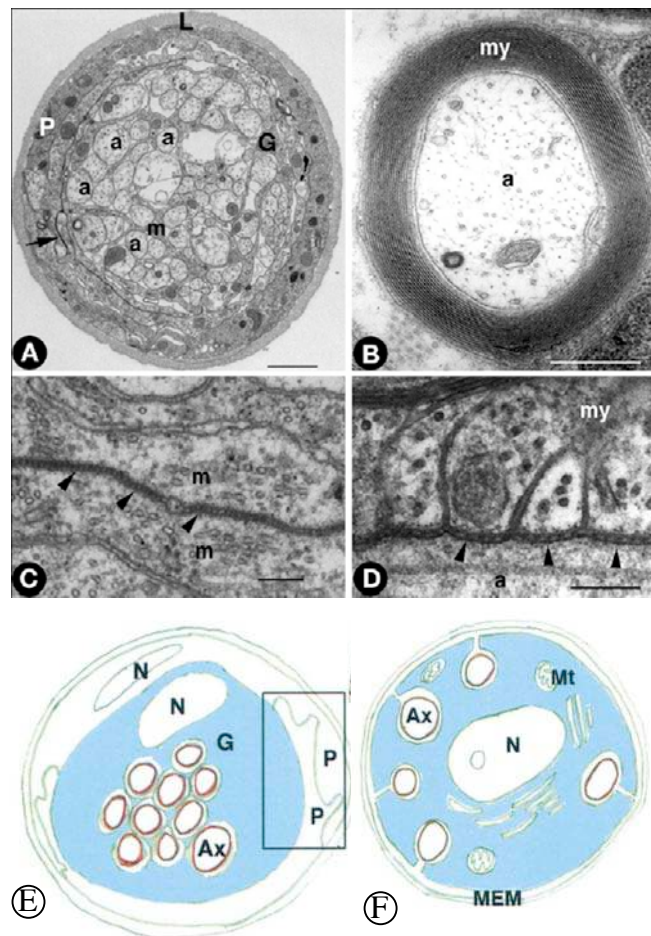


Figure 28 : Comparaison de l'organisation des fibres nerveuses chez les invertébrés et les vertébrés

Chez les vertébrés, chaque cellule gliale ne myélinise qu'un axone unique au niveau du système nerveux périphérique, comme illustré par la photographie d'une coupe transversale d'axone myélinisé (B). Chez la drosophile, une cellule gliale donnée entoure le faisceau d'axones, comme représenté sur la photographie en microscopie électronique (A) et la représentation schématique (E) d'une coupe transversale de nerf abdominal.

Ax, a : axones, G : cellule gliale, P : cellules du périneurium, m, membrane gliale interne, L, tissu connectif, N : noyau.

Les cellules du périneurium et les membranes gliales internes interagissent via des jonctions septées (C). Celles-ci sont proches des jonctions observées au niveau des boucles paranodales (D) formées par les cellules de Schwann des vertébrés à mâchoire. a : axone, m : membrane gliale interne, my : cellule de Schwann. Chez les vertébrés non myélinisés, des axones de faible diamètre sont localisés au niveau d'invaginations formées par les replis de la membrane des cellules gliales. MEM : cellules de Schwann, N : noyau, Mt : mitochondrie.

D'après Banerjee et *al.*, 2006 et Bellen et *al.*, 1998

Caspr/Paranodine, la contactine ou la Neurofascine 155, se retrouvent également au niveau des jonctions septées chez la drosophile, chez qui elles sont impliquées dans le même type de fonction (Bellen et al., 1998; Faivre-Sarrailh et al., 2004; Genova and Fehon, 2003).

Chez la drosophile, les jonctions septées sont observées au niveau des contacts axones-glie entre les faisceaux d'axones et les cellules gliales internes, de même qu'au niveau des interactions entre cellules gliales internes et périneurales, ces dernières entourant l'ensemble formé par la glie interne et les axones (figure 28, Banerjee et al., 2006a; Bellen et al., 1998). Elles sont également retrouvées au niveau des cellules épithéliales (Tepass et al., 2001). Plus généralement, les jonctions septées existent chez de nombreux invertébrés, chez qui elles jouent un rôle dans l'adhérence et le maintien de la polarité cellulaire, avec une évolution de la forme des jonctions, par exemple entre celles des spongiaires et celles des annélides et des mollusques (Banerjee et al., 2006b).

Chez les vertébrés myélinisés, les oligodendrocytes comme les cellules de Schwann dérivent de cellules d'origine épithéliale. Ces cellules gliales présentent un certain nombre de caractères qui leur sont spécifiques. Ainsi, les oligodendrocytes ont la capacité de myéliniser des segments internodaux au niveau de différents axones, tandis que les cellules de Schwann myélinisent un segment axonal unique. De plus, seules les cellules de Schwann synthétisent une lame basale, avec laquelle elles interagissent par la suite de manière complexe. Les oligodendrocytes et les cellules de Schwann expriment majoritairement des protéines communes, chaque type cellulaire synthétisant cependant également un certain nombre de protéines spécifiques.

Concernant l'évolution des protéines de myéline proprement dit, les données évolutives disponibles portent essentiellement sur P0, protéine majoritaire de la myéline compacte des cellules de Schwann. Cette protéine est en effet exprimée dans le SNP, mais est exclue du SNC chez les vertébrés terrestres, où elle est remplacée par PLP/DM-20. Comme P0 se retrouve également au niveau de la myéline du SNC chez les poissons cartilagineux, il a longtemps été considéré que les protéines PLP/DM-20 étaient une acquisition évolutive récente. On sait maintenant qu'en réalité PLP et DM-20 sont exprimées chez tous les vertébrés myélinisés (Yoshida and Colman, 1996), et, si P0 reste la molécule d'adhérence majoritaire chez le poisson au niveau de la myéline compacte du SNC, DM-20 y est également très fortement exprimée. P0 et PLP/DM-20 auraient donc évolué en parallèle au niveau du SNC et du SNP, et ce serait plutôt l'évolution des propriétés d'adhérence de PLP-DM20 notamment chez les Amphibiens qui auraient pu devancer la réduction d'expression de P0 au niveau du SNC.

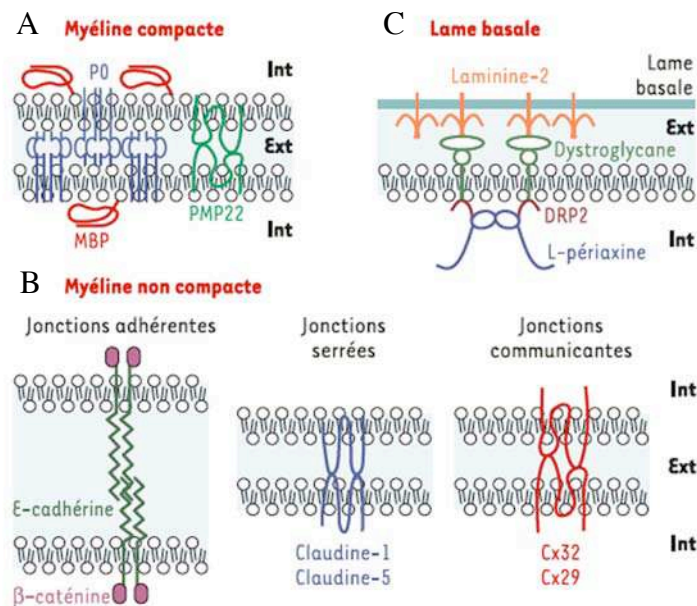


Figure 29 : Schématisation des principales protéines impliquées dans les interactions au niveau de la myéline et de la lame basale.

A - Les trois protéines majeures de la myéline compacte sont P0, qui joue le rôle de molécule d'adhésion via des interactions homophiliques, PMP22 et MBP.

B - Les trois types de jonctions autotypiques de la myéline non-compacte, les jonctions adhérentes, serrées et communicantes font intervenir la E-cadhérine interagissant avec la β -caténine, les claudines et les connexines respectivement.

C - L'adhésion entre cellule de Schwann et lame basale est médiée par l'interaction entre le dystroglycane et la laminine-2. Au niveau intracellulaire, le dystroglycane interagit avec DRP2 et la Périaxine.

D'après Oguievetskaia et *al.*, 2005

1.3.2. Caractéristiques de la gaine de myéline internodale

La gaine de myéline correspond à l'empilement de multiples couches de membrane plasmique gliale formée par enroulement de la cellule de Schwann autour de l'axone, et sa composition est donc essentiellement lipidique (environ 70%). Au niveau internodal, elle est essentiellement de type compact, c'est-à-dire que cette zone de la cellule gliale est dépourvue de cytoplasme et que les couches membranaires adjacentes forment des contacts autotypiques étroits assurant la compaction de la gaine. La première molécule impliquée dans ces interactions lors de la formation de la gaine est la protéine MAG (Myelin Associated Glycoprotein). Par la suite, elle perdure au niveau interne de la gaine, mais est remplacée en périphérie par d'autres molécules d'adhérence.

La protéine majoritaire dans le SNP est P0 (figure 29A), qui est codée par le gène *mpz* et qui représente à elle seule environ 50% des protéines de myéline. Elle forme des tétramères interagissant de façon homotypique avec les protéines P0 de la couche de membrane adjacente, via leur domaine extracellulaire de type immunoglobuline (Ig) (pour revue, Arroyo and Scherer, 2000). Les deux autres protéines jouant un rôle majeur dans la compaction de la myéline périphérique sont MBP (Myelin Basic Protein) et PMP22 (Peripheral Myelin Protein 22) (figure 29A). Les protéines MBP sont de petites protéines dérivées d'épissages alternatifs qui sont chargées positivement et donc probablement localisées à proximité de la membrane via des interactions électrostatiques avec les lipides chargés négativement. PMP22 contient en revanche quatre domaines transmembranaires assurant son ancrage à la membrane.

MBP et PMP22 sont présentes dans la myéline compacte au niveau du SNC, mais comme nous l'avons vu précédemment, la protéine majoritaire y est PLP pour les vertébrés terrestres. Il existe également au niveau du SNC des protéines totalement absentes du SNP : MOG (myelin oligodendrocyte glycoprotein) et MOBP (Myelin Oligodendrocyte Basic Protein), localisées au niveau des membranes externes et internes respectivement (Amiguet et al., 1992; Yamamoto et al., 1994).

Au sein de la gaine de myéline compacte internodale existent par ailleurs des zones de myéline non compacte nommées incisures de Schmidt-Lanterman (figure 30). Ce sont des canaux de cytoplasme se mettant en place lors de la formation de la gaine de myéline, assurant ainsi l'existence d'une voie de diffusion reliant la zone périaxonale de la cellule gliale avec sa région périnucléaire (Arroyo and Scherer, 2000). Il existe d'autres zones de myéline non compacte au niveau des fibres myélinisées : les boucles paranodales, correspondant aux extrémités latérales des couches membranaires internodales et formant des saccules cytoplasmiques interagissant entre eux et avec l'axone, ainsi que les microvillosités,

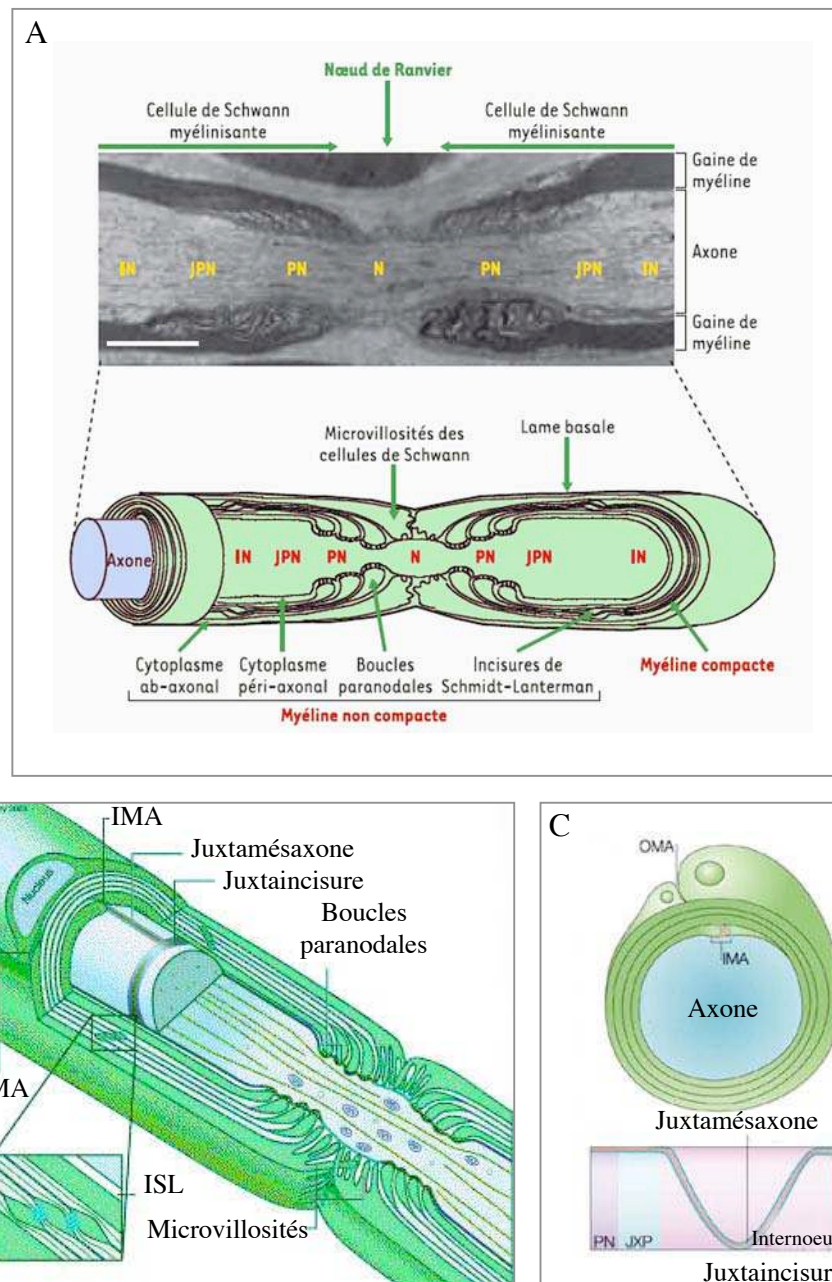


Figure 30 : Organisation structurale des fibres myélinisées du système nerveux périphérique

A - Microscopie électronique et schéma interprétatif d'une coupe longitudinale de nerf phrénique. Il existe différents domaines distincts le long de l'axone : le nœud (N), le paranoëud (PN), le juxta-paranoëud (JPN) et l'internoeud au sens strict (IN), chacun possédant des caractéristiques anatomiques et fonctionnelles spécifiques. Les régions nodales sont recouvertes par les microvillosités formées par la cellule de Schwann, cette dernière interagissant avec l'axone au niveau paranodal via des boucles cytoplasmiques latérales nommées boucles paranodales.

B et C - Schémas de sections longitudinales et transversales de fibres myélinisées. On retrouve face au mésaxone interne (IMA) le juxtamésaxone et face aux incisures de Schmidt Lantermann (ISL) la juxtaincisure au niveau axonal. OMA : mésaxone externe, PN : paranoëud, JXP : juxtaparanoeud.

D'après Salzer, 2003 ; Poliak et Peles, 2003 ; Oguievetskaia et *al.*, 2005

prolongements membranaires de la cellule de Schwann recouvrant l'axone au niveau nodal (figure 30).

Les cellules de Schwann forment également de nombreuses jonctions autotypiques au niveau des zones de myéline non compacte. Le premier type de jonctions observées sont des jonctions dites adhérentes (Fannon et al., 1995). Elles sont basées sur l'interaction homotypique de E-cadhérine, molécule dépendante du calcium (figure 29B). Au niveau intracellulaire, la E-cadhérine interagit avec la β -caténine qui la connecte au cytosquelette, et plus particulièrement aux filaments d'actine. Le deuxième type de jonctions présentes à ce niveau de la myéline correspond aux jonctions serrées (Tetzlaff, 1982), qui favorisent l'existence de domaines membranaires spécialisés au niveau des cellules épithéliales en limitant la fluidité de la membrane. Elles assurent également une perméabilité sélective aux molécules. Les protéines impliquées dans ces jonctions sont les claudines, différents membres de cette famille de protéines transmembranaires étant impliqués dans les différentes structures de myéline non-compacte (Poliak et al., 2002). Le dernier type de jonctions autotypiques observées sont les jonctions communicantes localisées au niveau des incisures et des boucles paranodales (Tetzlaff, 1982). Elles sont composées de deux connexons formant un canal entre les deux compartiments cytoplasmiques adjacents, favorisant les échanges d'ions et de diverses molécules de faible poids moléculaire. Chaque connexon est un ensemble de six connexines, majoritairement la connexine 32 pour les jonctions communicantes au niveau des cellules de Schwann (Scherer et al., 1995).

Outre leurs interactions autotypiques, les cellules de Schwann développent également des interactions avec la lame basale qu'elles produisent. Elles expriment notamment des récepteurs aux laminines, protéines trimériques correspondant au constituant majeur de la lame basale (figure 29C). L'un de ces récepteurs aux laminines est le dystroglycane, molécule transmembranaire interagissant au niveau intracellulaire avec DRP2 et la Périaxine (Sherman et al., 2001). Ces molécules sont nécessaires au maintien de la gaine de myéline, les souris n'exprimant pas de Périaxine fonctionnelle formant une myéline instable, qui est progressivement dégradée (Gillespie et al., 2000). Un modèle murin d'inactivation du gène codant pour le dystroglycane présente une désorganisation importante de l'enroulement de la myéline et des microvillosités nodales (Saito et al., 2003). A noter également qu'il a récemment été montré que PMP22 interagit avec des intégrines et que son absence perturbe l'organisation de la lame basale (Amici et al., 2006).

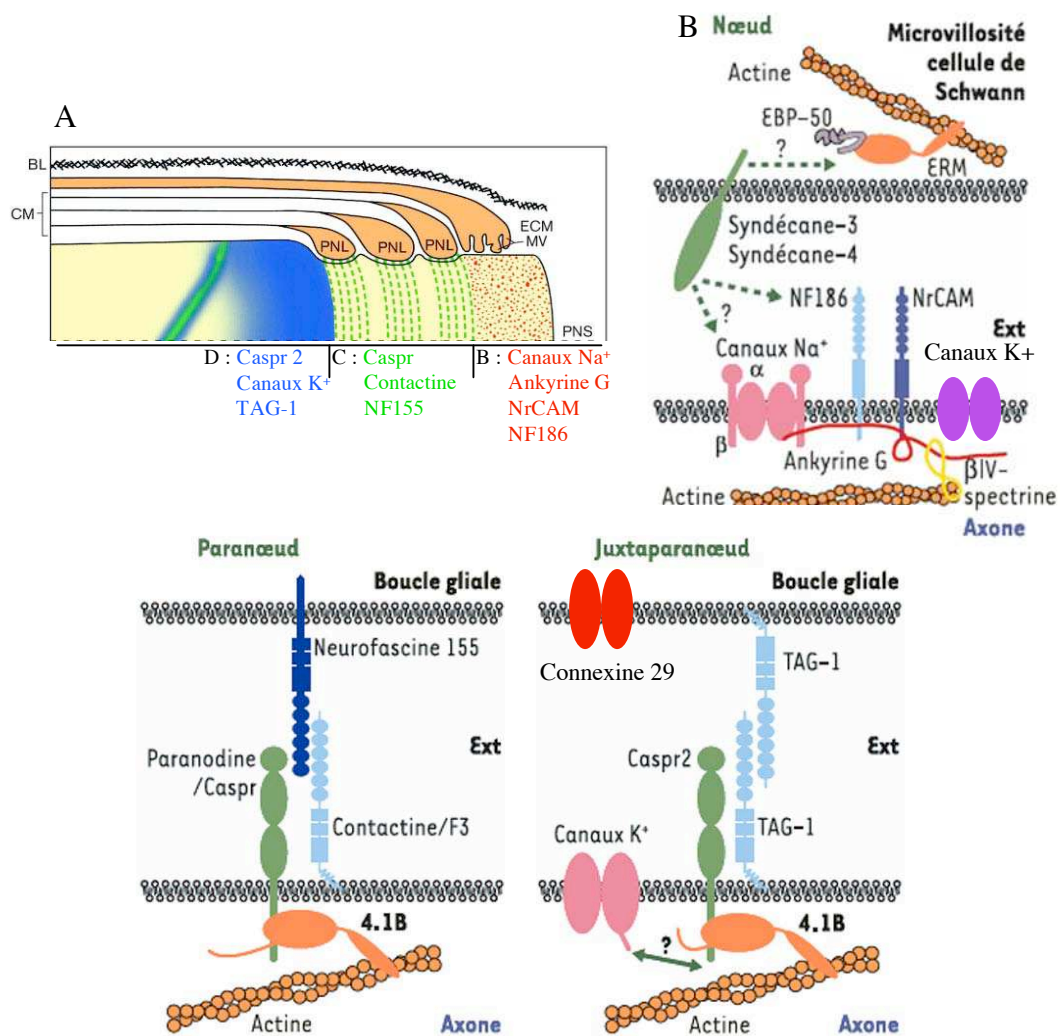


Figure 31 : Principales protéines impliquées dans les interactions entre cellules de Schwann et axones

A - Récapitulation des protéines majeures médiant les interactions axone-glie au niveau des différents domaines des fibres myélinisées. Les lettres B, C et D correspondent aux agrandissements adjacents détaillant les interactions entre les protéines évoquées. CM : myéline compacte, ECM : matrice extracellulaire, MV : microvillosités, PNL : boucles paranodales, PNS : système nerveux périphérique.

B - Au niveau nodal, les canaux Na⁺ interagissent directement avec la Neurofascine 186, ces deux protéines se lient également au niveau intracellulaire à l'ankyrine G, formant un pont avec le cytosquelette via la spectrine βIV. On retrouve également la NrCAM ainsi que des canaux K⁺ au niveau axonal. Des partenaires gliaux potentiels du complexe formé par la Neurofascine et les canaux Na⁺ sont les syndécane localisés au niveau des microvillosités.

C - Les jonctions axogliales paranodales impliquent l'interaction entre la Paranodine, la contactine, protéine axonale, et l'isoforme gliale de la Neurofascine. Au niveau intracellulaire, la Paranodine interagit avec la protéine 4.1B, interagissant elle-même avec le cytosquelette.

D - Au niveau juxtaparanodal, le complexe Caspr2/Tag-1 joue un rôle dans l'adhésion axogliale. On retrouve également de nombreux canaux K⁺, notamment à proximité du paranœud, au niveau axonal et la connexine 29 au niveau glial.

D'après Peles et Salzer, 2000 et Oguievetskaia *et al.*, 2005

Comme décrit précédemment, l'enroulement des cellules gliales autour des axones confère aux fibres myélinisées une organisation basée sur l'alternance des internœuds, où l'axone est recouvert par une gaine de myéline compacte, et des zones non myélinisées, les nœuds de Ranvier. Ces derniers sont recouverts par des microvillosités formées par les cellules de Schwann. Deux autres régions spécialisées moléculairement, structurellement et fonctionnellement sont également définies au niveau des fibres myélinisées. La région jouxtant directement la zone nodale est nommée région paranodale. Les cellules de Schwann y contactent l'axone via des boucles de myéline non compactée exprimant des marqueurs d'adhésion particuliers. La région de l'internœud voisine de la zone paranodale forme une zone intermédiaire nommée région juxta-paranodale (Peles and Salzer, 2000).

1.3.3. Organisation de la région nodale

Les nœuds de Ranvier correspondent à une zone d'interruption de la gaine de myéline entre deux cellules de Schwann myélinisantes adjacentes.

La région nodale axonale possède une structure moléculaire particulière, lui permettant d'assurer l'existence des flux d'ions transmembranaires nécessaires à la propagation saltatoire du message nerveux (figure 31B). Au niveau nodal, on retrouve en effet une forte concentration de canaux Na^+ voltage-dépendants, dépassant les $1200/\mu\text{m}^2$ (pour revue, Poliakov and Peles, 2003). Ce sont des complexes multimériques composés d'une sous-unité α formant le pore du canal proprement dit et d'une ou plusieurs sous-unités auxiliaires β (Yu and Catterall, 2003). Ces dernières modulent l'ouverture du canal et jouent le rôle de molécules d'adhérence via leur domaine immunoglobuline extracellulaire. Un autre type de canaux ioniques est également localisé au niveau des nœuds. Il s'agit de canaux sodium, la forme majoritaire retrouvée au niveau du SNP étant KCNQ2 (Devaux et al., 2004). Il y a également un enrichissement en Na^+/K^+ -ATPase au niveau nodal, permettant sans doute le maintien de la fonction physiologique du nœud (Arroyo and Scherer, 2000). D'autres molécules ont également été caractérisées au niveau de l'axolemmme nodal, telles que des molécules d'adhérence CAM, la Nr Cam et la Neurofascine 186, et des molécules du cytosquelette comme l'ankyrine G et la spectrine βIV . L'ankyrine G interagit avec la spectrine βIV , la Nr-CAM et la Neurofascine 186, qui interagit elle-même directement avec les canaux Na^+ (Ratcliffe et al., 2001), cette interaction étant nécessaire à la localisation nodale des canaux Na^+ voltage-dépendants (Sherman et al., 2005).

Au niveau du SNP, l'espace nodal est occupé par des microvillosités issues de la partie externe de la cellule de Schwann. Les microvillosités de deux cellules adjacentes sont reliées

par des jonctions serrées (Berthold and Rydmark, 1983; Poliak et al., 2002), même s'il existe néanmoins une certaine perméabilité à ce niveau. Plusieurs protéines de la matrice extracellulaire sont retrouvées sous la lame basale au niveau de l'espace nodal, telles la tenascine C, le versicane ou NG2. Aux niveaux des microvillosités, diverses protéines membranaires ont été caractérisées, comme des syndécans (Goutebroze et al., 2003) qui pourraient jouer un rôle pour l'interaction avec la matrice extracellulaire ou la gliomédine, qui pourrait médier l'interaction des cellules de Schwann avec l'axone (Eshed et al., 2005), mais également des protéines telles l'eitrine, la radixine et la moesine, pouvant faire le pont entre protéines membranaires intégrales et cytosquelette.

1.3.4. Contacts axogliaux au niveau des fibres myélinisées

1.3.4.1. Jonctions axogliales au niveau des paranoeuds

Les régions paranodales sont localisées directement de part et d'autre du nœud de Ranvier et correspondent à des boucles de membrane gliale contenant du cytoplasme, s'enroulant en spirale autour de l'axolemmes auquel elles sont étroitement connectées. Les jonctions observées à ce niveau sont régulièrement espacées et ne sont pas sans rappeler les jonctions septées des invertébrés (Bhat et al., 2001). Les jonctions paranodales se mettent en place relativement tard au cours de la myélinisation, tout d'abord par interaction de la boucle correspondant à la couche de myéline la plus externe avec l'axone, les autres boucles s'attachant ensuite graduellement (Tao-Cheng and Rosenbluth, 1983). La membrane axonale contient au niveau de la jonction axogliale un complexe formé de deux molécules de reconnaissance, Caspr/paranodine (Einheber et al., 1997; Menegoz et al., 1997) et la contactine (Rios et al., 2000) (figure 31C). Caspr est une protéine transmembranaire qui appartient à la famille des Neurexines, molécules d'adhésion et de communication intercellulaire (Bellen et al., 1998; Missler and Sudhof, 1998) dont certains homologues sont retrouvés au niveau des jonctions septées des invertébrés (Baumgartner et al., 1996). La présence de Caspr et de la contactine est nécessaire à la formation correcte des jonctions paranodales, l'espace entre l'axone et les boucles paranodales s'élargissant en leur absence. L'organisation correcte de la membrane gliale semble importante pour la localisation à l'axolemmes du complexe Caspr/contactine, un partenaire glial potentiel étant la protéine CAM Neurofascine 155, l'isoforme gliale de la Neurofascine (Charles et al., 2002; Tait et al., 2000), qui n'est plus localisée au niveau des paranoeuds en absence du complexe Caspr/contactine (Bhat et al., 2001; Marcus et al., 2002). Inversement, il n'existe plus de jonctions paranodales chez des

souris mutantes pour la Neurofascine, mais le sauvetage par transgénèse de l'expression de l'isoforme gliale Neurofascine 155 permet de restaurer la présence de ces jonctions (Sherman et al., 2005).

L'étude de lignées de souris mutantes pour Caspr et la contactine, a permis d'étudier le rôle de la jonction paranodale dans la myélinisation. Ce type de jonction assurerait l'ancrage de la gaine de myéline à l'axone. Il permettrait également d'isoler électriquement l'activité du nœud de Ranvier et de limiter la diffusion des protéines nodales vers la région internodale (Rosenbluth, 1976).

1.3.4.2. Jonctions axogliales au niveau juxtaparanodal

Le juxtaparanoeud correspond à la région jouxtant la zone interne des domaines paranodaux. On y a caractérisé la présence d'hétéromultimères de canaux K^+ de la famille Shaker (Wang et al., 1993), qui colocalisent au niveau de l'axolemmes juxtaparanodal avec Caspr2, un second membre de la famille Caspr (Poliak et al., 1999), et Tag1, une protéine CAM de la famille des contactines (Traka et al., 2002) (figure 31D).

La concentration de canaux K^+ au niveau juxtaparanodal pourrait permettre d'assurer un maintien du potentiel de repos de la membrane axonale internodale et peut-être de protéger les axones (Chiu and Ritchie, 1984; Vabnick et al., 1999) et de médier la communication axogliale (Altevogt et al., 2002; Fields and Stevens-Graham, 2002; Li et al., 2002).

1.3.4.3. Jonctions gliales internodales

Les internoeuds correspondent à 99% des zones d'interaction entre axones et cellules de Schwann. L'interaction axogliale y est relativement uniformément répartie, avec une séparation de 15 nm entre la membrane plasmique de la cellule de Schwann et l'axolemmes. Le candidat proposé pour médier cette interaction est la protéine MAG, localisée sur les couches internes de myéline, et qui lie des molécules glycosylées axonales (Kelm et al., 1994; Sadoul et al., 1990; Trapp et al., 1989). MAG est également connue pour favoriser la remyélinisation via ce type d'interaction (Spencer et al., 2003).

Dans le SNP, il existe de plus deux structures spécialisées au niveau de l'axone, liées à la présence des zones de myéline non-compacte : le juxtamésaxone et la juxtainsure (figure 30 B et C). Le mésaxone interne est en continuité avec la spirale paranodale. On retrouve au niveau du juxtamésaxone MAG, la Neurofascine, et parfois la Connexine 29 sur la membrane gliale, tandis qu'on observe Caspr et la contactine à la surface axonale, flanquée de chaque côté par Caspr2, Tag1 et des canaux K^+ (Arroyo et al., 1999; Poliak et al., 2003). Le juxtamésaxone

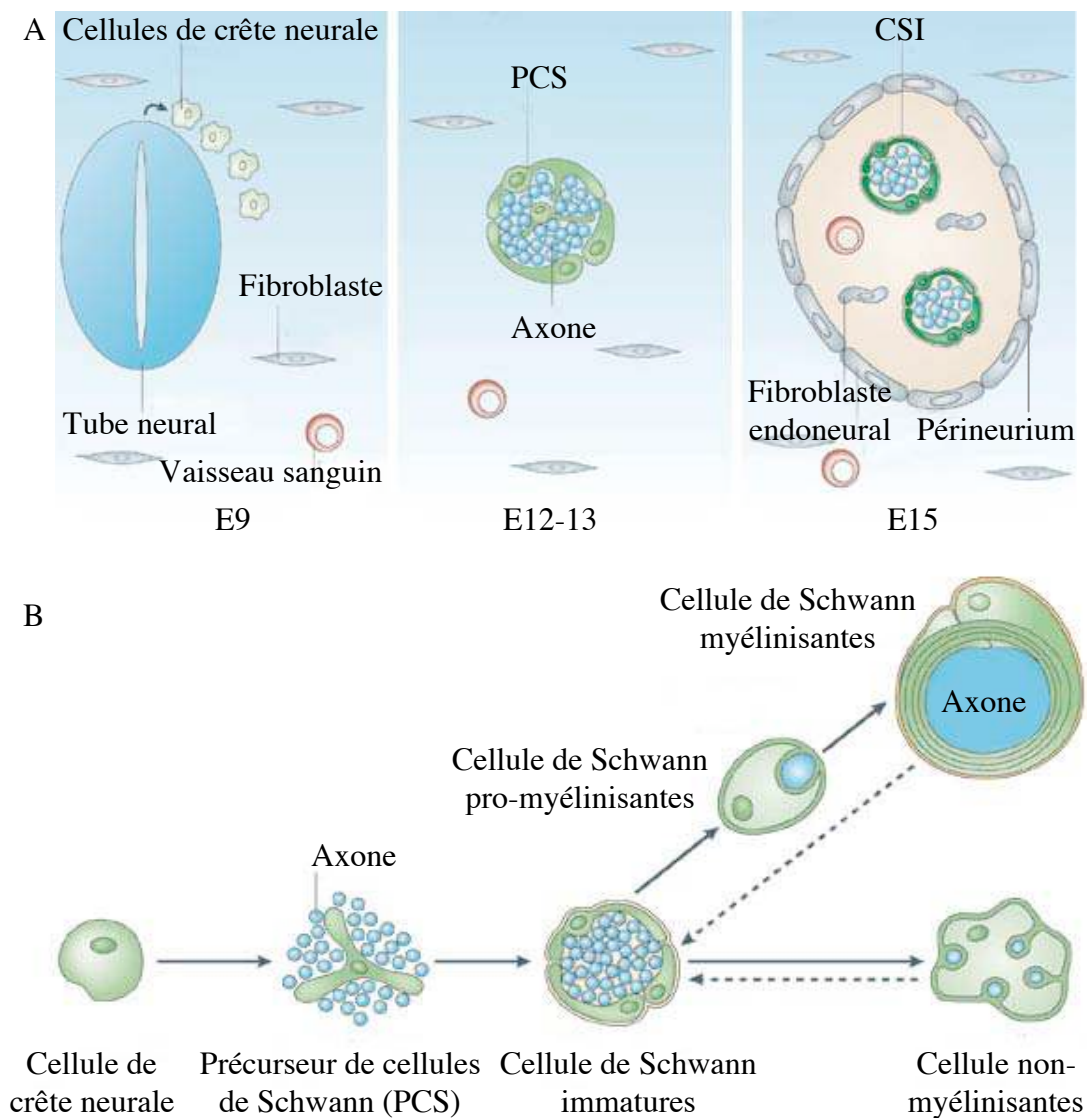


Figure 32 : les étapes majeures du développement des cellules de Schwann

A - Chez la souris, les cellules de crête neurale migrent depuis la zone dorsale du tube neural, qu'elles quittent vers E9. Les précurseurs des cellules de Schwann s'associent ensuite aux axones pour former les nerfs précoces compacts entre E12 et E13. Les cellules de Schwann immatures sont localisées au sein du nerf au contact des axones à E15. Le nerf, contenant également des fibroblastes endoneuraux, des vaisseaux sanguins et de la matrice extra-cellulaire, est délimité par le périneurium en formation. PCS : précurseur de cellules de Schwann, CSI : cellules de Schwann immatures.

B - Les trois premières étapes de la différenciation des cellules de Schwann correspondent à la phase embryonnaire. Les cellules de Schwann immatures sont toutes équivalentes, et leur devenir dépend des axones auxquels elles s'associent, les cellules s'associant aux axones de large diamètre étant les seules à adopter le devenir myélinisant. Les flèches en tirets indiquent la dédifférenciation possible des cellules matures en cellules immatures.

D'après Jessen et Mirsky, 2005

serait donc la continuation internodale des régions para et juxtaparanodales. De même, la juxtainsure est une structure en anneau reproduisant l'organisation moléculaire des incisures de Schmidt-Lanterman (Arroyo et al., 1999). Cette organisation n'est pas retrouvée au niveau internodal des fibres myélinisées du SNC (Altevogt et al., 2002; Arroyo et al., 2001; Tait et al., 2000).

L'organisation extrêmement stéréotypée des fibres myélinisées suggère une régulation fine du processus de myélinisation au cours du développement des nerfs. La voie de différenciation des cellules de Schwann permettant d'aboutir à la formation des gaines de myéline comprend différentes étapes nécessitant notamment un dialogue avec les axones et une régulation complexe de l'expression génique des cellules gliales. Les principales données connues à ce jour concernant ce processus sont décrites ci-dessous.

2. Développement des cellules gliales et myélinisation du système nerveux périphérique

2.1. Les cellules gliales du SNP sont des dérivés de cellules de crête neurale, dont la survie et la différenciation dépendent notamment de signaux axonaux

2.1.1. Le lignage cellulaire des cellules de Schwann

Lors du développement des nerfs périphériques, les cellules de crête neurale génèrent les cellules gliales myélinisantes et non-myélinisantes, qui vont s'associer aux axones de large et de faible diamètre respectivement (figure 32, Jessen and Mirsky, 2005). Il existe des étapes intermédiaires dans la différenciation des cellules de Schwann : les cellules de crête neurale se différencient d'abord en précurseurs de cellules de Schwann (PCS) à E12-E13 chez la souris. On retrouve donc déjà des cellules gliales précoces au sein des nerfs embryonnaires lors de leur croissance (Goodman, 1996; Reynolds et al., 1991). Ils correspondent à ce stade à un ensemble d'axones compacts étroitement associés à des précurseurs de cellules de Schwann et sont dépourvus de tissus connectifs, protecteurs et de vascularisation, qui se mettent en place plus tardivement, alors que le nerf a déjà atteint sa cible (Grim et al., 1992; Jessen, 2004). Les PCS ne sont pas nécessaires à la croissance axonale, mais assurent diverses autres fonctions : ils servent de source aux cellules de Schwann que l'on retrouve au niveau des nerfs en période périnatale (Jessen et al., 1994), de support trophique pour les nerfs sensoriels et moteurs et sont essentiels pour que leur fasciculation ait lieu correctement (Garratt et al., 2000a). Enfin, ils sont peut-être à l'origine de la petite population de fibroblastes observée au niveau des nerfs périphériques (Joseph et al., 2004).

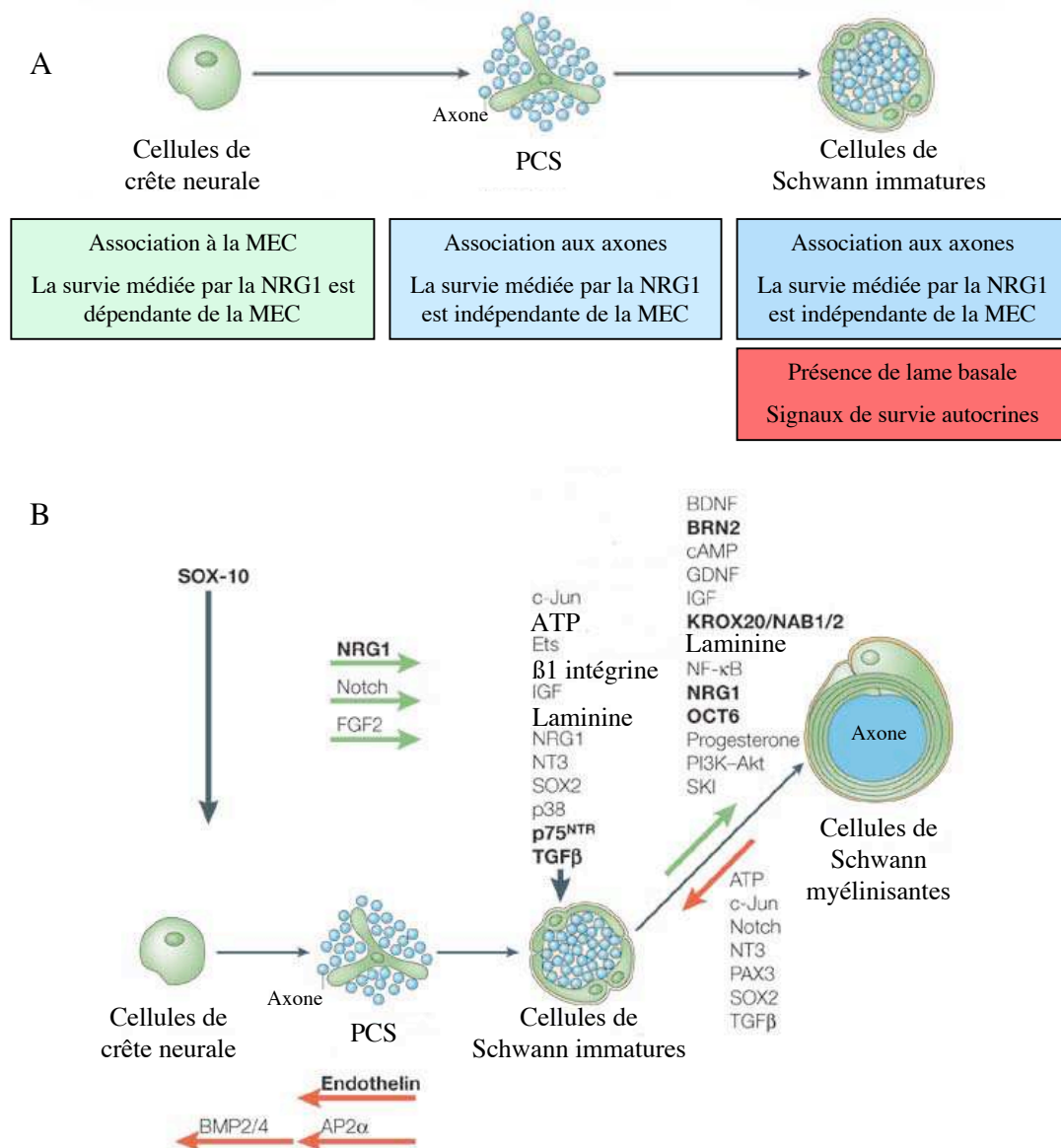


Figure 33 : Principaux évènements moléculaires associés à la survie et la différenciation des cellules de Schwann

A - Evolution de la dépendance aux signaux de survie durant le développement précoce des cellules de Schwann. NRG1 : Neuréguline 1, MEC : matrice extra-cellulaire, PCS : précurseurs des cellules de Schwann

B - Principaux acteurs moléculaires impliqués aux différentes étapes de la différenciation des cellules de Schwann. Les voies Notch et c-Jun favorisent un état immature tandis qu'Oct6, Brn2, Krox20 et les Nab jouent un rôle prédominant dans le devenir myélinisant des cellules de Schwann.

D'après Jessen et Mirsky, 2005

La seconde étape correspond au passage des PCS à l'état de cellules de Schwann immatures, dont le devenir myélinisant ou non-myélinisant n'est pas encore défini, entre les jours E13 et E15 chez la souris. Au même moment, diverses modifications se produisent au niveau du nerf, dont le phénomène de vascularisation ainsi que la mise en place de la couche cellulaire externe, nommée perineurium. Au niveau des cellules gliales, on observe une évolution coordonnée de l'expression génique et de la réponse aux signaux de survie et de prolifération. Les cellules de Schwann immatures possèdent notamment la capacité de mettre en place une voie autocrine de signaux de survie. Des études *in vitro* ont permis de montrer qu'on retrouve parmi les facteurs sécrétés IGF-2 (insulin growth factor 2), NT3 (neurotrophine 3), LIF (leukemia inhibitory factor) et LPA (lysophosphatidic acid) (figure 33, Dowsing et al., 1999; Meier et al., 1999; Weiner and Chun, 1999). Le passage d'une dépendance à des signaux paracrines axonaux pour la survie des PCS, permettant sans doute d'ajuster leur nombre, à un mode de survie autocrine est sans doute un des éléments majeurs pour permettre la survie de cellules de Schwann dans le cas de lésion et dégénérescence des axones. Ce phénomène assure notamment la possibilité de réparation et remyélinisation après régénération axonale.

Parmi les facteurs contrôlant la transition entre PCS et cellules de Schwann immatures, AP2 α et l'endothéline sont connus comme étant des facteurs inhibiteurs (figure 33). L'expression d'AP2 α est en effet très fortement réprimée lors de la génération des cellules de Schwann *in vivo* et son expression forcée dans les PCS retarde la différenciation en cellules de Schwann *in vitro* (Stewart et al., 2001). De même, chez des rats mutants pour un récepteur de l'endothéline, les cellules de Schwann se forment de façon prématurée (Brennan et al., 2000). Des études *in vitro* ont par ailleurs montré que la Neuréguline 1 et Notch favorisaient au contraire cette transition (Brennan et al., 2000 ; Woodhoo A, données non publiées).

Le devenir postnatal des cellules de Schwann immatures dépend des caractéristiques des axones auxquels elles s'associent de façon aléatoire, le processus de myélinisation s'activant dans celles interagissant spécifiquement avec un axone isolé de fort diamètre ($>1\ \mu\text{m}$). La différenciation en cellules myélinisantes et non myélinisantes est un processus lent qui commence durant la période périnatale et se déroule en plusieurs semaines. Les cellules vont subir de profondes modifications morphologiques et biochimiques durant cette phase, notamment dans le cas des cellules myélinisantes (Jessen and Mirsky, 1992). Elles vont en effet synthétiser des lipides pour produire la membrane qui va s'enrouler autour de l'axone pour former la gaine de myéline. Elles vont également activer les gènes dits de myéline, comme *mpz*, *PMP22* ou *MBP*, afin de produire les facteurs permettant de stabiliser et

compacter cette gaine. Cette activation va être suivie de la baisse d'expression d'autres gènes, tels p75, GFAP, la NCAM ou la L1 CAM, qui sont exprimés dans les cellules de Schwann immatures et non-myélinisantes (Jessen et al., 1990). Les facteurs de transcription favorisant la transition vers un devenir myélinisant sont Brn2, SKI, Oct6/SCIP, puis Krox20/Egr2 et les Nab, inhibant la prolifération et étant nécessaire à l'expression des gènes de myéline (cf II.3). Cette transition est également contrôlée par des facteurs extrinsèques aux cellules de Schwann, certains la promouvant, comme la Neuréguline 1, le GDNF, des IGF, la progestérone ou encore la laminine. D'autres facteurs vont au contraire l'inhiber, comme Notch ou les TGF β , qui favorisent respectivement la prolifération et la mort cellulaire des cellules gliales en différenciation (pour revue, Jessen and Mirsky, 2005).

Outre l'aspect moléculaire, les cellules de la voie de différenciation des Schwann présentent des rapports divers à leur environnement (figure 33). Ainsi, si les cellules de crête neurale présentent des capacités migratoires, les PCS comme les cellules immatures sont intimement associées à des axones, état caractéristique des cellules gliales. De plus, les PCS et les cellules de crête neurale présentent des réponses très différentes au facteurs de survie (Kubu et al., 2002; White, 2001) et les PCS, relativement insensibles aux signaux neurogéniques médiés par BMP22, sont donc orientés vers un devenir glial (Jessen and Mirsky, 1999; Woodhoo et al., 2004). Concernant les PCS et les cellules de Schwann immatures, seules ces dernières présentent une lame basale et sont aptes à assurer leur propre survie via des signaux autocrines, les PCS nécessitant la présence de signaux paracrines (Meier et al., 1999).

Le processus de différenciation vers la voie myélinisante est donc un phénomène extrêmement régulé et nécessite un dialogue complexe entre les cellules de Schwann et leur environnement. Il est intéressant de noter que les transitions entre chaque étape sont quasiment toutes réversibles, l'exception étant que les cellules de Schwann immatures ne peuvent revenir à l'état de précurseurs. En revanche, en cas de lésion nerveuse, les cellules matures myélinisantes comme non myélinisantes peuvent se dédifférencier en cellules immatures, et l'on peut obtenir *in vitro* à partir des PCS d'autres dérivés de la crête neurale (Dupin et al., 2003; Hagedorn et al., 1999; Sherman et al., 1993). Les cellules de crête neurale, les PCS et les cellules de Schwann immatures prolifèrent de plus rapidement *in vitro*, et seule l'étape finale de différenciation est corrélée avec une sortie du cycle cellulaire. Il faut cependant noter qu'en cas de dédifférenciation des cellules matures, celles-ci se remettent à proliférer (Scherer, 2001). L'un des caractères des cellules de Schwann est donc leur grande plasticité, maintenue tout au long de leur voie de différenciation.

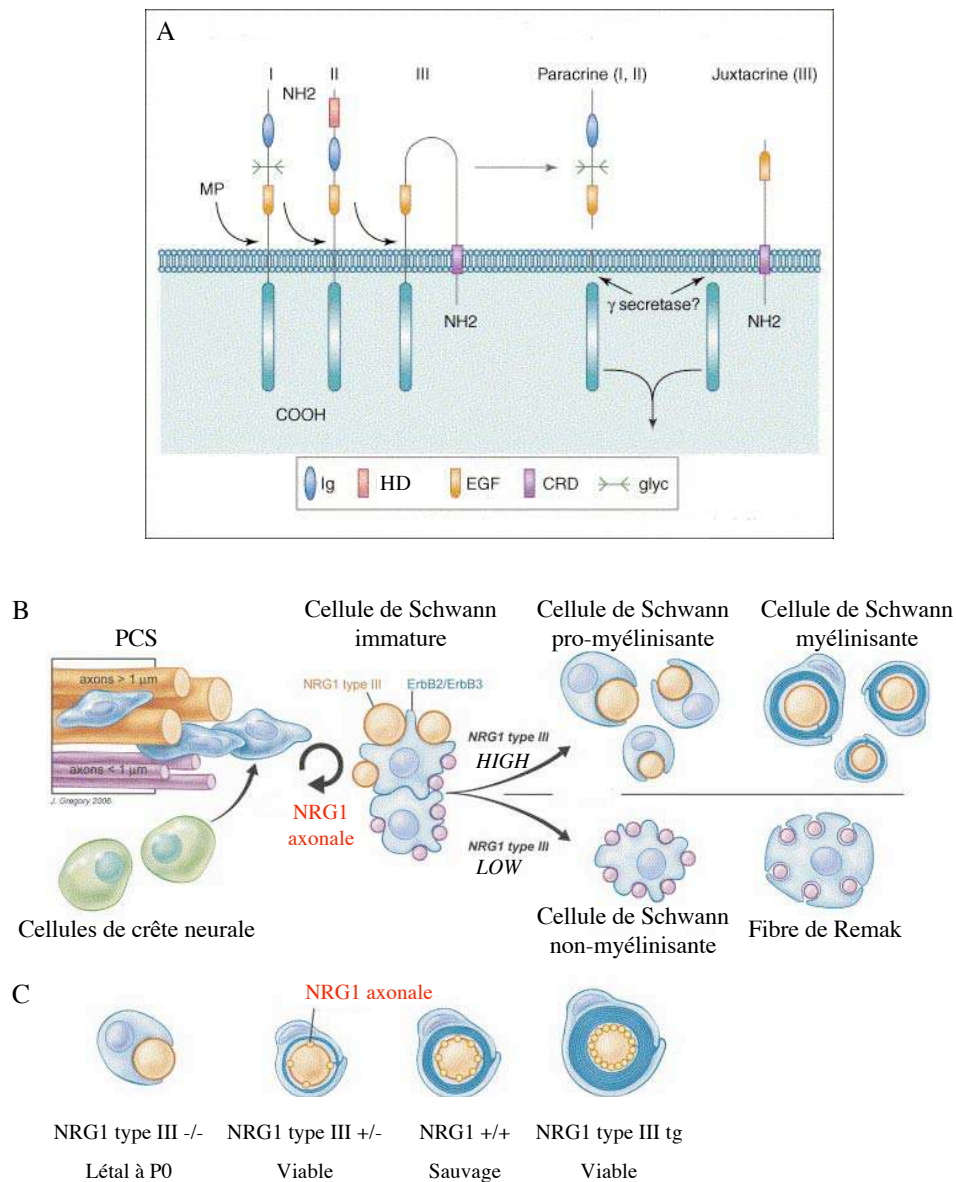


Figure 34 : La Neuréguline 1 (NRG1) dans le processus de myélinisation

A - Suite au clivage médié par une métalloprotéase, la libération des parties extracellulaires des isoformes I et II constitue un signal paracrine, tandis que le clivage de l'isoforme III conduit à un signal juxtacrine, en raison du second domaine d'ancrage à la membrane (CRD) de cette isoforme. Après liaison aux récepteurs Erb, la neuréguline de type III subit un nouveau clivage, intracellulaire cette fois, conduisant à la translocation dans le noyau du fragment libéré. Ig : domaine immunoglobuline, HD : séquence hydrophobe, EGF : domaine de type EGF, CRD : domaine riche en cystéine, glyc : sites de glycosylation.

B - La Neuréguline 1 axonale favorise la survie et la prolifération des cellules de Schwann, via les récepteurs Erb gliaux. L'acquisition du phénotype myélinisant ou non myélinisant dépend de la quantité de NRG1 de type III, elle-même fonction de la taille de l'axone, détectée par les cellules de Schwann.

C - Phénotypes des différents mutants NRG1. L'épaisseur de la gaine de myéline dépend directement du niveau d'expression de la Neuréguline de type III.

D'après Nave et *al.*, 2006

2.1.2. Les signaux régulant la survie et la différenciation des cellules de Schwann

Les transitions entre chaque étape du développement des cellules de Schwann sont dépendantes de signaux médiés par des facteurs de survie, des mitogènes et des facteurs de différenciation émis par l'axone, avec lequel interagissent les cellules gliales (Bunge, 1993; Scherer, 2001). Certains signaux ont déjà été évoqués plus haut et seul le signal majeur pour le développement des cellules de Schwann sera véritablement développé ici, les autres n'étant que rapidement présentés.

La Neuréguline 1 axonale apparaît comme jouant un rôle prépondérant dans le processus de myélinisation (figure 34). Il existe plus de 15 isoformes de la Neureguline 1 (pour revue, Nave and Salzer, 2006). La présence du domaine EGF suffit à la Neuréguline 1 pour assurer ses fonctions biologiques via sa fixation sur les récepteurs membranaires ErbB. Les formes transmembranaires de la Neuréguline 1, subissant un clivage protéolytique au niveau juxta-membranaire sont les plus répandues dans le système nerveux périphérique. Ce clivage induit la libération des isoformes I et II de la Neuréguline 1, qui correspondent donc à un signal paracrine. L'isoforme III, la plus active lors du développement des cellules de Schwann, possède un second domaine transmembranaire, qui la maintient ancrée dans la membrane axonale après clivage. Il s'agit donc cette fois d'un signal juxta-paracrine. La Neuréguline 1 interagit avec les récepteurs ErbB3 et ErbB4 et leur co-récepteur ErbB2. L'interaction prédominante pour la différenciation et la survie des cellules de Schwann est celle de l'isoforme III de la Neuréguline avec le couple ErbB3-ErbB2 exprimé par les cellules de Schwann.

Chez les mutants affectant la voie de signalisation de la Neuréguline 1, les PCS et plus tardivement les cellules de Schwann sont absents ou présents en très faible nombre au niveau des nerfs spinaux (Morris et al., 1999; Riethmacher et al., 1997; Woldeyesus et al., 1999). La Neuréguline 1 est nécessaire à la migration des cellules de crête neurale depuis les DRG vers les nerfs spinaux, ce qui peut jouer un rôle dans les phénotypes observés au niveau de ces nerfs (Dong et al., 1995; Wolpowitz et al., 2000). Cela reflète également le rôle probable de la Neuréguline 1 en tant que facteur de survie sécrété par les axones et mitogène pour les PCS. La Neuréguline 1 est un facteur de survie essentiel pour les PCS *in vitro*, dont elle stimule de plus la prolifération. L'expression de la Neureguline au niveau des DRG et des neurones moteurs est compatible avec ce rôle *in vivo*, car cette expression est observée au stade où les PCS colonisent les axones (Loeb et al., 1999; Marchionni et al., 1993). La survie des PCS dépend de la Neuréguline 1 *in vivo* et la présence de ce facteur suffit à endiguer le processus de mort

cellulaire affectant les PCS en cas d'induction d'une perte axonale (Winseck et al., 2002). Des résultats comparables ont également été observés dans le cas de cellules de Schwann plus différenciées (Grinspan et al., 1996; Trachtenberg and Thompson, 1996). Par ailleurs, ce facteur favorise le processus de différenciation des PCS et la prolifération précédant la myélinisation (Morrissey et al., 1995). La Neureguline 1 est donc impliquée dans la génération, la prolifération et la survie des cellules de Schwann. Elle semble promouvoir la myélinisation et l'accroissement de l'épaisseur de la gaine de myéline de façon dose dépendante (Michailov et al., 2004; Taveggia et al., 2005). Enfin, si des ablations spécifiques de ErbB2 ont montré que la voie de signalisation n'est pas nécessaire au maintien de la gaine de myéline, ErbB2 est rapidement phosphorylé après lésion nerveuse et les gènes Erb et Neuréguline sont ensuite suractivés, laissant supposer un rôle au cours des processus de démyélinisation-remyélinisation des axones. Des études *in vitro* ont en effet montrées que l'isoforme II de la Neuréguline 1 favorise la démyélinisation et la prolifération des cellules de Schwann (pour revue, Nave and Salzer, 2006). Enfin, la voie de signalisation de la Neuréguline 1 semble également jouer un rôle important pour la différenciation correcte des cellules de Schwann non-myélinisantes, dont le développement et la fonction sont altérées chez les mutants pour l'isoforme III de la Neuréguline 1 ainsi que chez les souris exprimant un dominant négatif du récepteur ErbB4 (Chen et al., 2003; Taveggia et al., 2005).

L'action de Notch sur les cellules de Schwann reproduit de façon étonnante l'action de la Neuréguline 1. Il oriente en effet également les cellules de crête neurale vers un devenir glial et favorise la transition entre PCS et cellules de Schwann immatures, ainsi que la prolifération de ces cellules (Kubu et al., 2002; Morrison et al., 2000; Wakamatsu et al., 2000). Par ailleurs, une coopération entre la voie Notch et la voie Neuréguline a déjà été décrite concernant le développement d'un autre type de cellules gliales, les astrocytes (Schmid et al., 2003). La spécificité de Notch est qu'il semble promouvoir l'état de cellules de Schwann immatures, car s'il favorise la différenciation des PCS, il limite au contraire la transition vers l'état myélinisant mature.

Des études *in vitro* ont montré que l'état prolifératif (caractérisé par la synthèse d'ADN) et l'état myélinisant (caractérisé dans ces études par l'expression de P0) n'étaient pas compatibles. En effet, en présence d'AMPc, les facteurs qui promeuvent la synthèse d'ADN, tels les FGF, PDGF-BB ou TGF β , induisent une réduction de l'expression de P0. Seuls les IGF semblent déroger à cette règle, suggérant le recouvrement de différents signaux pour le contrôle de la prolifération et la différenciation des cellules de Schwann *in vivo*, les IGF semblant tenir une place centrale dans ce phénomène.

2.2. Les différentes étapes de la myélinisation

2.2.1. Mécanismes moléculaires préparant la myélinisation

À E18 chez le rat (environ E16 chez la souris), les nerfs consistent en des faisceaux d'axones interagissant avec des cellules gliales, séparés par du tissu conjonctif contenant des fibroblastes endoneuraux et des vaisseaux sanguins. Cette organisation correspond globalement à celle que l'on retrouve chez les adultes. Les cellules de Schwann immatures entourent alors en commun des groupes d'axones et la myélinisation débute quelques jours plus tard, à la naissance pour le rat et vers E18,5 pour la souris. Cette évolution nécessite un tri radial, c'est-à-dire un processus qui va permettre de passer à une interaction 1:1 entre cellules gliales et axones. Le nombre de cellules de Schwann est en parallèle régulé par des signaux de mort et de survie et un certain nombre de signaux limitant une myélinisation prématurée sont également présents.

Le tri radial est un phénomène qui se poursuit après la naissance, les cellules de Schwann ségrégeant progressivement des groupes de cellules gliales où elles se trouvaient pour s'associer à un unique axone de large diamètre (stade pré-myélinisant) pour former une interaction 1:1 stable caractéristique du stade pro-myélinisant. Les mécanismes moléculaires impliqués sont encore mal connus, mais ce processus est perturbé chez les mutants pour la laminine 2 ou pour l'intégrine $\beta 1$, sous-unité des récepteurs à la laminine exprimés par les cellules de Schwann (Feltri et al., 2002; Xu et al., 1994). La laminine 2 et la laminine 8 possèdent un rôle important dans la myélinisation et la défasciculation des neurones du SNP et semblent de plus appartenir à la voie contrôlée par la Neuréguline (Yang et al., 2005). La défasciculation est également altérée chez les mutants *claw paw*, où le gène *Lgi4*, codant normalement une protéine sécrétée, subit une perte de fonction (Bermingham et al., 2006; Darbas et al., 2004). Des facteurs influençant la migration des cellules de Schwann *in vitro* pourrait également participer au tri radial *in vivo*. On peut notamment citer la Neuréguline 1, les IGF, NT3 et le BDNF. Enfin, l'activité de la voie de signalisation de p38 est également nécessaire avant la myélinisation, possiblement pour atteindre l'orientation correcte entre axones et cellules de Schwann.

Parallèlement à cette association, il est important de réguler le nombre de cellules de Schwann pour qu'il soit ajusté au nombre d'axones, et ce par des signaux de survie ou de mort cellulaire pour les cellules de Schwann. Les axones eux-mêmes contrôlent de façon importante la prolifération des cellules de Schwann *in vitro* (Salzer et al., 1980) et la perte de contact des cellules de Schwann avec les axones en cas de section des nerfs chez les animaux nouveaux-

nés limite beaucoup leur prolifération *in vivo* (Komiya and Suzuki, 1992). La Neuréguline 1 est un mitogène pour les cellules de Schwann *in vitro* (Morrissey et al., 1995), mais ce rôle n'a pas été clairement caractérisé *in vivo*. D'autres mitogènes potentiels sont les TGFβ (Transforming Growth Factor β), qui sont exprimés par les nerfs embryonnaires. L'invalidation des récepteurs au TGFβ de type II à E19 conduit à la réduction de la prolifération des cellules de Schwann, montrant que ces facteurs jouent un rôle direct ou indirect dans ce processus *in vivo* (D'Antonio et al., 2006). Enfin, l'interaction des cellules de Schwann avec les laminines favorise la prolifération dans les nerfs en cours de développement (Yang et al., 2005; Yu et al., 2005), de même que les signaux autocrines évoqués précédemment.

La nombre des cellules de Schwann immatures est également contrôlée par un phénomène de mort cellulaire durant la période périnatale. Deux types de signaux favorisant ce processus pour les cellules de Schwann *in vivo* ont été caractérisés à ce jour. Le premier est médié par le récepteur au neurotrophines p75, possiblement après activation par liaison au NGF (Nerve Growth Factor) (Syroid et al., 2000). La seconde voie implique les TGFβ, la délétion du récepteur au TGFβ de type II abolissant la mort cellulaire normalement observée dans les nerfs embryonnaires entre E18 et la naissance. Il est également possible de restreindre l'augmentation de la mort cellulaire après section des nerfs chez les nouveaux-nés par injection d'anticorps bloquant la voie des TGFβ et par délétion des récepteurs au TGFβ dans les cellules de Schwann (D'Antonio et al., 2006; Parkinson et al., 2001).

Finalement, il existe plusieurs voies de signalisation actives dans les cellules de Schwann immatures qui inhibent leur différenciation et il est nécessaire de supprimer leur action pour entamer le processus de myélinisation. La première voie implique la signalisation JNK (c-Jun-amino (N)-terminal kinase), active entre E18 et la naissance, période pendant laquelle elle est nécessaire pour le relai des signaux Neuréguline et TGFβ (Parkinson et al., 2004). Cette voie de signalisation est inactivée dans les cellules de Schwann lors de leur entrée dans le processus de myélinisation par le biais du facteur de transcription Krox20, via notamment l'activation de JIP1. Si l'on bloque cette inhibition, la voie JNK reste active, la myélinisation dans des co-cultures de neurones et de cellules de Schwann est bloquée, et l'expression des gènes de myéline normalement activée par l'AMPC et Krox20 n'est pas induite (Parkinson et al., 2004 et données non publiées). La seconde voie freinant la différenciation caractérisée à ce jour est celle du facteur Notch, qui favorise la prolifération des cellules de Schwann immatures, et qui est également inhibée lorsque les cellules entrent dans le processus de myélinisation. Là encore, si cette inhibition est levée, la myélinisation n'a pas lieu (Woodhoo A., données non publiées). Les facteurs de transcription Pax3 et Sox2 semblent posséder une action similaire.

Ils sont exprimés avant la myélinisation et favorise la prolifération durant cette période. Ils sont ensuite éteints dans les cellules myélinisantes, dont ils répriment la différenciation (Kioussi et al., 1995; Le et al., 2005a).

Parallèlement à l'inhibition des voies freinant la myélinisation, il est nécessaire d'activer des voies pro-myélinisantes impliquant Oct6 et Brn2 (Jaegle et al., 2003), Krox20 (Le et al., 2005a) et les Nab (Le et al., 2005a), ainsi que PI3K (Maurel and Salzer, 2000) et SKI (Atanasoski et al., 2004). L'interaction précise entre ces voies positives et négatives s'avère complexe et est encore mal définie, tout comme les voies moléculaires causales qui initient la transition nécessaire à l'entrée en phase de myélinisation.

2.2.2. La formation de la gaine de myéline

Comme cela a été évoqué précédemment, la gaine de myéline est formée par l'enroulement progressif de la membrane plasmique interne des cellules de Schwann autour de l'axone (Bunge et al., 1989; Geren and Schmitt, 1954). La membrane est ensuite compactée par élimination du cytoplasme, conduisant à une organisation multilamellaire de la gaine de myéline. Ces événements morphologiques s'accompagnent de modifications d'expression des molécules d'adhérence exprimées par l'axone et la cellule de Schwann. Notamment, la L1-CAM est réprimée lors de la myélinisation (Martini, 1994). En revanche, MAG, molécule d'adhérence exprimée par les cellules de Schwann qui favorise l'association avec la partie internodale de l'axolemmes, est très fortement exprimée après la formation du premier tour et demi de la gaine de myéline (Martini and Schachner, 1986).

Durant la période de synthèse active de myéline, la plupart des modifications biochimiques observées au niveau du nerf résultent de l'augmentation rapide de la synthèse des composants de la gaine.

On observe notamment chez le rat une forte accumulation de P0 entre le jour 5, où elle représente 3% des protéines purifiées à partir de nerfs sciatiques, et le jour 22, où elle représente près de 15% (Wiggins et al., 1975). L'expression de l'ARNm codant P0 commence vers E18, puis augmente jusqu'au 10^e jour de développement post-natal environ, où elle atteint son maximum. Ce taux est maintenu pendant les dix jours suivants, correspondant à la phase de production maximale de la protéine (Baron et al., 1994; Garbay et al., 1988). Celle-ci subit de plus des modifications post-traductionnelles pouvant jouer un rôle dans sa localisation à la membrane, puis dans les interactions qu'elle développe. En cas de lésion, le taux d'expression du gène *mpz*, codant P0, est fortement réduit, accompagnant ainsi le phénomène de démyélinisation. Le profil d'expression de l'ARNm et de la protéine PMP22 est comparable à

celui de P0 (Kuhn et al., 1993; Notterpek et al., 1999). Le profil d'expression de MBP, étudié chez la souris, est comparable à celui de P0 chez ce modèle, bien qu'il soit légèrement retardé. Il a été montré que la synthèse de la protéine MBP se produisait directement dans les zones de croissance de la myéline, par traduction localisée de son ARNm (Colman et al., 1982). Il faut noter de plus qu'il existe deux isoformes de MBP et que leur quantité relative évolue au cours de la myélinisation, suggérant des fonctions biologiques distinctes (pour revue, Garbay et al., 2000).

La connexine 32, qui joue un rôle dans le maintien de la gaine de myéline, pourrait également intervenir lors de sa formation. Elle disparaît en effet en même temps que les autres protéines de myéline en cas de transection des nerfs et est détectée dans les incisures de Schmidt-Lantermann et les régions paranodales au cours de la remyélinisation (Satake et al., 1997; Scherer et al., 1995).

Au regard du rôle isolant de la myéline, reposant notamment sur sa forte teneur en lipides, il n'est pas étonnant que la synthèse de ces molécules soient l'élément le plus profondément remanié au cours de la myélinisation.

Un des constituants lipidiques majeur de la myéline est le cholestérol. Il est synthétisé *in situ*, et sa biosynthèse et son accumulation sont finement régulées au cours de la myélinisation (Jurevics et al., 1998). En effet, l'ARNm codant l'enzyme limitant de la voie de synthèse du cholestérol, la HMG-CoA réductase, est exprimé selon le même profil que l'ARNm de P0. L'augmentation de cette expression n'est pas liée directement à un signal de myélinisation, mais à la consommation massive de cholestérol au niveau de la gaine (Fu et al., 1998). La plupart des lipides présents au niveau du nerf sciatique chez la souris, comprenant la sphingomyéline, Gal-C et S-GalC (galactolipides), ainsi que l'éthanolamine, la sérine et l'inositol diacylphosphoglycérides, présentent des profils d'accumulation similaires à ceux des protéines de structure de la gaine de myéline, avec une phase d'accumulation lente dans les dix premiers jours, puis une période très active, et enfin une réduction du taux d'accumulation. Cependant, les proportions relatives de ces différents lipides varient au cours des trois phases, notamment en raison de différences dans la cinétique de leur accumulation au niveau des membranes (pour revue, Garbay et al., 2000). Les galactolipides sont ainsi préférentiellement accumulés en fin de myélinisation. Si leur rôle n'est pas encore clairement caractérisé, on sait néanmoins que leur taux est important dans la gaine de myéline (entre 15 et 25 % des lipides accumulés) et que la déplétion ou la surexpression chez des souris de l'enzyme qui les synthétisent, la céramide galactosyltransférase (CGT), induit une déstabilisation de la gaine et

altère sa fonction (Bosio et al., 1996; Bosio et al., 1998; Coetzee et al., 1996; Dupree et al., 1998; Fewou et al., 2005).

Finalement, le cytosquelette, et notamment les microfilaments, paraissent également jouer un rôle majeur pendant le processus de formation de la gaine de myéline. La Rho kinase (ROCK) semble posséder une fonction importante dans ce processus (Melendez-Vasquez et al., 2004). Elle régule en effet la transduction mécanique du couple actine-myosine en phosphorylant la chaîne légère de la myosine. L'absence de ROCK conduit à la formation par une cellule de Schwann de plusieurs internoeuds de taille réduite, le processus myélinisant se fragmentant. Le rôle de l'actine au cours de la myélinisation a été montré par des études de perturbation du cytosquelette à l'aide de cytochalasine D (Fernandez-Valle et al., 1997). De faibles concentrations de cytochalasine entraînent l'arrêt de l'enroulement en spirales de la membrane de la cellule de Schwann autour de l'axone. L'absence de filaments d'actine fonctionnels induit en effet une inhibition de l'expression des gènes codant les protéines de myéline, d'où un arrêt de la croissance de l'extension membranaire myélinisante (Bunge et al., 1989). Cela concorde avec le fait que les microfilaments seraient un des éléments faisant le lien entre régulation du profil génique de cellules de Schwann myélinisantes et signaux axonaux.

L'épaisseur de la gaine de myéline est également un élément finement régulé, et il semble dépendant du calibre de l'axone. Le g-ratio est le rapport entre les diamètres de l'axone et de la fibre myélinisée (gaine de myéline plus axone). La plupart des fibres myélinisées possèdent un g-ratio compris entre 0,6 et 0,7, et ce quelle que soit l'espèce considérée. La Neuréguline est un signal important pour la régulation de l'épaisseur de la gaine de myéline. Des souris mutantes pour le gène *ErbB2* possèdent une gaine de myéline, mais elle est plus fine que la normale (Garratt et al., 2000b). De plus, les souris hétérozygotes Neuréguline 1^{+/-} possèdent également une gaine de myéline dont l'épaisseur est réduite (Michailov et al., 2004) et la surexpression de l'isoforme III de la Neuréguline 1 induit une augmentation de la taille de la gaine de myéline. La longueur des segments internodaux n'est en revanche pas affectée dans les différents mutants évoqués, et elle serait donc établie indépendamment de la voie Neuréguline-ErbB.

En cas de remyélinisation après lésion, la gaine de myéline néoformée présente une épaisseur inférieure à celle attendue. Cela peut refléter une baisse de l'efficacité de la voie Neuréguline-ErbB après le processus normal de myélinisation. Il serait intéressant dans ce cas d'étudier les conséquences d'une surexpression de l'isoforme III de la Neuréguline par transgénèse.

D'autres signaux semblent également impliqués dans la régulation de l'épaisseur de la gaine de myéline. C'est notamment le cas du BDNF et du récepteur p75, qui semblent jouer un rôle régulateur dans les épisodes tardifs de la myélinisation (Tolwani et al., 2004). La surexpression du BDNF par transgénèse induit une croissance à la fois du diamètre de l'axone et de l'épaisseur de la gaine de myéline, cependant l'effet étant renforcé au niveau de la gaine de myéline, ce processus pourrait être en partie indépendant de la synthèse de Neuréguline 1 par l'axone, et serait alors possiblement lié à l'action du NGF au niveau du SNP (Chan et al., 2004). Par ailleurs, les mutants nuls pour la Périaxine possède un g-ratio inférieur aux souris sauvages, montrant l'existence d'une hypermyélinisation, que l'on observe également après réparation suite à une lésion des axones (Williams and Brophy, 2002). Ceci suggère un rôle possible de la Périaxine dans la régulation de l'épaisseur de la gaine de myéline.

La myélinisation apparaît donc comme un phénomène complexe régulé par un grand nombre de facteurs. Au cours de ce processus, les molécules d'adhérence, les canaux ioniques et les protéines cytosquelettiques associées, précédemment réparties de manière uniforme le long de l'axone vont se redistribuer en régions distinctes, aboutissant à la formation des domaines décrits précédemment.

2.2.3. Croissance des axones et segments myélinisés

Certains nerfs périphériques continuent leur croissance alors que la myélinisation a déjà commencé, posant la question du devenir des segments internodaux lorsque l'axone s'allonge. Dans le modèle murin présentant une inactivation de la Périaxine, on observe une perte du complexe Périaxine-DRP2-dystroglycane décrit plus haut. Ceci entraîne une perturbation des bandes de Cajal, canaux cytoplasmiques formés dans la zone abaxonale, et la perte de capacité pour les cellules de Schwann à s'allonger au cours de l'élongation axonale, d'où la formation d'internoeuds plus courts (Court et al., 2004; Sherman et al., 2001). De plus, les microtubules paraissent désorganisés en l'absence des bandes de Cajal, et les ARNm normalement relocalisés dans les régions distales des cellules de Schwann (notamment ceux codant MBP) sont absents, suggérant une altération de la fonction biologique des microtubules. A ce stade, l'épaisseur de la gaine de myéline n'est cependant pas perturbée, suggérant l'existence d'une voie de régulation indépendante. Les bandes de Cajal jouent donc un rôle prédominant dans l'allongement des cellules de Schwann au cours de la croissance axonale et il est intéressant de noter que dans des nerfs de souris chimériques contenant approximativement 50% de cellules sauvages et 50% de cellules mutantes, ces dernières forment toujours des internoeuds plus

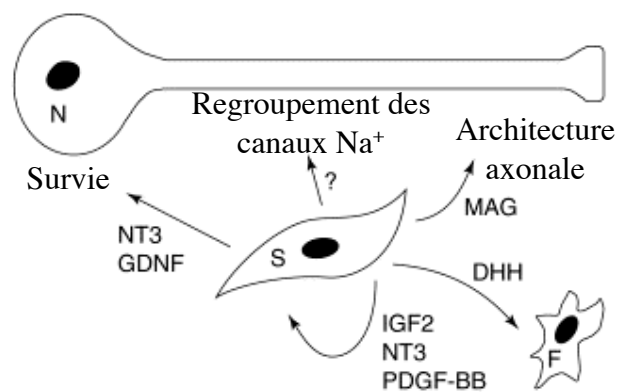


Figure 35 : Résumé des signaux développementaux émis par les cellules de Schwann

Les signaux émis par la cellule de Schwann (S) interviennent dans divers événements du développement nerveux. Les molécules impliquées dans ces processus sont indiquées sur le schéma.

DHH : desert hedgehog, F : fibroblaste, IGF2 : insulin-like growth factor 2, MAG : myelin associated glycoprotein, N : neurone, S : cellule de Schwann ou précurseur de cellule de Schwann, ? : signaux de nature inconnue.

D'après Mirsky et Jessen, Glial cell development, 2nd edition, 2001

courts, indiquant que la capacité à s'allonger est cellulaire autonome (pour revue, Sherman and Brophy, 2005).

2.3. Les cellules de Schwann sont des régulateurs majeurs du développement nerveux

2.3.1. Contrôle de la formation des nœuds de Ranvier

Un autre événement du développement neuronal régulé par les cellules de Schwann est la formation des nœuds de Ranvier (pour revue, Poliak and Peles, 2003). Des signaux produits par les cellules de Schwann semblent en effet nécessaires à la spécialisation moléculaire complexe de la membrane nodale et plus particulièrement au regroupement des canaux Na^+ (figure 35). Ces derniers se retrouvent généralement en périphérie des prolongements des cellules de Schwann myélinisantes (Ching et al., 1999; Vabnick et al., 1996) et c'est la croissance longitudinale de ces prolongements qui va induire la formation du nœud de Ranvier, par fusion de deux groupes de canaux adjacents, délimités par deux cellules des Schwann voisines. En cas d'absence des cellules de Schwann ou de démyélinisation, les canaux ne se regroupent pas et sont répartis de manière diffuse sur l'axone (Dugandzija-Novakovic et al., 1995; Vabnick et al., 1996). De plus, les canaux Na^+ sont localisés aux extrémités des cellules de Schwann dans les fibres myélinisées présentant une diminution de la longueur des internœuds, après remyélinisation ou chez le mutant *claw paw* (Dugandzija-Novakovic et al., 1995; Koszowski et al., 1998). Si l'interaction avec les microvillosités des Schwann semble participer aux processus de regroupement des canaux, le mécanisme moléculaire précis est encore inconnu, bien que plusieurs modèles aient été proposés à ce jour (Poliak and Peles, 2003).

2.3.2. Contrôle de la survie et de l'organisation neuronale

Comme nous l'avons vu précédemment, les cellules de Schwann assurent leur survie via des signaux autocrines. Elles semblent également jouer un rôle majeur dans la survie axonale (figure 35). En effet, chez les mutants *ErbB3^{-/-}* et *ErbB2^{-/-}*, le nombre de PCS et de cellules de Schwann est très restreint dans la plupart des nerfs périphériques et l'on observe lors de la seconde partie du développement embryonnaire une perte massive des neurones sensoriels et des motoneurones cervicaux et lombaires (Riethmacher et al., 1997; Woldeyesus et al., 1999). Le fait que l'on observe le même type de défauts chez les mutants *Sox10^{-/-}*, dans lesquels les PCS ne sont pas formés, renforce l'idée que c'est l'absence de cellules de Schwann qui conduit à la mort des neurones.

En interagissant directement avec la membrane axonale, les cellules de Schwann participent aux différenciations locales de l'axolemmes, dont la perturbation altère sans doute le fonctionnement axonal. Mais l'interaction des cellules de Schwann avec les axones conduit également à des modifications importantes de ces derniers au niveau interne : elle renforce la phosphorylation des neurofilaments et favorise le taux de transport axonal rapide (de Waegh et al., 1992). L'absence de contact glial induit de plus une réduction du diamètre axonal, probablement en rapport avec une diminution du taux de phosphorylation des axones. Ces modifications axonales pourraient être dues à la protéine MAG exprimée à la surface des cellules de Schwann, les mutants pour cette protéine récapitulant les défauts observés au niveau de l'axone en absence de contact avec la glie (Yin et al., 1998). Ces défauts, et notamment la perturbation du transport axonal, peuvent probablement induire une dégénérescence de l'axone. Des modèles murins de maladie humaine impliquant des mutations des kinésines KIF5A ou KIF1B ou affectant le complexe dynéine-dynactine vont en effet dans ce sens (LaMonte et al., 2002; Reid et al., 2002; Xia et al., 2003; Zhao et al., 2001).

2.3.3. Contrôle de la mise en place du périneurium

La couche périneurale entoure les nerfs périphériques et agit comme une barrière protectrice (Bunge et al., 1989; Olsson, 1990). La molécule Desert Hedgehog (DHH) sécrétée par les cellules de Schwann joue un rôle dans la formation du périneurium, ainsi que des tissus connectifs endo- et épi-neuriaux (Parmantier et al., 1999). DHH est exprimé dans les nerfs en développement et son récepteur Patched est exprimé par les cellules du mésenchyme immédiatement adjacent au nerf au stade où se forme le périneurium. De plus, chez les souris mutantes pour DHH, le périneurium est anormal et on retrouve des cellules périneurales dans l'endoneurium (Parmantier et al., 1999).

Les cellules de Schwann jouent donc un rôle majeur dans l'organisation et la survie des fibres myélinisées, en intervenant de façon essentielle à divers niveaux.

3. Rôle de Krox20 dans le processus myélinisation

3.1. L'expression de *Krox20* et sa régulation au cours du développement des cellules de Schwann

3.1.1. Deux membres de la famille des *Krox/Egr*, *Krox20* et *Krox24*, sont exprimés dans les cellules Schwann de façon complémentaire

La génération de souris contenant le gène lacZ au niveau du locus de *Krox20* ou *Krox24* a permis de mieux caractériser l'expression de ces gènes, notamment au niveau du système

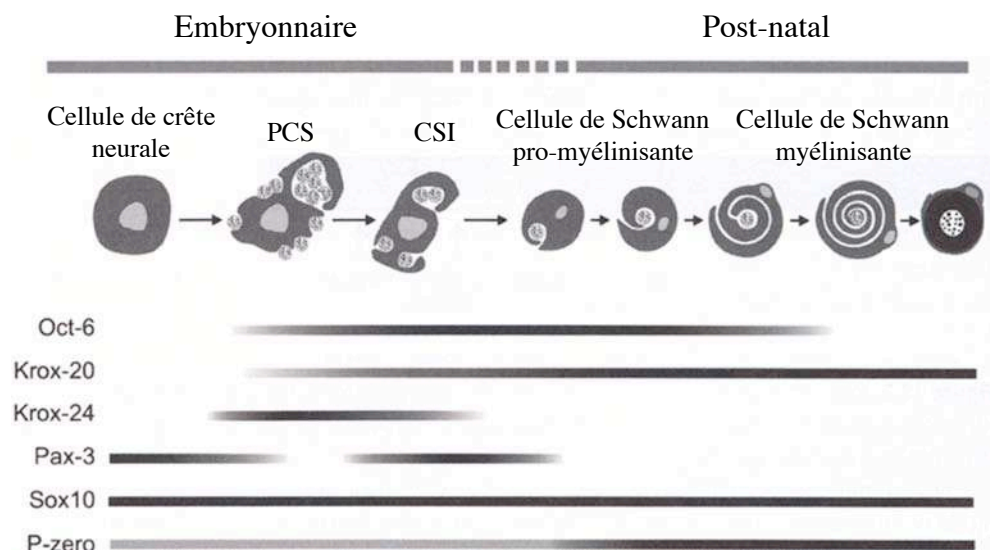


Figure 36 : Profils d'expression de divers facteurs de transcription et d'un marqueur de myéline, P0, au cours de la différenciation des cellules de Schwann.

La plupart des facteurs de transcription présentés possèdent une période d'expression concomitante transitoire, certains étant maintenus durant la myélinisation, comme Krox20 et Sox10, d'autres étant au contraire réprimés durant cette phase dans les cellules myélinisantes, comme Pax3, Krox24 et Oct6. P0 est exprimé avant la phase de myélinisation proprement dite, et son expression s'accroît au moment de la phase myélinisante.

D'après Topilko et Meijer, in Glial cell development, 2nd edition, 2001

nerveux périphérique. En utilisant l'expression du gène lacZ comme rapporteur chez les animaux hétérozygotes, qui ne présentent pas de défauts au niveau du système nerveux périphérique, les domaines d'expression de ces gènes et l'initiation de cette expression ont pu être caractérisés (Murphy et al., 1996; Topilko et al., 1997; Topilko et al., 1994; Zorick et al., 1996).

Les deux gènes sont exprimés de façon successive et globalement exclusive au niveau des cellules de Schwann en différenciation (figure 36). L'initiation de leur expression dans les nerfs débute à E10,5, avec des profils différents qui sont maintenus jusqu'à E14,5. Durant cette période, *Krox24* est exprimé dans les nerfs crâniens et rachidiens, tandis que l'expression de *Krox20* se limite aux cellules des capsules frontières, petites populations de cellules gliales localisées au niveau du tube neural, aux points d'émergence des racines dorsales et ventrales. A E15,5, *Krox20* est activé le long de la plupart des nerfs périphériques dans les cellules de Schwann immatures, tandis que *Krox24* est réprimé. En fin de myélinisation, dans le nerf sciatique, l'expression entre les deux gènes est exclusive, *Krox20* étant exprimé dans les cellules myélinisantes et *Krox24* dans les cellules non-myélinisantes. Enfin, en cas de lésion, *Krox24* est rapidement induit dans les cellules de Schwann, tandis que *Krox20* est réprimé progressivement. Ces profils d'expression complexes coïncident avec les différentes étapes de la différenciation des cellules de Schwann et suggèrent un rôle antagoniste des deux facteurs au cours de ce processus. En particulier, leur taux relatif d'expression pourrait participer au choix entre devenir myélinisant ou non myélinisant. Bien que l'hypothèse la plus simple soit un lien direct entre l'expression de *Krox24* et l'état non-myélinisant, d'autres possibilités sont également envisageables. Notamment, l'expression de *Krox24* peut être reliée à un taux de prolifération supérieur, qui caractérise en particulier les cellules non-myélinisantes (Pellegrino et al., 1986). Par ailleurs, les expressions de *Krox24* et de *Pax3* se recouvrent partiellement durant le développement embryonnaire et post-natal des cellules de Schwann (Kioussi et al., 1995). Cela ouvre la possibilité d'un lien de régulation direct entre ces deux facteurs, d'autant que *Pax3* favorise également le devenir non-myélinisant. Comme cela a été observé dans le cas d'une transsection de nerf partielle ayant conduit à une forte démyélinisation (Topilko et al., 1997), *Krox24* est exprimé dans les cellules de Schwann non-myélinisante, où il est habituellement localisé dans le cytoplasme, tandis que *Krox20* est exprimé au niveau des noyaux des cellules de Schwann situées dans les zones toujours myélinisées. De plus, durant la remyélinisation, *Krox24* est observé dans les noyaux des cellules remyélinisantes. Ces observations confirment que *Krox24* est plutôt exprimé dans les cellules en prolifération, tandis

que l'expression de *Krox20* est restreinte aux cellules engagées dans le processus de myélinisation.

3.1.2. Séquences régulatrices et facteurs impliqués dans la régulation de *Krox20*

L'analyse réalisée au laboratoire des séquences régulatrices en *cis* dirigeant l'expression de *Krox20* dans les cellules de Schwann a permis de caractériser deux éléments distincts (Ghislain et al., 2002). Le premier, désigné par ISE (Immature Schwann cell Element) est actif entre les stades E10,5 et E18,5, dans les cellules de Schwann immatures, mais ne l'est pas dans les cellules myélinisantes. Le second, nommé MSE (Myelinating Schwann cell Element), est activé à partir de E15,5, au début de la myélinisation, et son activité est maintenue durant l'état adulte. Des études *in vivo* de régénération de nerf sciatique ont démontré que les deux éléments étaient actifs pendant ce processus, d'une façon dépendante des axones. Ces deux éléments suffisent à reproduire le profil d'expression de *Krox20* durant le développement et la régénération. Des études génétiques ont permis de montrer que l'activité des deux éléments était maintenue chez les mutants déficients pour *Krox20*, suggérant l'absence d'une boucle d'autorégulation nécessaire à l'activité de ces séquences *cis*. L'ISE est localisée dans la zone comprise entre -31kb et +7kb du locus *Krox20*, tandis que la MSE est située 35kb en aval de *Krox20*. Des études menées avec ces éléments dans des cultures cellulaires et par transgénèse chez la souris ont permis de caractériser les facteurs directement en amont de *Krox20* (Ghislain and Charnay, 2006). Au moment de la transition entre stades pro-myélinisant et myélinisant, l'expression de *Krox20* est directement activée par les facteurs Pou Oct6/SCIP et Brn2, via leur liaison au niveau de la MSE, en synergie avec le facteur Sox10.

Les facteurs de transcription Oct6/SCIP et Brn-2 appartiennent à la classe III des facteurs POU comprenant également Brn-1 et Brn-4, le domaine très conservé POU correspondant à leur domaine de liaison à l'ADN (He et al., 1989; Wegner et al., 1993). Bien que ces facteurs soient exprimés dans des domaines se recouvrant largement, ils ne sont pas reliés génétiquement et ne partagent aucune séquence régulatrice au niveau de leur locus génique (Alvarez-Bolado et al., 1995; Suzuki et al., 1990; Zwart et al., 1996). Au niveau des cellules de Schwann, l'implication d'*Oct6* dans la différenciation des cellules myélinisantes a d'abord été suggérée par des études menées sur des cultures de cellules de Schwann de rat (Monuki et al., 1989), *Oct6* étant induit lors de l'élévation du taux d'AMPc dans les cellules, phénomène induisant également des gènes de myéline, tel *Mpz*. *In vivo*, *Oct-6* est exprimé tout d'abord dans les PCS puis les cellules de Schwann immatures (Blanchard et al., 1996). Le taux d'expression d'*Oct6* s'élève graduellement pour atteindre son maximum autour de la

naissance, lorsque la majorité des cellules a formé des contacts 1 : 1 avec les axones (figure 36, Arroyo et al., 1998; Jaegle et al., 1996; Scherer et al., 1994; Zorick et al., 1996), l'initiation et l'augmentation de l'expression d'*Oct6* ayant lieu avant l'activation de *Krox20* (Zorick et al., 1996). Durant le développement post-natal, *Oct6* est tout d'abord fortement exprimé dans les cellules promyélinisantes et myélinisantes, plus faiblement dans les cellules non-myélinisantes, puis son expression finit par s'éteindre au cours des premières semaines post-natales au niveau du nerf sciatique. Cette répression est liée à la maturation nerveuse et à l'expression d'*Oct6* lui-même, suggérant l'existence d'une boucle de rétrocontrôle négatif lors de la différenciation finale des cellules de Schwann (Jaegle and Meijer, 1998). L'expression d'*Oct6* est dépendante du contact axonal et, en cas de lésion, *Oct6* est éteint (Scherer et al., 1994), puis est de nouveau réexprimé au cours de la régénération. Son expression est alors maintenue longtemps (environ deux mois), montrant que la régénération ne récapitule pas exactement le développement (Arroyo et al., 1998; Scherer et al., 1994; Zorick et al., 1996).

Par ailleurs, des études par co-transfection de cellules de Schwann ont permis de montrer qu'*Oct6* n'agissait pas comme un activateur, mais comme un répresseur des gènes *Mpz* et *MBP*, codant des marqueurs de myéline (Monuki et al., 1990). *Oct6* permettrait donc d'accéder à un état myélinisant, mais réprimerait les étapes finales de différenciation, et sa répression serait donc nécessaire pour que le processus de myélinisation arrive à son terme (Weinstein et al., 1995). En effet, l'inhibition d'*Oct6* via l'expression dans des souris d'un dominant négatif dont l'expression est sous le contrôle du promoteur de P0 a conduit à une myélinisation plus rapide et à une hypermyélinisation, sans réduction du nombre de cellules de Schwann, suggérant une sortie normale du cycle cellulaire, mais une initiation plus précoce du processus de myélinisation (Weinstein et al., 1995). Cependant, le dominant négatif employé pourrait jouer dans certains cas un rôle d'activateur et non plus de répresseur, complexifiant l'analyse des résultats obtenus. La deuxième approche a consisté en la génération d'un mutant pour *Oct6*, par insertion du gène *LacZ* au sein du locus de ce gène. Si les souris hétérozygotes sont normales, la plupart des souris homozygotes pour l'allèle muté meurent de défauts respiratoires liés à une altération du nerf phrénique (Bermingham et al., 1996). Les animaux homozygotes qui survivent présentent un nombre de cellules de Schwann normal, celles-ci formant normalement des contacts 1 : 1 avec les axones. L'initiation de la myélinisation est cependant retardée d'environ deux semaines, les cellules restant bloquées de façon transitoire au stade promyélinisant, mais la myéline finalement produite est normale. Par ailleurs, l'expression de *Krox20* est retardée mais a également lieu. Le double knock-out *Oct6/Brn2*, présentant un phénotype aggravé comparé à celui d'*Oct6*, montre l'existence d'une redondance entre ces

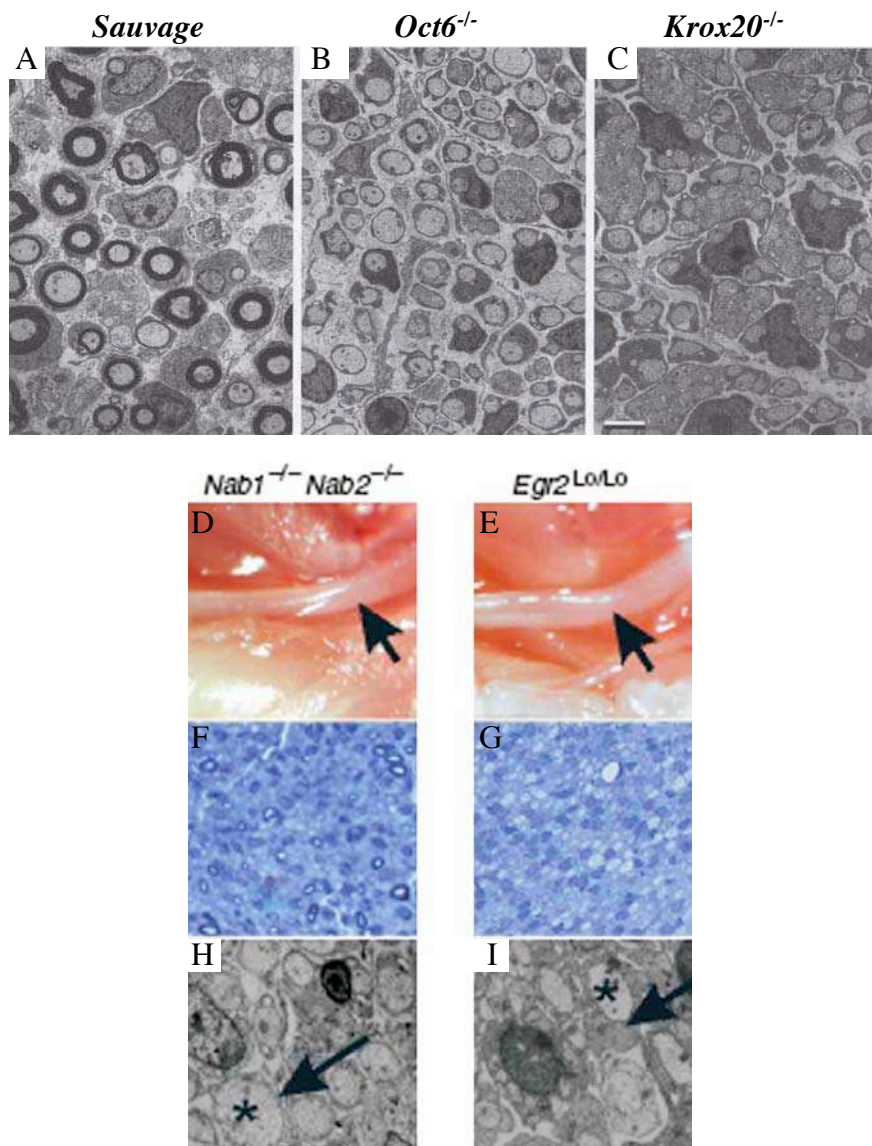


Figure 37 : Défauts de myélinisation observés au niveau des nerfs périphériques chez des modèles murins mutants pour *Oct6*, *Krox20* et les *Nab*.

A P8, les animaux *Oct6^{-/-}* (B) et *Krox20^{-/-}* (C) possèdent des cellules de Schwann normalement associées aux axones, mais ne formant pas de gaine de myéline autour d'eux, en comparaison à un animal sauvage au même âge (A).

Le mutant *Egr2^{Lo/Lo}* présente également une amyélinisation, ici à P14 (G, I) conduisant à l'aspect translucide des nerfs (E). Les double mutants *Nab*, dont les nerfs ont également un aspect translucide (D), présentent quant à eux une sévère hypomyélinisation à P14 (F et H).

D'après Topilko et Meijer, in *Glial cell development*, 2nd edition, 2001 et Le et *al.*, 2005b

facteurs, mais là encore, la myélinisation finit par se produire et *Krox20* est également exprimé (Jaegle et al., 2003). L'allèle *Oct6* employé dans ce double mutant étant en réalité un allèle hypomorphe, le maintien d'une faible activité d'*Oct6* pourrait expliquer cette expression, mais puisque l'expression de *Krox20* est maintenue à l'état adulte, en l'absence d'*Oct6* et *Brn2*, l'existence d'autres facteurs impliqués est probable. Deux candidats possibles sont les facteurs Pou *Brn5*, exprimé en fin de myélinisation dans les cellules de Schwann et maintenu à l'état adulte, et *Oct1*, dont l'expression est ubiquitaire (Jaegle et al., 2003; Wu et al., 2001). Toutefois, aucun de ces deux facteurs n'est capable d'activer l'élément MSE, seul ou en combinaison avec *Sox10* (Ghislain and Charnay, 2006). Les facteurs impliqués dans le maintien de l'expression de *Krox20* dans les cellules de Schwann à l'état adulte restent donc à caractériser.

Le facteur *Sox10*, également impliqué dans la régulation de *Krox20* dans les cellules de Schwann, appartient à la famille des facteurs de transcription à SRY-box, correspondant à leur domaine de liaison à l'ADN. Des mutations de *Sox10* sont associées aux syndrômes de Waardenburg-Hirschprung, liés à des défauts de cellules de crête neurale, dans lesquelles est exprimé *Sox10* (Kuhlbrodt et al., 1998b). Il est également exprimé à tous les stades de développement des cellules de Schwann et à faible taux dans les nerfs à l'état postnatal (figure 36). Il est essentiel à la différenciation de ces cellules, les PCS, cellules de Schwann et cellules satellites étant absentes chez les souris dont le gène *Sox10* a été inactivé (Britsch et al., 2001). La protéine *Sox10* ne possède pas de domaine de transactivation propre, mais agit en synergie avec les facteurs *Oct6*, *Pax3*, ainsi que *Krox20* au cours de la différenciation des cellules de Schwann (Kuhlbrodt et al., 1998a), lui conférant un rôle majeur dans le processus de myélinisation.

3.2. L'altération de l'activité de *Krox20* conduit à de graves défauts du processus de myélinisation.

L'analyse du système nerveux périphérique des mutants nuls pour *Krox20* a révélé l'existence de perturbations sévères du processus de myélinisation (Topilko et al., 1994). En cas d'absence d'expression de *Krox20*, les cellules de Schwann sont bloquées au stade dit promyélinisant, c'est-à-dire stade de différenciation qui suit l'établissement du contact 1 : 1 avec les axones (figure 37). Le processus de myélinisation s'arrête après un enroulement de la gaine d'un tour et demi, conduisant à une amyélinisation du système nerveux périphérique. Les marqueurs S100 et MAG sont normalement exprimés chez les mutants, mais l'expression des marqueurs de myéline MBP, P0 et PMP22 est fortement réduite. En revanche, le processus de

myélinisation est normal au niveau du SNC, reflétant le fait que *Krox20* n'est pas exprimé dans les oligodendrocytes. La prolifération et l'apoptose sont renforcées chez les animaux mutants aux stades post-nataux précoces (Topilko et al., 1994; Zorick et al., 1999). Le nombre de cellules de Schwann est en conséquence légèrement renforcé dans les nerfs périphériques (Zorick et al., 1999). Il est maintenant connu que *Krox20* favorise l'arrêt de la prolifération et la résistance à l'apoptose, notamment en inhibant l'expression et l'activité du facteur Jun, via l'activation du facteur Jip1 (Parkinson et al., 2004). Jun est un effecteur de la voie Neuréguline, impliquée dans la prolifération des cellules de Schwann et dans la voie TGFβ, qui favorise l'apoptose (Parkinson et al., 2004; Parkinson et al., 2001). Des études menées sur un mutant possédant un allèle hypomorphe de *Krox20*, nommé *Egr2^{lo/lo}* ont montré que *Krox20* régulait également négativement l'expression de *Sox2*, marqueur de cellules de Schwann immatures dont la surexpression dans des cultures de cellules de Schwann conduit à la répression des marqueurs de myéline et de *Krox20* lui-même (Le et al., 2005a). Selon les résultats obtenus par comparaison du transcriptome de nerfs sciatiques d'animaux sauvages et mutants par puces à ADN, *Krox20* semble plus généralement conduire à la répression des marqueurs associés aux cellules de Schwann immatures, comme *FoxD3*, *Id2* et *4*, *L1 CAM* ou *cyclinD1* (Le et al., 2005a). L'expression précoce d'*Oct6/SCIP* est normale dans les mutants *Krox20^{-/-}*, suggérant que *Krox20* n'est pas nécessaire à l'expression d'*Oct6*. Au contraire, l'expression de ce dernier est maintenue chez les animaux mutants pour *Krox20* à un stade où il est normalement éteint chez les animaux sauvages (Zorick et al., 1999). *Krox20* semble donc impliqué dans la répression d'*Oct6*. Il n'est cependant pas suffisant pour médier cette inhibition (Jaegle and Meijer, 1998).

Il a par ailleurs été montré que *Krox20* est un inducteur direct du gène *Mpz*, codant P0 (LeBlanc et al., 2006; Zorick et al., 1999), du gène *MBP* (Taveggia et al., 2004) et de la *connexine 32/Gjb1* (Bondurand et al., 2001; Musso et al., 2001; Musso et al., 2003) et active également la *Périaxine* (Nagarajan et al., 2001; Parkinson et al., 2003). *Krox20* régule de plus positivement divers gènes impliqués dans la synthèse des lipides de façon directe (Leblanc et al., 2005), et une étude récente menée par ChIP (Chromatin Immunoprecipitation) sur des extraits de nerfs sciatiques a montré que *Krox20* se liait également à des régions introniques très conservées du gène *MAG* et du gène *Dhh* (Jang et al., 2006). *Dhh* est un facteur sécrété par les cellules de Schwann. Il joue un rôle majeur dans la formation du périneurium (Parmantier et al., 1999) et le maintien de l'intégrité des fibres nerveuses de façon plus générale (Sharghi-Namini et al., 2006), son expression étant co-réglée avec celle de *Krox20* durant le développement normal ou après lésion (Bajestan et al., 2006; Nagarajan et al., 2002). Par

ailleurs, l'étude du transcriptome des mutants *Egr2^{lo/lo}* a montré une baisse d'expression, outre des gènes codant les marqueurs de myéline, de gènes de facteurs de différenciation comme p21 et de gènes codant des protéines impliquées dans la synthèse des lipides, dont *Cgt* (Le et al., 2005a).

Krox20 est donc un facteur nécessaire à la différenciation des cellules de Schwann en cellules myélinisantes, en inhibant la prolifération et divers marqueurs de cellules de Schwann immatures, tout en activant les marqueurs de myéline et les gènes assurant la synthèse des lipides participant à la formation de la gaine de myéline.

Les facteurs Nab sont co-exprimés avec Krox20 dans les cellules myélinisantes et leur expression est également réprimée en cas de lésion nerveuse. De plus, la surexpression de Krox20 dans des cellules de Schwann conduit à une forte augmentation de l'expression de *Nab1* et *Nab2*. Les souris déficientes pour *Nab1* et *Nab2* présentent une très forte hypomyélinisation du système nerveux périphérique, suggérant un rôle agoniste avec Krox20 dans ce système (figure 37, Le et al., 2005b). Les cellules de Schwann de ces mutants semblent rester à l'état promyélinisant, avec des taux de prolifération et d'expression d'Oct6/SCIP supérieurs à ceux observés chez les animaux sauvages à P14. Par ailleurs, des données de RT-PCR quantitative montrent que l'induction des gènes de myéline est altérée chez les double mutants *Nab*. Enfin, la comparaison du transcriptome de nerfs sciatiques des mutants *Egr2^{lo/lo}* et *Nab1^{-/-}Nab2^{-/-}* a révélé une certaine similarité dans les dérégulations géniques observées, certains gènes semblant cependant dérégulés de façon spécifique à l'un ou l'autre des mutants. Les facteurs Nab interagissant également avec Krox20 dans divers tissus et avec d'autres membres de la famille de Krox20, des études ont été menées dans la lignée *Nab1^{-/-}Nab2^{-/-}* pour caractériser d'autres défauts éventuels. Une hyperplasie épidermique et un défaut d'ossification endochondrale (également observé dans le mutant Krox20) ont ainsi été caractérisés. Cependant, les mutants ne présentent pas de défauts des gonades comme dans le cas du mutant *Krox24^{-/-}*, ni d'altération de l'organisation des nerfs crâniens, comme observé chez le mutant *Krox20^{-/-}*.

Si les facteurs Nab ont été décrits dans différentes études comme plutôt répresseurs de l'activité de Krox20, ils semblent ici jouer un rôle de co-activateur ou de co-répresseur de Krox20 pour certaines cibles transcriptionnelles clé de ce dernier au cours du processus de myélinisation.

3.3. Des mutations ponctuelles de Krox20 ont été caractérisées dans des neuropathies humaines.

L'importance du rôle de Krox20 dans le processus de myélinisation a été confirmé par l'identification de plusieurs mutations, majoritairement dominantes, de ce facteur dans des cas de Congenital Hypomyelinating Neuropathies (CHN), Dejerine-Sottas Syndrome (DSS) et Charcot-Marie-Tooth de type 1 (CMT1) (Bellone et al., 1999; Timmerman et al., 1999; Warner et al., 1998; Warner et al., 1999).

Toutes ces pathologies appartiennent au groupe très hétérogène des maladies de Charcot-Marie-Tooth, qui sont des neuropathies démyélinisantes le plus souvent héréditaires. Les CMT dites classiques sont associées à une faiblesse progressive des membres distaux et parfois proximaux. Les DSS et CHN correspondent à des syndrômes plus sévères, dont l'issue est parfois fatale, avec une initiation précoce durant la jeune enfance, associée à une faiblesse généralisée et un développement moteur altéré. Les CMT classiques sont réparties en forme démyélinisantes (CMT1) et axonales (CMT2), les CMT3 correspondant aux formes dé- ou dysmyélinisantes précoces (DSS et CHN), et les CMT4 à un groupe hétérogène de formes récessives de sévérité variable (Shy, 2004; Vallat, 2003; Vallat et al., 2004). Outre l'aspect dominant ou récessif et le caractère plus ou moins précoce de l'apparition des symptômes, les CMT sont classées en fonction de la vitesse de conduction des nerfs, de leur état de myélinisation et du locus associé à la maladie. Parmi les gènes dont des mutations sont associées aux CMT, on retrouve majoritairement des gènes impliqués dans la myélinisation comme *PMP22*, *GJB1/Cx32*, *Mpz*, *Prx* ou *Krox20*.

Les altérations du gène *PMP22* correspondent à la cause majeure de ces maladies héréditaires, avec des modifications au niveau du locus de ce gène retrouvées dans 70% des cas (délétion, mutation mais aussi duplication d'une copie du gène). Des souris et des rats transgéniques possédant des copies surnuméraires de *PMP22* placé sous le contrôle de son propre promoteur présentent des symptômes similaires à ceux observés chez les patients présentant une duplication du gène (Meyer Zu Horste and Nave, 2006). Une surexpression très forte du gène dans des modèles de rongeurs induit de plus une perte quasi-totale de myéline périphérique. De nombreuses mutations du gène *mpz* ont également été retrouvées chez l'homme et conduisent à des phénotypes de gravité variable. L'inactivation de *mpz* dans des modèles murins induit une forte hypomyélinisation de leur système nerveux périphérique, tandis qu'une surexpression par transgénèse conduit à une démyélinisation. Des mutations altérant les régions codantes et non codantes de *GJB1*, le gène codant la connexine 32, ont par ailleurs été caractérisées chez des patients souffrant d'une forme de CMT, nommée CMT1X,

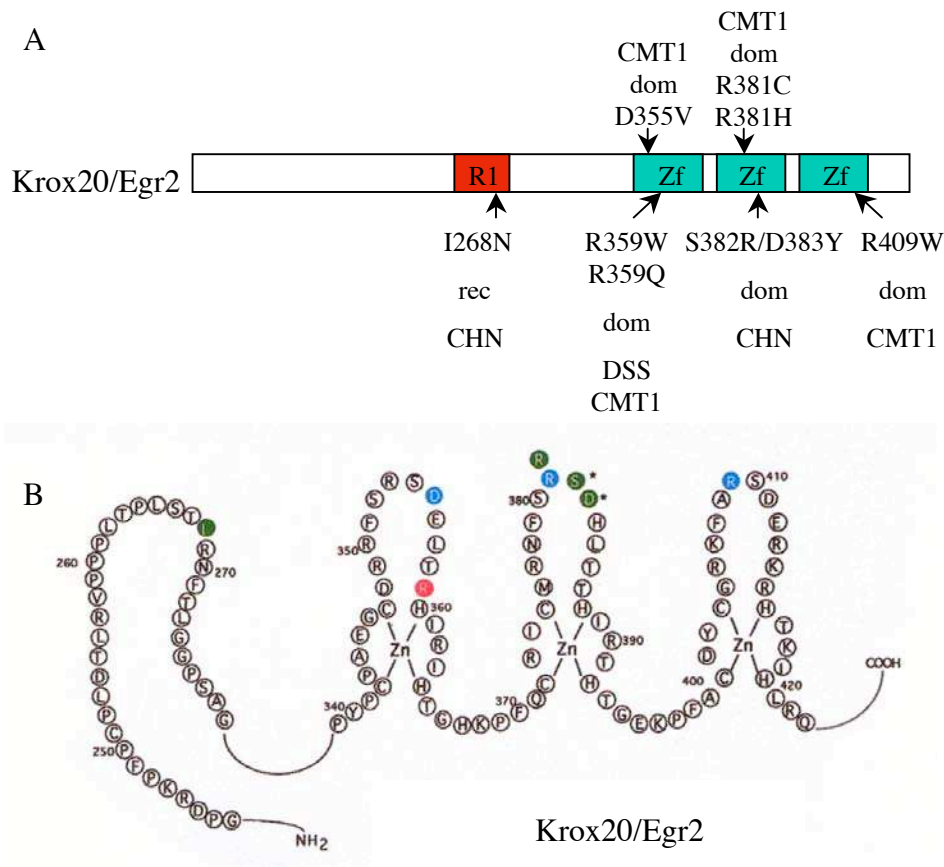


Figure 38 : Mutations de Krox20 associées à des neuropathies périphériques héréditaires.

A - Représentation schématique de la protéine Krox20 et localisation des mutations caractérisées. Leur phénotype associé (CMT1, DSS ou CHN) et leur caractère dominant (dom) ou récessif (rec) sont également indiqués. R1 : domaine répresseur médiant l'interaction avec les Nab, Zf : domaines à doigts de zinc, CHN : neuropathie congénitale hypomyélinisante, DSS : syndrome de Déjérine-Sotta, CMT1 : maladie de Charcot-Marie-Tooth de type 1.

B - Schématisation de la structure secondaire de Krox20 et localisation des mutations retrouvées chez des patients souffrant de myélinopathies. Les mutations localisées au niveau des doigts de zinc perturbent l'interaction de Krox20 avec l'ADN. Les mutations marquées par une astérisque ont été retrouvées associées. Les mutations indiquées en bleu, vert et rouge sont associées à des CMT de type 1, CHN et DSS, respectivement.

D'après Warner et al., 1999 et Wrabetz et al., in Glial cell development, 2nd édition, 2001

fréquemment observées. Les modèles murins d'invalidation de *GJB1* développent des symptômes similaires à ceux observés chez les patients atteints de CMT1X, avec une démyélinisation progressive du SNP. Enfin, la forme CMT4F du syndrome de Charcot-Marie-Tooth, ainsi qu'un sous-type de DSS, forme précoce de CMT, sont liés à des mutations affectant le locus du gène *Périaxine* (Boerkoel et al., 2001; Guilbot et al., 2001). On retrouve également de façon plus étonnante parmi les gènes associés aux CMT des gènes exprimés ubiquitairement comme *MTMR2* (myotubularin-related protein-2).

Le fait que diverses mutations d'un même gène conduisent à des maladies de gravité différente ou que l'altération de deux gènes différents conduise au même phénotype complexifie la classification des CMT et les sous-classes principales sont plutôt basées sur des données électrophysiologiques et histologiques, ainsi que sur l'observation des altérations motrices dont souffre le patient.

Les CMT1 sont caractérisées par une atrophie musculaire distale symétrique et une faiblesse des jambes s'étendant ensuite aux mains, les patients pouvant également développer progressivement une déformation des pieds nommée *pes cavus*. Cependant, si les symptômes apparaissent souvent durant l'enfance, la progression de la maladie est lente et seul un nombre restreint de patients perdent leur capacités à se déplacer de façon autonome. La vitesse de conduction des nerfs est réduite de façon homogène (<38 m/s contre 100m/s pour le sujet sain), et tous les nerfs sont atteints, suggérant une démyélinisation globale plutôt que focale. Au cours de la progression des symptômes, la vitesse de conduction reste relativement inchangée, alors que les troubles moteurs s'aggravent, notamment en raison d'une perte axonale distale.

Les DSS et CHN, formes très sévères de CMT, sont caractérisées par une hypotonie périnatale et des capacités motrices retardées, notamment concernant l'apprentissage de la marche. On distingue la forme hypertrophique DSS - correspondant à une augmentation de la taille des nerfs, avec la présence d'une accumulation concentrique de cytoplasme Schwannien dite « en bulbes d'oignons » autour des axones hypomyélinisés - de la forme de type CHN, sans « bulbes d'oignons ». La vitesse de conduction le long des nerfs est généralement très fortement altérée, allant de 1 à 10 m/s.

Parmi les mutations de Krox20 retrouvées chez des patients, certaines sont des mutations ponctuelles dominantes localisées dans le domaine à doigts-de-zinc de la protéine inhibant la fixation de Krox20 à l'ADN (figure 38). Les mutations D355V, R409W, R359Q et R381H correspondent à des pathologies de type CMT1. Il faut de plus noter que dans le cas des patients possédant la mutation R381H, on a observé des symptômes laissant supposer des altérations des nerfs crâniens (Pareyson et al., 2000). La forme R359W conduit quant à elle à

un syndrome de Dejerine-Sottas, tandis que la double mutation S382R/D383Y conduit à une neuropathie de type CHN. Il est intéressant de noter que ces mutations induisant une perte de liaison de la protéine à l'ADN devraient correspondre à une perte de fonction, et donc plutôt présenter un caractère récessif, l'allèle normal restant pouvant au moins partiellement compenser cette perte de fonction. Cette hypothèse est de plus renforcée par le fait que les animaux *Krox20*^{+/-} présentent une myélinisation normale du système nerveux périphérique. Le caractère dominant suggère donc la possibilité d'un rôle de dominant négatif pour ces protéines mutées, ou d'un éventuel gain de fonction. Une étude récente semble corroborer l'hypothèse d'un rôle dominant négatif de la protéine mutée S382R/D383Y (LeBlanc et al., 2007).

La seule mutation hors du domaine de liaison à l'ADN touche le domaine R1, et plus particulièrement l'isoleucine 268 (Warner et al., 1998). Cette isoleucine, conservée dans *Krox24*, est nécessaire à l'interaction des facteurs Krox avec les protéines Nab, l'interaction étant perdue en cas de mutation de cet acide-aminé (Swirnoff et al., 1998; Warner et al., 1999). Une mutation de cette isoleucine par transversion, la mutation I268N, a été caractérisée chez trois enfants issus de parents cousins germains, chacun hétérozygote pour l'allèle muté (Warner et al., 1998; Warner et al., 1999). Les patients homozygotes pour cette mutation récessive développent un CHN.

Si de nombreuses mutations ont été caractérisées à ce jour dans le cas des maladies de Charcot-Marie-Tooth, beaucoup de questions restent encore en suspens quant aux altérations moléculaires exactes qu'elles provoquent. La mutation récessive localisée dans le domaine répresseur R1 de *Krox20* conduisant à une forme particulièrement grave de CMT pose notamment la question du rôle de l'interaction entre *Krox20* et les Nab au niveau du processus de myélinisation. Cependant, un crible de 87 patients atteints de maladies de Charcot-Marie-Tooth dont l'altération génétique n'avait pas été caractérisée n'a pas permis de détecter d'éventuelles mutations des gènes *Nab* chez ces patients, et ce probablement en raison d'un rôle redondant de ces deux facteurs (Venken et al., 2002). Les protéines Nab ayant d'abord été décrites comme des facteurs plutôt répresseurs de l'activité de *Krox20*, cette mutation induisant une perte d'interaction a d'abord été supposée comme conduisant à une altération de type dose-dépendant, comme cela a pu être observé pour P0 ou PMP22. Cependant, les résultats récemment obtenus par génération des doubles mutants Nab murins suggère un rôle plutôt agoniste dans ce système. Cette lignée ne reproduit cependant pas tout à fait le contexte du syndrome humain, en ce qu'il ne différencie pas la perte d'interaction des Nab avec *Krox20* ou *Krox24*, également présent au cours du développement des cellules de Schwann. De plus, il ne

permet pas de reproduire un éventuel gain de fonction de la protéine Krox20 mutée pouvant également intervenir dans la pathologie humaine.

Mon second projet de thèse a donc consisté en la génération d'un modèle murin dans lequel j'ai introduit une mutation au sein du locus de *Krox20* affectant l'isoleucine 268 au niveau de la protéine codée. Nous souhaitions développer un modèle murin de CHN afin de mieux caractériser les altérations du processus de myélinisation et également étudier un éventuel défaut au niveau du système nerveux central des animaux mutants. Tout comme dans le cas des patients porteurs de cette mutation, l'allèle ne provoque une pathologie qu'à l'état homozygote dans la lignée de souris obtenue. Les souris homozygotes pour la mutation présentent de sévères défauts de locomotion clairement observables à partir de l'âge de deux semaines. Ces défauts s'aggravent ensuite rapidement, les souris présentant une paralysie quasiment totale des membres à l'âge de trois semaines environ, âge auquel elles meurent, probablement en raison de graves défauts respiratoires ou de problèmes cardiaques (Jacquin et al., 1996). L'étude histologique des nerfs brachiaux et sciatiques des souris mutantes comparés à ceux de souris sauvages montre une altération complexe du processus de myélinisation, avec une phase de retard de myélinisation, suivi d'une phase d'hypomyélinisation et enfin une phase finale de forte démyélinisation, correspondant à la période d'aggravation des symptômes. On observe de plus au niveau des fibres myélinisées des anomalies dans l'enroulement et parfois la compaction de la gaine de myéline, ainsi que la présence de macrophages porteurs de débris myéliniques aux stades les plus tardifs. Des études de prolifération et de mort cellulaire ont par ailleurs montré une dérégulation conduisant à l'accumulation des cellules de Schwann. Enfin, l'étude moléculaire a permis de mettre à jour une dérégulation de gènes clés pour le processus de myélinisation, dont *Krox20* et les *Nab*, associée notamment au maintien de gènes marqueurs de cellules de Schwann immatures. Par ailleurs, les souris homozygotes mutantes présentent une altération de l'organisation des nerfs crâniens, notamment avec la fusion des nerfs IX et X et plus rarement des nerfs V et VII/VIII, tout comme les mutants *Krox20*^{-/-}.

Les études menées au cours de ma thèse ont donc permis de mieux caractériser le rôle des différents domaines de Krox20 dans son activité transcriptionnelle, et de mieux appréhender le rôle de deux de ses cofacteurs, les protéines HCF-1 et Nab. Nous avons notamment caractérisé de nouveaux sites d'interaction de Krox20 avec HCF-1 et montré qu'HCF-1 jouait un rôle dans l'activation de *Krox20* et *Nab in vivo* au niveau du rhombencéphale. Nous avons également montré que les Nab jouaient à ce niveau un rôle de répresseur pour l'activité de Krox20 sur les cibles transcriptionnelles qu'il active. Enfin, nous

avons confirmé le rôle majeur de l'interaction entre les Nab et Krox20 au niveau du processus de myélinisation, avec la caractérisation d'un phénotype complexe suggérant l'intervention de Krox20 et des Nab à différentes étapes séquentielles de la myélinisation du SNP.

RESULTATS

A – Résumé des résultats présentés dans l'article 1

Le facteur de transcription à doigts-de-zinc Krox20 joue un rôle essentiel dans le processus de segmentation affectant transitoirement le rhombencéphale des vertébrés. Il contrôle en effet positivement et négativement l'expression de divers gènes, codant des facteurs participant à la délimitation des segments du rhombencéphale, la spécification de leur identité et le maintien de leur intégrité.

Nous avons cherché à caractériser les mécanismes impliqués dans l'activité transcriptionnelle de Krox20 en réalisant une étude structure-fonction de cette protéine au niveau du rhombencéphale. Notre étude a révélé une diversité inattendue des modes d'action de ce facteur de transcription à l'échelle du tissu considéré. La régulation de chacune des cinq cibles transcriptionnelles que nous avons testées requiert différents domaines de la protéine et/ou différents co-facteurs. La multiplicité des fonctions de Krox20 pourrait reposer sur la diversité de ses modes d'action.

Nous avons étudié de façon détaillée le rôle des Nab et d'Hcf-1, co-facteurs de Krox20, sur la régulation de son activité. Nous avons montré que les Nab jouent un rôle de régulateurs négatifs impliqués dans une boucle de régulation de la fonction activatrice de Krox20 au niveau du rhombencéphale. Par ailleurs, l'interaction entre Krox20 et HCF-1, médiée via des sites d'interaction redondants, est requise pour l'activation de certaines de ses cibles, en particulier pour l'autorégulation de *Krox20*, qui joue un rôle majeur dans la fonction de ce facteur de transcription.

B – Texte de l'article 1

Krox20 controls the transcription of its various targets in the developing hindbrain according to multiple modes

Anne Desmazières^{1,2}, Patrick Charnay^{1,2*} and Pascale Gilardi-Hebenstreit^{1,2}

¹INSERM, U784, 46 rue d'Ulm, 75230 Paris Cedex 05, France

²Ecole Normale Supérieure, 46 rue d'Ulm, 75230 Paris Cedex 05, France

**Correspondence should be addressed to P.C., INSERM U 784, 46 rue d'Ulm, 75230 Paris Cedex 05, France; tel: 33 1 44 32 36 07; fax: 33 1 44 32 39 88;*

mail: charnay@biologie.ens.fr

Running title: Modes of transcriptional regulation by Krox20

Key words: transcriptional co-factor/Nab/HCF/EphA4/Hoxb1

Materials and Methods word count : 624

Introduction, Results and Discussion word count : 4607

ABSTRACT

The zinc finger transcription factor Krox20 plays an essential role in the hindbrain segmentation process. It positively or negatively controls a large variety of other regulatory genes, coordinating delimitation of segmental territories, specification of their identity and maintenance of their integrity. We have investigated the molecular mechanisms of Krox20 transcriptional control by performing a detailed structure-function analysis of the protein in the developing hindbrain. This revealed an unsuspected diversity in the modes of action of a transcription factor in a single tissue, since regulation of each of the five tested target genes requires different parts of the protein and/or presumably different co-factors. The multiplicity of Krox20 functions might rely on this diversity. Two of the co-factors were studied in detail, Nab and HCF-1. We demonstrate that Nab acts as a negative feedback modulator of the different Krox20 activating functions in the hindbrain. Interaction between Krox20 and HCF-1 is required for the activation of some of the targets, in particular for *Krox20* auto-regulation, which is itself essential for Krox20 function, and appears mediated by redundant binding sites on the Krox20 protein.

INTRODUCTION

The development of the vertebrate hindbrain involves a transient segmentation process, dividing it along the anterior-posterior (AP) axis into 7 to 8 metameric units called rhombomeres (r) (41, 43, 80). This subdivision underlies the differentiation of hindbrain neurons in stereotyped patterns and the repeated organization of branchiomotor cranial nerves (9, 42). It also participates in the specification of neural crest cells and in the establishment of their pathways of migration into the branchial arches (3, 4, 18, 27, 44, 61, 72, 73), therefore playing a crucial role in the development of head and facial structures (26).

Hindbrain segmentation requires the delimitation of separate compartments, characterized by cell lineage restrictions (13) and specific patterns of gene expression related to the segment AP identity (reviewed in Lumsden and Krumlauf, 1996). Numerous genes have been shown to play crucial roles at different levels of the segmentation process (1, 2, 6, 7, 12, 15, 40, 48, 49, 54-56, 59, 60, 64, 76). Integrating this complex regulatory network constitutes a major challenge for reaching a comprehensive understanding of the segmentation process.

Krox20, also known as *Egr2*, is among these key regulatory genes and encodes a zinc-finger transcription factor (5, 25). It is expressed in two transverse stripes, that prefigure and subsequently correspond to r3 and r5 (77), and has been shown to be required for the formation and maintenance of these segments (59, 60, 75). More precisely it was established that *Krox20* plays multiple and complex roles in the initial formation and subsequent delimitation of the r3 and r5 territories (59, 67), in the specification of their identity and in particular of their odd-numbered character (22, 60), and in their stabilization by restriction of cell intermingling between adjacent rhombomeres (51, 70), therefore establishing that these processes are highly intertwined (75). To fulfill these different functions, *Krox20* controls the

expression, either positively or negatively, of a number of other regulatory genes. These include *Krox20* itself (8, 59), its *Nab* co-factors, which modulate *Krox20* activity (50, 57), several *Hox* genes, which participate in the specification of rhombomere identity (16, 22, 47, 53, 60, 63), *folliculin* (60), which may be involved in signalling between rhombomeres, and *Eph* family members, which are involved in cell segregation between adjacent rhombomeres (19, 51, 69, 70). Many of the genes positively regulated by *Krox20* constitute direct transcriptional targets of this factor, which binds to neighbouring cis-acting sequences (46, 53, 63, 70), whereas the repression of one gene, *Hoxb1*, was shown not to involve direct binding of *Krox20* to DNA (16). However, in most cases, the detailed molecular mechanisms underlying the various transcriptional activities of *Krox20* have not been studied. Although several proteins have been shown to interact with *Krox20* and/or to interfere with its activity, most of these studies were carried out in vitro and/or using artificial *Krox20* targets and it is therefore difficult to extrapolate their conclusions to any specific *Krox20* target in an in vivo situation, including the hindbrain. *Nab* proteins have been shown to bind a motif within *Krox20* called R1 and were initially described as antagonists of *Krox20* activating function in cultured cells (32, 57, 65, 68). However, this view was recently challenged by data suggesting that *Nabs* can also behave as positive modulators of *Krox20* activity in cultured cells (62) and, like *Krox20*, promote myelination in Schwann cells ((31), A.D., P.C. and P.G.H., unpublished data). HCF-1 and Ddx20 factors have been described as potential co-activator and co-repressor of *Krox20*, respectively, in cultured cells (20, 39). The only documented case in respect to hindbrain development is the interaction of *Krox20* with PIASx β , which is involved in the repression of *Hoxb1* (16).

The understanding of *Krox20* function in hindbrain development therefore justifies further efforts to decipher the mechanisms involved in the regulation of its various target genes in the embryo and in particular to identify which co-factors are involved. In the present

work, we have initiated such an in vivo analysis by localising the domains of the Krox20 protein that are required for the regulation in the hindbrain of five genes that are representatives of the various Krox20 transcriptional targets. This revealed an unexpected diversity in the modes of action of a transcription factor in a single tissue since regulation of each of these targets appeared to require different parts of the protein and/or presumably different co-factors. This diversity is likely to constitute an important element for Krox20 to fulfill its multiple functions. We also established that the Nab proteins act as general antagonists of transcriptional activation by Krox20 in the hindbrain. Finally, we identified several novel binding sites for HCF-1 within Krox20 and showed that mutation of all these sites prevented the transcriptional activation of both *Krox20* itself and *Nab*, but not of another target, *EphA4*. Therefore, although HCF-1 directly controls only one mode of activation by Krox20, the fact that it affects *Krox20* expression suggests that it may have a more general impact on events downstream to Krox20.

MATERIALS AND METHODS

Expression plasmid constructions

The complete Krox20 expressing plasmid, pAdRSVKrox20HA, is derived from pAdRSVKrox20 (22) by addition of a sequence encoding an HA epitope (TACCCATACGACGTACCAGACTACGCATCG) just before the STOP codon. The N-terminal deletions were generated by the replacement of the AvrII-BglIII fragment from the pAdRSVKrox20HA plasmid by 5' deleted versions generated by PCR using the Expand High Fidelity PCR system (Roche). The 5' primers contained an AvrII restriction site followed by a ATG initiation codon and 21 nucleotides encoding the 7 N-terminal amino acids of the deleted constructs and the 3' primer encoded the HA-tag followed by the BglIII restriction site. The Krox20 Δ 159-189 construct was generated using Exsite PCR-based Site-directed Mutagenesis kit (Stratagene), following the manufacturer instructions. Point mutations were introduced into plasmid pAdRSVKrox20HA using the Quickchange Multi Site-Directed mutagenesis kit (Stratagene). The mutations were as follows: pAdRSVKrox20I268FHA, ATC (isoleucine) changed into TTC (phenylalanine) at level of codon 268; HCF-1 sites ms1, ms3, ms4 (amino-acids 23/26, 99/102 and 162/165 respectively), GAC (aspartic acid) to GCC (alanine) and TAC (tyrosine) to ATC (isoleucine) and ms2 (amino-acids 71/74), GAT (aspartic acid) to GCT (alanine) and TAT (tyrosine) to ATT (isoleucine). The VP16Krox20 construct was generated by fusion of a sequence encoding VP16 activation domain (amino acids 413-490, (10)) to the 3' part of Krox20 (corresponding to amino-acids 309-470) followed by cloning into the pAdRSVSp vector (21). The mouse Nab1 and Nab2 expressing plasmids, pAdRSVNab1HA and pAdRSVNab2HA, were constructed by cloning the coding sequences into the pAdRSVSp vector (21), with the addition of an HA epitope coding sequence just before the STOP codon. The coding sequences of Nab1 and Nab2 were

obtained by PCR amplification from the IMAGE clones MRC 426565 and MRC 6306757 respectively and using the Expand High Fidelity PCR system (Roche). The mouse HCF-1 β -propeller expressing plasmid was constructed by cloning the coding sequence corresponding to the first 380 amino-acids of HCF-1 into the pCMVsport6 vector, with the insertion of a Flag epitope sequence (GATTACAAGGATGACGACGATAAGCTA) just after the initiation codon. The insert was amplified by PCR from the RZPD IMAGE clone 6509535 using the Phusion PCR system (Finnzymes). For all constructs, cloning junctions and point mutations were verified by sequencing, and the sizes and levels of expression of the proteins were analyzed by immunoblotting performed on extracts from transiently transfected 293 cells or electroporated chick embryos, using anti-HA (Anti-HA high affinity rat monoclonal antibody, Roche, ref. 1867423, dilution 1/400) or anti-Flag antibodies (Anti-Flag rabbit polyclonal IgG, SIGMA, ref. F7425, dilution 1/400).

Cell culture, transfection and co-immunoprecipitation assays

COS-7 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% (vol/vol) fetal bovine serum (Invitrogen). Transient transfection was performed with Lipofectamine 2000 according to the manufacturer's protocol (Invitrogen). Cells were analysed 48 h after transfection. For protein immunoprecipitation with the anti-HA antibody, transfected COS-7 cells were harvested in the following buffer: 100 mM Tris pH 7.5, 200 mM KCl, 0,1% NP40, 2 mM EDTA, 5% glycerol, with Protease inhibitor cocktail (Roche). Western blotting was performed using the ECL procedure according to the manufacturer's instructions (Amersham Bioscience, Inc) with a rabbit polyclonal anti-HA antibody (HA-probe (Y-11), Santa-Cruz, ref. sc-805, dilution 1/1000) to quantify Krox20 protein or an anti-Flag rabbit polyclonal antibody (SIGMA, ref. F7425, dilution 1/1000) to detect the co-immunoprecipitated HCF β -propeller.

***In ovo* electroporation and whole-mount *in situ* hybridization**

Electroporation and preparation of the embryos for *in situ* hybridization were performed as described previously (22) and on the average each result was based on the observation of 10 embryos. *In situ* hybridization was performed as described (78), using digoxigenin-labeled probes. The probes were as follow: *Krox20* (22), *EphA4* (58), *Hoxb1* (23, 24), *follicistatin* (23), and *Nab* (nucleotides 927 to 1563 of *Gallus gallus Nab* mRNA, NM 204268).

RESULTS

To analyze the mechanisms of the transcriptional regulation by Krox20 and to investigate the involvement of co-factors, we engaged into delineating the domains of the protein required for the control of different targets in the developing hindbrain. As a first step, the analysis of the evolutionary conservation of Krox20 amino acid sequence allowed to divide the protein into three regions (Supplementary Fig. S1): i) a large N-terminal domain corresponding approximately to two thirds of the protein, which is relatively well conserved with nevertheless some small areas of divergence; ii) an internal region (positions 312 to 425) that is extremely conserved and corresponds to the DNA binding domain (zinc fingers) flanked by upstream and downstream basic sequences; iii) a short C-terminal region that is very poorly conserved and is therefore not likely to play an important functional role. This distribution led us to concentrate on the N-terminal domain that appeared more likely to harbour transcriptional activation and repression domains. We therefore generated a nested series of N-terminal external deletions carrying a C-terminal HA-tag (Fig. 1A), electroporated expression constructs in the chick embryo hindbrain and compared their transcriptional activities to that of the wild type protein on five known Krox20 target genes. Preliminary experiments indicated that the presence of the C-terminal tag did not significantly affect the properties of the wild type protein in this assay (data not shown).

Transactivation of different targets involves distinct mechanisms

We first focused on three target genes that are positively regulated by Krox20: *Krox20* itself, *Nab* and *EphA4*. *Krox20* and *EphA4* have been previously shown to constitute direct transcriptional targets of Krox20 (8, 70) and to be ectopically activated by wild type Krox20 in chick electroporation experiments (22), see also Fig. 2A,I). Mouse *Nab* genes (*Nab1* and

Nab2) have been shown to require Krox20 for their expression in r3 and r5 (50). In the chick there is only one *Nab* gene known and its regulation has not been investigated so far. We showed by in situ hybridization that chick *Nab* expression follows that of *Krox20* in the hindbrain, with an initiation at around 7 and 9 ss in r3 and r5, respectively (Supplementary Fig. S2).

In ovo electroporation of the HA-tagged complete Krox20 construct efficiently induced *Krox20*, *Nab* and *EphA4* expression in the neural tube (Fig. 2A,E,I). Interestingly the rostral limits of ectopic expression appeared different for each gene, corresponding approximately to the mid-hindbrain and r1/r2 boundaries for *Krox20* and *EphA4*, respectively, whereas no rostral restriction was observed for *Nab* (Fig. 2A,E,I and (22)). Furthermore, ectopic activation of *EphA4* was strong in r2 and progressively decreased in r4 and r6 (Fig. 2I), whereas activation of *Krox20* and *Nab* was relatively uniform in the hindbrain (Fig. 2A,E).

In conclusion these data indicate that Krox20 can activate its own transcription as well as that of *EphA4* and *Nab* in the hindbrain, but that different regional restrictions apply to each target. This suggests that different limiting and unevenly distributed co-factors are required for the transcriptional activation of these genes and therefore that the molecular mechanisms involved are distinct.

The various Krox20 transcriptional activities are mediated by different domains

The next step was to compare the transcriptional activities of the different Krox20 N-terminal deletions on the three positive targets. To evaluate the relative activities, it was necessary to take into account possible variations in the relative amounts of the different proteins. For this purpose we performed Western blotting experiments with extracts from electroporated embryos and an antibody directed against the HA epitope. No major difference was observed (data not shown), suggesting that variations in target gene expression were

likely to reflect differences in transcriptional activity of the deleted proteins. The functional analysis of the deletions showed that transcriptional activations of *Krox20* and *Nab* on one side and *EphA4* on the other require different parts of Krox20. Whereas the deletion of the first 190 N-terminal amino acids (Krox20 Δ 1-190) completely abolished the ability of Krox20 to activate endogenous *Krox20* or *Nab* (Fig. 1B, 2A,B,E,F), this construct was still able to efficiently activate *EphA4* (Fig. 1B, 2I,J). Further deletions indicated that an element essential for *EphA4* induction was located between positions 216 and 235 (Fig. 1B, 2K,L). However a very low level of *EphA4* activation was maintained with Krox20 Δ 1-235 as well as with further deletions eliminating the entire N-terminal region (Fig. 1B, 2L-N). It is also interesting to note that the deletions that were not able to ectopically activate *Krox20* partially repressed its expression in r3 and r5 (Fig. 1B, 2B-D), therefore presenting a possible dominant-negative activity.

We then investigated the cases of two genes, *folliculin* and *Hoxb1*, previously shown to be repressed by Krox20 (22, 60). Deletion Krox20 Δ 1-216 repressed *folliculin* like the complete protein, whereas further deletions up to positions 235 and 258 did not (Fig. 1B, 2O-R). Regulation of *Hoxb1* showed different requirements since deletion of the 258 N-terminal amino acids did not prevent repression (Fig. 1B, 2S,T). The limited role of the N-terminal part of the protein in *Hoxb1* repression is consistent with previous work, in which an *Hoxb1* repression domain was mapped to the zinc finger region (16).

In conclusion, this analysis indicates that at least three different Krox20 domains are required for the transcriptional regulation of the tested targets: region 1-190 is necessary for the activation of *Krox20* and *Nab*, region 217-235 for the activation of *EphA4* and the repression of *folliculin*, whereas the zinc finger domain is sufficient for the repression of *Hoxb1*. These data raise the possibility that each of these domains might contain interaction interfaces for different co-factors that mediate transcriptional specificity.

Nab acts as a Krox20 antagonist for transcriptional activation in the hindbrain

Among Krox20 interactors, Nab proteins were shown to bind to the R1 domain of Krox20 and to behave either as antagonist (32, 57, 65, 68) or as positive modulators (62) of Krox20 activating function in cultured cells. Therefore we performed experiments designed to clarify the role of Krox20-Nab interactions during hindbrain segmentation. We first performed gain-of-function experiments involving in ovo electroporation of mouse *Nab1* or *Nab2* expression plasmids, followed by the analysis of the expression of Krox20 targets. Both Nab1 and Nab2 repressed *Krox20*, *Nab* and *EphA4* genes (Fig. 3A-C,E-G), with however some relative variations. *Krox20* and *EphA4* were more efficiently repressed by Nab2 whereas *Nab* repression was more sensitive to Nab1. As expected *Hoxb1*, which is not expressed in the Krox20-positive territory, was not affected by ectopic *Nab* expression (Fig. 3D,H). Altogether these data support the view that Nab antagonizes Krox20 activation function in the hindbrain.

Our external deletions were not informative on the role of the Krox20-Nab interaction, since the R1 domain, which is required for this interaction, is located downstream to the two regions required for transcriptional activation (Fig. 1). Therefore, to further investigate the implication of the Krox20-Nab interaction in the regulation of Krox20 targets, we introduced a mutation changing an isoleucine into phenylalanine at position 268 in the R1 domain (I268F), which was previously shown to abolish the interaction (57). In ovo electroporation of a construct encoding a complete Krox20 carrying this mutation (Krox20I268F) indicated that it was able to activate endogenous *Krox20*, *Nab* and *EphA4* and to repress *Hoxb1* (Fig. 3M-P). However, we noticed that in the cases of the activated targets, the efficiency of Krox20I268F was higher than that of the wild type construct (Fig. 3, compare I-K to M-O). Nevertheless the anterior restrictions were maintained (mid/hindbrain and r1/r2 boundaries for

Krox20 and *EphA4* respectively, data not shown). No effect of the mutation on *Hoxb1* repression was observed (Fig. 3L,P). Since *Krox20* is capable of activating *Nab* along the entire neural tube, our data are consistent with the following interpretation: wild type *Krox20* activates *Nab* which partially antagonizes its up-regulatory activity and therefore limits transcriptional activation of its targets; in the case of *Krox20*I268F the negative feedback loop is destroyed, allowing a higher level of expression of the activated targets. However, since *Krox20*I268F efficiently activates endogenous *Krox20*, which can interact with *Nab*, our data did not exclude a possible requirement of the interaction with *Nab* for the activation of other targets. To investigate this issue, we introduced the I268F mutation into the *Krox20* Δ 1-190 construct, which is unable to activate endogenous *Krox20*. As expected this construct did not activate *Krox20* and *Nab* and repressed *Hoxb1* (Fig. 3Q,R,T). In contrast, it efficiently activated *EphA4* (Fig. 3S), indicating that *Krox20*-*Nab* interaction is not required for *EphA4* transcriptional activation. In conclusion, altogether our data suggest that *Nab* acts as a negative modulator of the different *Krox20* positive transcriptional activities in the hindbrain.

***Krox20*-HCF interaction is required for *Krox20* and *Nab* activation**

We have shown that the first 190 amino acids of *Krox20* are required for transactivation of *Krox20* and *Nab*. This N-terminal part of the protein contains two acidic domains (Fig. 1A) whose deletion was previously shown to affect transcriptional activation of an artificial reporter construct containing multimerized *Krox20* binding sites in cultured cells (74). In addition, the second acidic domain harbours a binding motif for the HCF-1 factor (HBM, positions 162-165, Fig.1A) and HCF-1 was shown to stimulate activation by *Krox20* of a transfected reporter in cultured cells (39). To investigate whether HCF could act as a *Krox20* co-factor during the hindbrain segmentation, we first analysed *HCF* expression in the developing neural tube. Two *HCF* (*HCF-1* and *HCF-2*) genes were described in mammals

but only one *HCF* family member is known in the chick. In situ hybridization revealed that the chick gene is expressed in a decreasing rostro-caudal gradient in the neural tube, overlapping with *Krox20* expression domains (Supplementary Fig. S3). We then analyzed the involvement of the HBM and of the acidic domains in Krox20 activation function. For this purpose we generated additional external deletions covering the 1-190 region and an internal deletion, $\Delta 159-189$, eliminating the second acidic region and the HBM (Fig. 1A). Deletion of the first 50 N-terminal amino acids did not affect the capacity of Krox20 to activate endogenous *Krox20* (Fig. 1B, 4A,B). However, further external deletions progressively reduced the activity, with very significant drops when sequences 82-124 and 159-190 were eliminated (Figure 1B, 4C-F). Similar results were obtained for *Nab* transactivation (data not shown). In contrast, the internal deletion $\Delta 159-189$ only marginally affected endogenous *Krox20* and *Nab* activation (Fig. 4G-I). These data indicate that elimination of the first or the second acidic domain with the HBM does not abolish Krox20 activity. They suggest that several domains located between positions 1 and 190 participate in transcriptional activation and that they are partially redundant. On this basis we wondered whether Krox20 might contain additional sites for interaction with HCF-1. We therefore searched for evolutionarily conserved sequences with similarity to the HBM sequence (D/EHLY) within the 1-190 region. We identified three novel sequences fitting with a relaxed version of the consensus, D/EXXY, (Supplementary Fig. S1). Interestingly, the context of these new sequences and of the HBM allows to define an extended consensus I/LD/EXXYP/S (Supplementary Fig. S1). To investigate the possibility that these novel motifs might actually constitute HCF binding sites, we introduced point mutations (D/EXXY changed into AXXI) in all four sequences to generate Krox20ms1-4 (Fig. 1). Expression constructs for wild type or mutant Krox20 were then co-transfected into COS-7 cells with a plasmid designed to express a flag-tagged version of the β -propeller domain of HCF-1, which is known to interact with the HBM (28, 79). Co-

immunoprecipitation analyses revealed that the HCF-1 β -propeller specifically interacted with wild type Krox20 (Fig. 5A). The internal deletion (Δ 159-189) eliminating the HBM only diminished this interaction, which was largely reduced in the case of the Krox20ms1-4 mutant (Fig. 5A). These data indicate that elimination of the HBM is not sufficient to prevent the interaction between Krox20 and HCF-1 and suggest that we have identified additional bona fide HCF binding sites in Krox20 and that elimination of all of them largely compromises the interaction.

We then investigated the possible functional significance of the Krox20-HCF interaction in the hindbrain. Electroporation of the Krox20ms1-4 expression vector in the chick neural tube showed that the introduction of the four mutations abolished the ability of Krox20 to activate endogenous *Krox20* and largely compromised *Nab* activation (Fig. 5B,C,E,F). In contrast *EphA4* activation was unaffected (Fig. 5H,I). Analysis of various combinations of the four mutations indicated a clear redundancy between them for Krox20 activation (Supplementary Fig. S4). In conclusion these data suggest that an interaction between Krox20 and HCF is specifically required for the transactivation of *Krox20* and *Nab* and that this interaction does not absolutely requires the previously identified HBM, but rather relies on multiple interaction sites.

The establishment of a functional role of the HCF binding sites did not exclude an involvement of acid regions in transcriptional activation by Krox20. To investigate this possibility we grafted the acidic domain of VP16 to a version of Krox20 deleted of most of the N-terminal region (Krox20 Δ 1-309) to obtain VP16Krox20 (Fig.1) and tested the transcriptional activity of this novel construct. Surprisingly we found that VP16Krox20 was able to activate *Nab* expression very efficiently (Fig. 5G), whereas it was completely inactive in the case of *Krox20* (Fig. 5D). As expected this construct was also not able to activate *EphA4* (Fig. 5J). These data suggest that, although Krox20 requires the same HCF binding

sites for *Krox20* and *Nab* activation, the molecular mechanisms involved are nevertheless different, since a strong acidic activation domain can circumvent the need for HCF binding sites in the case of *Nab* but not of *Krox20*.

DISCUSSION

Transcriptional regulation by Krox20 involves various molecular mechanisms

In this work we have performed the first in vivo and systematic structure-function analysis of the Krox20 protein, focusing on its activity in the developing hindbrain. This analysis revealed an unexpected diversity in the modes of action of a transcription factor for the regulation of its the transcriptional targets in a single tissue. Differences have been detected at four levels: i) Three of the target genes (*Krox20*, *Nab* and *EphA4*) are activated by Krox20 and two (*follistatin* and *Hoxb1*) are repressed. ii) The regulation involves different domains of the Krox20 protein, as schematized in Fig. 6A. Hence *Krox20* and *Nab* activation requires elements located in the N-terminal 1-190 region and more specifically several HCF-1 binding sites, whereas this region is not necessary for *EphA4* induction, which necessitates a short domain located between positions 216 and 235. Repression of *follistatin* requires the same 216-235 domain, whereas only the DNA binding domain appears necessary for *Hoxb1* repression. iii) The competence for target gene activation shows regional variations in the neural tube, as summarized in Fig. 6B. Krox20 cannot activate *EphA4* rostrally to the r2/r1 boundary, *Krox20* rostrally to the mid/hindbrain boundary, whereas there is no rostral limit to the activation of *Nab*. iv) Addition of an exogenous activation domain reveals further differences in the activation potential: the VP16 acidic domain can compensate for the elimination of the 1-309 region for the activation of *Nab*, but not for that of *Krox20*.

These different properties in the transcriptional regulation of target genes suggest the involvement of distinct molecular mechanisms and of specific co-factors. In the present work, we delineate the precise role of the Nab co-factor in the hindbrain and we provide evidence that HCF-1 directly interacts with Krox20 and suggest that this interaction is required for *Krox20* and *Nab* activation (see below for further discussion of these points).

Concerning the different regulatory domains identified within the Krox20 protein, there is however an intriguing coincidence: the same region, the 216-235 domain, is required for both activation of *Eph4* and repression of *follistatin* (Fig. 6A). The small size of this domain raises the possibility that the same motif might be involved in the two processes, mediated by the binding a common interactor. Since we have previously shown that Krox20 is a direct transcriptional activator of *EphA4* (70), it is possible that Krox20 also directly activates another factor according to the same mechanism and that this factor is involved in the repression of *follistatin*.

The existence of several types of transcriptional mechanisms mediated by Krox20 raises the possibility that target genes controlled by the same mechanisms are more strictly co-regulated and that their classification according to this basis might be of functional significance. Further studies, for instance RNA profiling experiments performed following ectopic expression of the different Krox20 mutants in the neural tube, will be required to identify groups of genes that are regulated according to the same mechanisms and eventually reveal common functional characteristics. More generally, since Krox20 plays important roles in several other regulatory systems, including for instance peripheral nervous system myelination (30, 71), endochondral ossification (33), T cell function (52), lineage specification in hematopoietic cells (29), it will be interesting to determine whether the same principles apply to the regulation of its targets genes in these other cellular and developmental situations.

In conclusion, this study reveals a unique diversity in the mechanisms of transcriptional regulation by Krox20 in the developing hindbrain, raising the possibility that this might constitute an important element for Krox20 to fulfill its multiple and complex functions. It shows the interest of conducting similar *in vivo* analyses on other master regulatory genes involved in the control of numerous targets.

Nab acts as a negative feedback modulator of Krox20 in the hindbrain

Previous studies performed in cultured cells have shown that Nab can act either as an antagonist of Krox20 (57, 65) or as a co-activator (62) generating some confusion on its activity in vivo. In the present work we have established for the first time that Nab antagonizes Krox20 activating functions in an in vivo situation, during hindbrain development. For this purpose, we used two approaches: ectopic expression of *Nab* leads to repression of the three up-regulated targets tested in this study and prevention of Krox20-Nab interaction by the introduction of a specific mutation in Krox20 results in over-activation of these target genes (Fig. 3). Similarly, we have shown that in ovo electroporation of a dominant-negative version of Nab (66) also leads to over-expression of endogenous *Nab* in r3 and r5 (data not shown). Since *Nab* is itself activated by Krox20 in the hindbrain ((50) and this work), these data suggest that it is part of a negative feedback loop controlling Krox20 activation function. The present work is consistent with previous observations indicating that *Nab* misexpression in the zebrafish embryo results in alterations in hindbrain patterning (50). However, unlike in the latter work, no modifications in the limits and extent of rhombomeres were observed in the present study, presumably because *Nab* ectopic expression occurs at a later developmental stage in the chick electroporation system than in the fish injection procedure. Nevertheless this work provides a molecular explanation for the previously observed patterning defects. The fact that repression of endogenous *Krox20* by Nab in r3 is never accompanied by activation of *Hoxb1* suggests that conversion to an r4 phenotype is not observed, as it is the case in a mouse *Krox20* null mutant (75). This again is likely to reflect the late character of *Krox20* repression in the electroporation system and is consistent with the fact that a delayed inactivation of *Krox20* in the mouse does not prevent r3 formation (11); Taillebourg and Charnay, unpublished data).

HCF-1 is an important co-factor of Krox20 in the hindbrain

Our study revealed the implication of another Krox20 co-factor, HCF-1, in the activation of *Krox20* and *Nab*. HCF-1 was first identified as an interactor of Herpes Simplex Virus VP16 (17) and contains a transactivation domain important for VP16 function (38). HCF-1 also interacts with various cellular factors, generally via its β -propeller region (14, 35-37), as it is the case with VP16 (81). Its interaction with histone modifying enzymes, like Sin3 deacetylase or Set1 methyltransferase, raises the possibility of its implication at several levels of the transcription process (82).

The factors interacting with the β -propeller region of HCF-1 usually contain an HBM (14, 34, 37, 45, 82). An HBM was identified in Krox20, and its disruption reduced the activation by Krox20 of a co-transfected target reporter in cultured cells (39). However, in the latter study binding of HCF-1 to the mutated Krox20 was not investigated. In the present work, we have shown that Krox20 indeed binds to HCF-1, via the β -propeller domain, but that disruption of the HBM is not sufficient to prevent this interaction nor to affect Krox20 transcriptional properties in the developing hindbrain. We have identified three other motifs within the Krox20 N-terminal region with homology to the HBM and close to the consensus I/LD/EXXYP/S. Mutation of the four motifs affects interaction with HCF-1 more seriously and prevents transcriptional activation of *Krox20* and *Nab*. These data allow us to draw several conclusions. First, they designate HCF-1 as a likely co-factor of Krox20 in the regulation of *Krox20* and *Nab*. This is consistent with the *HCF-1* expression pattern since it is present in the hindbrain at the time of expression of the latter genes. Our work further suggests the existence of additional motifs for HCF-1 binding, slightly different from the HBM. It will be therefore interesting to re-examine HCF-1 potential interactors for the presence of this novel motif. Our data also indicate that the different HCF-1 binding sites are

redundant since elimination of various combinations does not abolish Krox20 autoactivation. This suggest that their likely role consists in tethering HCF-1 to a Krox20 DNA binding site close to the target gene, rather than leading to the formation of a precise complex between Krox20 and HCF-1.

The effect of the disruption of the four HCF-1 binding sites on transcriptional activation is similar to the elimination of the whole N-terminal 1-190 region, which also contains two acidic domains. However, this does not preclude a role of these latter domains, in addition to the HCF-1 binding sites. An indirect argument in favour of such a possibility is that the capacity to activate *Nab* can be restored on a deleted Krox20 protein by addition of the VP16 acidic domain, which does not contain any putative HCF-1 binding motif as defined in this work (data not shown). Further studies will be required to clarify the possible role of the acidic domains. In any case, our data suggest that the Krox20-HCF-1 interaction plays an essential role in the developing hindbrain, raising the possibility that this could also be the case in other tissues where Krox20 or other members of Egr/Krox20 family are implicated, since some of the HCF-1 binding motifs are conserved in Egr1/Krox24 and Egr3 (data not shown).

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Christine Vesque-Kishtoo, Charlotte Labalette and Julien Ghislain for critical reading of the manuscript. This work was supported by grants from Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Ministère de l'Education Nationale de la Recherche et de la Technologie (MENRT), Agence Nationale pour la Recherche, Association pour la Recherche sur le Cancer and Association Française contre les Myopathies. AD was supported by predoctoral fellowships from MENRT and Association Française contre les Myopathies.

REFERENCES

1. **Barrow, J. R., H. S. Stadler, and M. R. Capecchi.** 2000. Roles of Hoxa1 and Hoxa2 in patterning the early hindbrain of the mouse. *Development* **127**:933-44.
2. **Bell, E., R. J. Wingate, and A. Lumsden.** 1999. Homeotic transformation of rhombomere identity after localized Hoxb1 misexpression. *Science* **284**:2168-71.
3. **Birgbauer, E., J. Sechrist, M. Bronner-Fraser, and S. Fraser.** 1995. Rhombomeric origin and rostrocaudal reassortment of neural crest cells revealed by intravital microscopy. *Development* **121**:935-45.
4. **Bronner-Fraser, M.** 1995. Patterning of the vertebrate neural crest. *Perspect Dev Neurobiol* **3**:53-62.
5. **Chavrier, P., M. Zerial, P. Lemaire, J. Almendral, R. Bravo, and P. Charnay.** 1988. A gene encoding a protein with zinc fingers is activated during G0/G1 transition in cultured cells. *Embo J* **7**:29-35.
6. **Chisaka, O., T. S. Musci, and M. R. Capecchi.** 1992. Developmental defects of the ear, cranial nerves and hindbrain resulting from targeted disruption of the mouse homeobox gene Hox-1.6. *Nature* **355**:516-20.
7. **Choe, S. K., and C. G. Sagerstrom.** 2004. Paralog group 1 hox genes regulate rhombomere 5/6 expression of vhnf1, a repressor of rostral hindbrain fates, in a meis-dependent manner. *Dev Biol* **271**:350-61.
8. **Chomette, D., M. Frain, S. Cereghini, P. Charnay, and J. Ghislain.** 2006. Krox20 hindbrain cis-regulatory landscape: interplay between multiple long-range initiation and autoregulatory elements. *Development* **133**:1253-62.
9. **Clarke, J. D., L. Erskine, and A. Lumsden.** 1998. Differential progenitor dispersal and the spatial origin of early neurons can explain the predominance of single-phenotype clones in the chick hindbrain. *Dev Dyn* **212**:14-26.
10. **Das, G., C. S. Hinkley, and W. Herr.** 1995. Basal promoter elements as a selective determinant of transcriptional activator function. *Nature* **374**:657-60.
11. **Decker, L., C. Desmarquet-Trin-Dinh, E. Taillebourg, J. Ghislain, J. M. Vallat, and P. Charnay.** 2006. Peripheral myelin maintenance is a dynamic process requiring constant Krox20 expression. *J Neurosci* **26**:9771-9.
12. **Deflorian, G., N. Tiso, E. Ferretti, D. Meyer, F. Blasi, M. Bortolussi, and F. Argenton.** 2004. Prep1.1 has essential genetic functions in hindbrain development and cranial neural crest cell differentiation. *Development* **131**:613-27.
13. **Fraser, S., R. Keynes, and A. Lumsden.** 1990. Segmentation in the chick embryo hindbrain is defined by cell lineage restrictions. *Nature* **344**:431-5.
14. **Freiman, R. N., and W. Herr.** 1997. Viral mimicry: common mode of association with HCF by VP16 and the cellular protein LZIP. *Genes Dev* **11**:3122-7.
15. **Frohman, M. A., G. R. Martin, S. P. Cordes, L. P. Halamek, and G. S. Barsh.** 1993. Altered rhombomere-specific gene expression and hyoid bone

- differentiation in the mouse segmentation mutant, kreisler (kr). *Development* **117**:925-36.
16. **Garcia-Dominguez, M., P. Gilardi-Hebenstreit, and P. Charnay.** 2006. PIASxbeta acts as an activator of Hoxb1 and is antagonized by Krox20 during hindbrain segmentation. *Embo J* **25**:2432-42.
 17. **Gerster, T., and R. G. Roeder.** 1988. A herpesvirus trans-activating protein interacts with transcription factor OTF-1 and other cellular proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**:6347-51.
 18. **Ghislain, J., C. Desmarquet-Trin-Dinh, P. Gilardi-Hebenstreit, P. Charnay, and M. Frain.** 2003. Neural crest patterning: autoregulatory and crest-specific elements co-operate for Krox20 transcriptional control. *Development* **130**:941-53.
 19. **Gilardi-Hebenstreit, P., M. A. Nieto, M. Frain, M. G. Mattei, A. Chestier, D. G. Wilkinson, and P. Charnay.** 1992. An Eph-related receptor protein tyrosine kinase gene segmentally expressed in the developing mouse hindbrain. *Oncogene* **7**:2499-506.
 20. **Gillian, A. L., and J. Svaren.** 2004. The Ddx20/DP103 dead box protein represses transcriptional activation by Egr2/Krox-20. *J Biol Chem* **279**:9056-63.
 21. **Giudicelli, F., P. Gilardi-Hebenstreit, F. Mechta-Grigoriou, C. Poquet, and P. Charnay.** 2003. Novel activities of Matf underlie its dual role in hindbrain segmentation and regional specification. *Dev Biol* **253**:150-62.
 22. **Giudicelli, F., E. Taillebourg, P. Charnay, and P. Gilardi-Hebenstreit.** 2001. Krox-20 patterns the hindbrain through both cell-autonomous and non cell-autonomous mechanisms. *Genes Dev* **15**:567-80.
 23. **Graham, A., and A. Lumsden.** 1996. Interactions between rhombomeres modulate Krox-20 and follistatin expression in the chick embryo hindbrain. *Development* **122**:473-80.
 24. **Guthrie, S., I. Muchamore, A. Kuroiwa, H. Marshall, R. Krumlauf, and A. Lumsden.** 1992. Neuroectodermal autonomy of Hox-2.9 expression revealed by rhombomere transpositions. *Nature* **356**:157-9.
 25. **Joseph, L. J., M. M. Le Beau, G. A. Jamieson, Jr., S. Acharya, T. B. Shows, J. D. Rowley, and V. P. Sukhatme.** 1988. Molecular cloning, sequencing, and mapping of EGR2, a human early growth response gene encoding a protein with "zinc-binding finger" structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**:7164-8.
 26. **Kontges, G., and A. Lumsden.** 1996. Rhombencephalic neural crest segmentation is preserved throughout craniofacial ontogeny. *Development* **122**:3229-42.
 27. **Kulesa, P. M., and S. E. Fraser.** 2000. In ovo time-lapse analysis of chick hindbrain neural crest cell migration shows cell interactions during migration to the branchial arches. *Development* **127**:1161-72.
 28. **LaBoissiere, S., S. Walker, and P. O'Hare.** 1997. Concerted activity of host cell factor subregions in promoting stable VP16 complex assembly and preventing interference by the acidic activation domain. *Mol Cell Biol* **17**:7108-18.
 29. **Laslo, P., C. J. Spooner, A. Warmflash, D. W. Lancki, H. J. Lee, R. Sciammas, B. N. Gantner, A. R. Dinner, and H. Singh.** 2006. Multilineage

- transcriptional priming and determination of alternate hematopoietic cell fates. *Cell* **126**:755-66.
30. **Le, N., R. Nagarajan, J. Y. Wang, T. Araki, R. E. Schmidt, and J. Milbrandt.** 2005. Analysis of congenital hypomyelinating *Egr2*^{Lo/Lo} nerves identifies *Sox2* as an inhibitor of Schwann cell differentiation and myelination. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:2596-601.
 31. **Le, N., R. Nagarajan, J. Y. Wang, J. Svaren, C. LaPash, T. Araki, R. E. Schmidt, and J. Milbrandt.** 2005. Nab proteins are essential for peripheral nervous system myelination. *Nat Neurosci* **8**:932-40.
 32. **LeBlanc, S. E., S. W. Jang, R. M. Ward, L. Wrabetz, and J. Svaren.** 2006. Direct regulation of myelin protein zero expression by the *Egr2* transactivator. *J Biol Chem* **281**:5453-60.
 33. **Levi, G., P. Topilko, S. Schneider-Maunoury, M. Lasagna, S. Mantero, B. Pesce, G. Gherzi, R. Cancedda, and P. Charnay.** 1996. Role of *Krox-20* in endochondral bone formation. *Ann N Y Acad Sci* **785**:288-91.
 34. **Lin, J., P. Puigserver, J. Donovan, P. Tarr, and B. M. Spiegelman.** 2002. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1beta (PGC-1beta), a novel PGC-1-related transcription coactivator associated with host cell factor. *J Biol Chem* **277**:1645-8.
 35. **Lu, R., and V. Misra.** 2000. Zhangfei: a second cellular protein interacts with herpes simplex virus accessory factor HCF in a manner similar to Luman and VP16. *Nucleic Acids Res* **28**:2446-54.
 36. **Lu, R., P. Yang, P. O'Hare, and V. Misra.** 1997. Luman, a new member of the CREB/ATF family, binds to herpes simplex virus VP16-associated host cellular factor. *Mol Cell Biol* **17**:5117-26.
 37. **Lu, R., P. Yang, S. Padmakumar, and V. Misra.** 1998. The herpesvirus transactivator VP16 mimics a human basic domain leucine zipper protein, luman, in its interaction with HCF. *J Virol* **72**:6291-7.
 38. **Luciano, R. L., and A. C. Wilson.** 2002. An activation domain in the C-terminal subunit of HCF-1 is important for transactivation by VP16 and LZIP. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:13403-8.
 39. **Luciano, R. L., and A. C. Wilson.** 2003. HCF-1 functions as a coactivator for the zinc finger protein *Krox20*. *J Biol Chem* **278**:51116-24.
 40. **Lufkin, T., A. Dierich, M. LeMeur, M. Mark, and P. Chambon.** 1991. Disruption of the *Hox-1.6* homeobox gene results in defects in a region corresponding to its rostral domain of expression. *Cell* **66**:1105-19.
 41. **Lumsden, A.** 1990. The cellular basis of segmentation in the developing hindbrain. *Trends Neurosci* **13**:329-35.
 42. **Lumsden, A., and R. Keynes.** 1989. Segmental patterns of neuronal development in the chick hindbrain. *Nature* **337**:424-8.
 43. **Lumsden, A., and R. Krumlauf.** 1996. Patterning the vertebrate neuraxis. *Science* **274**:1109-15.
 44. **Lumsden, A., N. Sprawson, and A. Graham.** 1991. Segmental origin and migration of neural crest cells in the hindbrain region of the chick embryo. *Development* **113**:1281-91.
 45. **Mahajan, S. S., M. M. Little, R. Vazquez, and A. C. Wilson.** 2002. Interaction of HCF-1 with a cellular nuclear export factor. *J Biol Chem* **277**:44292-9.

46. **Manzanares, M., J. Nardelli, P. Gilardi-Hebenstreit, H. Marshall, F. Giudicelli, M. T. Martinez-Pastor, R. Krumlauf, and P. Charnay.** 2002. Krox20 and kreisler co-operate in the transcriptional control of segmental expression of Hoxb3 in the developing hindbrain. *Embo J* **21**:365-76.
47. **Manzanares, M., H. Wada, N. Itasaki, P. A. Trainor, R. Krumlauf, and P. W. Holland.** 2000. Conservation and elaboration of Hox gene regulation during evolution of the vertebrate head. *Nature* **408**:854-7.
48. **McKay, I. J., I. Muchamore, R. Krumlauf, M. Maden, A. Lumsden, and J. Lewis.** 1994. The kreisler mouse: a hindbrain segmentation mutant that lacks two rhombomeres. *Development* **120**:2199-211.
49. **McNulty, C. L., J. N. Peres, N. Bardine, W. M. van den Akker, and A. J. Durston.** 2005. Knockdown of the complete Hox paralogous group 1 leads to dramatic hindbrain and neural crest defects. *Development* **132**:2861-71.
50. **Mechta-Grigoriou, F., S. Garel, and P. Charnay.** 2000. Nab proteins mediate a negative feedback loop controlling Krox-20 activity in the developing hindbrain. *Development* **127**:119-28.
51. **Mellitzer, G., Q. Xu, and D. G. Wilkinson.** 2000. Control of cell behaviour by signalling through Eph receptors and ephrins. *Curr Opin Neurobiol* **10**:400-8.
52. **Mittelstadt, P. R., and J. D. Ashwell.** 1999. Role of Egr-2 in up-regulation of Fas ligand in normal T cells and aberrant double-negative lpr and gld T cells. *J Biol Chem* **274**:3222-7.
53. **Nonchev, S., C. Vesque, M. Maconochie, T. Seitanidou, L. Ariza-McNaughton, M. Frain, H. Marshall, M. H. Sham, R. Krumlauf, and P. Charnay.** 1996. Segmental expression of Hoxa-2 in the hindbrain is directly regulated by Krox-20. *Development* **122**:543-54.
54. **Pasini, A., and D. G. Wilkinson.** 2002. Stabilizing the regionalisation of the developing vertebrate central nervous system. *Bioessays* **24**:427-38.
55. **Rijli, F. M., M. Mark, S. Lakkaraju, A. Dierich, P. Dolle, and P. Chambon.** 1993. A homeotic transformation is generated in the rostral branchial region of the head by disruption of Hoxa-2, which acts as a selector gene. *Cell* **75**:1333-49.
56. **Rossel, M., and M. R. Capecchi.** 1999. Mice mutant for both Hoxa1 and Hoxb1 show extensive remodeling of the hindbrain and defects in craniofacial development. *Development* **126**:5027-40.
57. **Russo, M. W., B. R. Sevetson, and J. Milbrandt.** 1995. Identification of NAB1, a repressor of NGFI-A- and Krox20-mediated transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:6873-7.
58. **Sajjadi, F. G., and E. B. Pasquale.** 1993. Five novel avian Eph-related tyrosine kinases are differentially expressed. *Oncogene* **8**:1807-13.
59. **Schneider-Maunoury, S., P. Topilko, T. Seitanidou, G. Levi, M. Cohen-Tannoudji, S. Pournin, C. Babinet, and P. Charnay.** 1993. Disruption of Krox-20 results in alteration of rhombomeres 3 and 5 in the developing hindbrain. *Cell* **75**:1199-214.
60. **Seitanidou, T., S. Schneider-Maunoury, C. Desmarquet, D. G. Wilkinson, and P. Charnay.** 1997. Krox-20 is a key regulator of rhombomere-specific gene expression in the developing hindbrain. *Mech Dev* **65**:31-42.

61. **Serbedzija, G. N., M. Bronner-Fraser, and S. E. Fraser.** 1992. Vital dye analysis of cranial neural crest cell migration in the mouse embryo. *Development* **116**:297-307.
62. **Sevetson, B. R., J. Svaren, and J. Milbrandt.** 2000. A novel activation function for NAB proteins in EGR-dependent transcription of the luteinizing hormone beta gene. *J Biol Chem* **275**:9749-57.
63. **Sham, M. H., C. Vesque, S. Nonchev, H. Marshall, M. Frain, R. D. Gupta, J. Whiting, D. Wilkinson, P. Charnay, and R. Krumlauf.** 1993. The zinc finger gene Krox20 regulates HoxB2 (Hox2.8) during hindbrain segmentation. *Cell* **72**:183-96.
64. **Studer, M., A. Lumsden, L. Ariza-McNaughton, A. Bradley, and R. Krumlauf.** 1996. Altered segmental identity and abnormal migration of motor neurons in mice lacking Hoxb-1. *Nature* **384**:630-4.
65. **Svaren, J., B. R. Sevetson, E. D. Apel, D. B. Zimonjic, N. C. Popescu, and J. Milbrandt.** 1996. NAB2, a corepressor of NGFI-A (Egr-1) and Krox20, is induced by proliferative and differentiative stimuli. *Mol Cell Biol* **16**:3545-53.
66. **Svaren, J., B. R. Sevetson, T. Golda, J. J. Stanton, A. H. Swirnoff, and J. Milbrandt.** 1998. Novel mutants of NAB corepressors enhance activation by Egr transactivators. *Embo J* **17**:6010-9.
67. **Swiatek, P. J., and T. Gridley.** 1993. Perinatal lethality and defects in hindbrain development in mice homozygous for a targeted mutation of the zinc finger gene Krox20. *Genes Dev* **7**:2071-84.
68. **Swirnoff, A. H., E. D. Apel, J. Svaren, B. R. Sevetson, D. B. Zimonjic, N. C. Popescu, and J. Milbrandt.** 1998. Nab1, a corepressor of NGFI-A (Egr-1), contains an active transcriptional repression domain. *Mol Cell Biol* **18**:512-24.
69. **Taneja, R., B. Thisse, F. M. Rijli, C. Thisse, P. Bouillet, P. Dolle, and P. Chambon.** 1996. The expression pattern of the mouse receptor tyrosine kinase gene MDK1 is conserved through evolution and requires Hoxa-2 for rhombomere-specific expression in mouse embryos. *Dev Biol* **177**:397-412.
70. **Theil, T., M. Frain, P. Gilardi-Hebenstreit, A. Flenniken, P. Charnay, and D. G. Wilkinson.** 1998. Segmental expression of the EphA4 (Sek-1) receptor tyrosine kinase in the hindbrain is under direct transcriptional control of Krox-20. *Development* **125**:443-52.
71. **Topilko, P., S. Schneider-Maunoury, G. Levi, A. Baron-Van Evercooren, A. B. Chennoufi, T. Seitanidou, C. Babinet, and P. Charnay.** 1994. Krox-20 controls myelination in the peripheral nervous system. *Nature* **371**:796-9.
72. **Trainor, P. A., and R. Krumlauf.** 2000. Patterning the cranial neural crest: hindbrain segmentation and Hox gene plasticity. *Nat Rev Neurosci* **1**:116-24.
73. **Trainor, P. A., D. Sobieszczuk, D. Wilkinson, and R. Krumlauf.** 2002. Signalling between the hindbrain and paraxial tissues dictates neural crest migration pathways. *Development* **129**:433-42.
74. **Vesque, C., and P. Charnay.** 1992. Mapping functional regions of the segment-specific transcription factor Krox-20. *Nucleic Acids Res* **20**:2485-92.
75. **Voiculescu, O., E. Taillebourg, C. Pujades, C. Kress, S. Buart, P. Charnay, and S. Schneider-Maunoury.** 2001. Hindbrain patterning: Krox20 couples segmentation and specification of regional identity. *Development* **128**:4967-78.

76. **Waskiewicz, A. J., H. A. Rikhof, R. E. Hernandez, and C. B. Moens.** 2001. Zebrafish Meis functions to stabilize Pbx proteins and regulate hindbrain patterning. *Development* **128**:4139-51.
77. **Wilkinson, D. G., S. Bhatt, P. Chavrier, R. Bravo, and P. Charnay.** 1989. Segment-specific expression of a zinc-finger gene in the developing nervous system of the mouse. *Nature* **337**:461-4.
78. **Wilkinson, D. G., and M. A. Nieto.** 1993. Detection of messenger RNA by in situ hybridization to tissue sections and whole mounts. *Methods Enzymol* **225**:361-73.
79. **Wilson, A. C., R. N. Freiman, H. Goto, T. Nishimoto, and W. Herr.** 1997. VP16 targets an amino-terminal domain of HCF involved in cell cycle progression. *Mol Cell Biol* **17**:6139-46.
80. **Wingate, R. J., and A. Lumsden.** 1996. Persistence of rhombomeric organisation in the postsegmental hindbrain. *Development* **122**:2143-52.
81. **Wysocka, J., and W. Herr.** 2003. The herpes simplex virus VP16-induced complex: the makings of a regulatory switch. *Trends Biochem Sci* **28**:294-304.
82. **Wysocka, J., M. P. Myers, C. D. Laherty, R. N. Eisenman, and W. Herr.** 2003. Human Sin3 deacetylase and trithorax-related Set1/Ash2 histone H3-K4 methyltransferase are tethered together selectively by the cell-proliferation factor HCF-1. *Genes Dev* **17**:896-911.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Analysis of the activities of mutant Krox20 proteins. (A) Schematic representation of wild type and mutant Krox20 proteins. Previously known domains are indicated: two acidic domains (AD), the R1 domain, which binds the Nab cofactor, and the DNA binding domain consisting of three zinc fingers (ZF). Numbers below the line indicate amino acid positions. The name of each deletion mutant indicates the deleted region. The positions of the previously described HCF-1 Binding Motif (HBM/HCF-s4) as well as of the binding sites identified in this work (HCF-s1, 2, 3) are indicated along the sequence of the mutant in which they have been eliminated (Krox20 ms1-4). (B) The table summarizes the transcriptional activities of the N-terminal deletions tested on five different target genes (*Krox20*, *Nab*, *EphA4*, *folllistatin* and *Hoxb1*). (++) indicates strong activation, (+) activation, (+/0) very weak activation, (--) strong repression, (-) repression and (0) no activity; nd, not done.

Figure 2. The various Krox20 transcriptional activities are mediated by different domains. Chick embryo neural tubes were electroporated on the left side with wild type or truncated *Krox20* expression constructs as indicated in each figure, in situ hybridized with the probes indicated in each panel and flat mounted. (A-D) Analysis of endogenous *Krox20* expression indicates that deletion of the 190 N-terminal amino acids abolishes ectopic activation and even leads to repression of *Krox20* in r3 and r5. (E-H) Analysis of *Nab* expression reveals an ectopic activation with no rostral restriction, which is also lost upon deletion of the 190 N-terminal amino acids. (I-N) Analysis of *EphA4* expression indicates that ectopic activation is restricted to r2, r4 and r6, with a level decreasing rostro-caudally. Deletion of the 235 N-terminal amino acids eliminates most of this activity. (O-R) Analysis of *folllistatin* reveals a partial repression by Krox20, which is lost upon deletion of the 235 N-terminal amino acids.

(S,T) Analysis of *Hoxb1* expression shows a repression by Krox20, which is maintained upon elimination of most of the N-terminal region, with however a slight reduction. This latter effect might be an indirect consequence of the lack of induction of endogenous *Krox20* by Krox20 Δ 1-258. Anterior is up. r, rhombomere.

Figure 3. Nab factors antagonize Krox20 activating functions. Chick embryo neural tubes were electroporated on the left side with the expression constructs indicated above each column, in situ hybridized with the probes indicated on the left and flat mounted. (A-H) *Krox20* is repressed following both mouse *Nab1* and *Nab2* overexpression (A,E), *Nab* is repressed by Nab1 (B) but only weakly by Nab2 (F), and in contrast *EphA4* is only weakly repressed by Nab1 (C) but more efficiently by Nab2 (G). *Hoxb1* expression is not affected by Nab1 or Nab2 (D,H). Note that the repression is mostly observed in the dorsal part of the neural tube, reflecting a higher efficiency of electroporation as observed previously (22) (similar effects are observed in cases of activation, see (J,M,S) for instance). (I-P) The I268F mutation increases the activation potential of Krox20 on itself, *Nab* and *EphA4*. The repression of *Hoxb1* is not significantly affected. (Q-T) The I268F mutation does not affect the activation of *EphA4* in a context in which endogenous *Krox20* is not induced. Anterior is up. r, rhombomere.

Figure 4. Several regions located between positions 1 and 190 cooperate for *Krox20* and *Nab* activation. (A-I) Chick embryo neural tubes were electroporated on the left side with the expression constructs indicated above each figure, in situ hybridized with *Krox20* (A-G) or *Nab* (H,I) probes and flat mounted. (A-F) Nested N-terminal external deletions progressively reduce Krox20 ability to activate its own expression. (G-I) The internal deletion Δ 159-189 does not severely affect *Krox20* or *Nab* activation.

Figure 5. Krox20-HCF interaction is required for activation of *Krox20* and *Nab*. (A) Co-immunoprecipitation of Krox20 with the β -propeller region of HCF-1. COS-7 cells were transfected with the expression plasmids indicated above each line. Cell lysates were subjected to immunoprecipitation with anti-HA antibody and the precipitates were analysed by Western blotting using anti-flag or anti-HA antibodies. The HCF-1 flagged β -propeller is not detected in immunoprecipitates from non-transfected cells (NT) or cells transfected with HCF β -propeller or Krox20 expression constructs alone. A 42 kDa band corresponding to the β -propeller is observed in case of co-transfection with wild type Krox20. The intensity of the 42 kDa band is reduced upon co-transfection with Krox20 Δ 159-189, which is deleted of the previously identified HCF binding motif (HBM). A larger reduction is observed in case of co-transfection with the protein mutated in all the HBM-like motifs (Krox20ms1-4). Western blotting analysis using the anti-HA antibody establishes that the reduction in the β -propeller band in the case of the Krox20ms1-4 mutant is not due to lower amounts of the Krox20 protein. (B-J) Chick embryo neural tubes were electroporated on the left side with the expression constructs indicated above, in situ hybridized with the probes indicated on the left and flat mounted. Whereas Krox20 is able to activate *Krox20* and *Nab* (B,E), Krox20ms1-4 shows no such activity (C,F). However, Krox20ms1-4 is still able to normally activate *EphA4* (H,I). The VP16-Krox20 construct efficiently activates *Nab* (G), but not *Krox20* nor *EphA4* (D,J).

Figure 6. Schematic representation of Krox20 functional organization and of its competence territories in the hindbrain. (A). Several distinct domains are involved in the different Krox20 transcriptional activities and constitute established or putative binding sites for co-factors. The N-terminal part of the protein contains the four binding sites for HCF-1 (red stars),

required for *Krox20* and *Nab* activation. A domain located between positions 216 and 235 (purple box) is required for *EphA4* activation and *follistatin* repression and may bind one or several unknown factors (Xs). The previously described R1 domain (blue box) binds Nab factors that antagonize *Krox20* activation functions and establish a negative feedback-loop. The zinc-finger domain (ZF) is sufficient for *Hoxb1* repression via the interaction with PIASx β . (B) Endogenous *Krox20*, *Nab* and *EphA4* expression is restricted to r3 and r5 (left side). Upon exogenous *Krox20* expression, distinct territories of competence for ectopic activation of the three targets are observed (right side): *EphA4* expression is confined to the r2-r4-r6 region with a decreasing rostro-caudal gradient, *Krox20* expression is caudally restricted to the mid-hindbrain boundary and *Nab* expression shows no restriction. mb : midbrain, r : rhombomere, sc : spinal chord.

Supplementary Fig. S1. Sequence alignments of *Krox20* amino-acid sequences from several vertebrate species. This reveals a relatively good evolutionary conservation of a large N-terminal domain, an almost absolute conservation of a region containing the DNA binding domain (positions 312 to 425) and very weak conservation in the C-terminal domain. The previously described HCF-1 binding motif (HCF-s4) and the three sequences related to this site (HCF-s1, 2, 3) and involved in *Krox20* transcriptional activity are indicated by red boxes. The isoleucine within the R1 domain involved in the interaction with Nab factors is indicated by a blue box. Numbers above the line indicate amino acid positions of the N-terminal deletions.

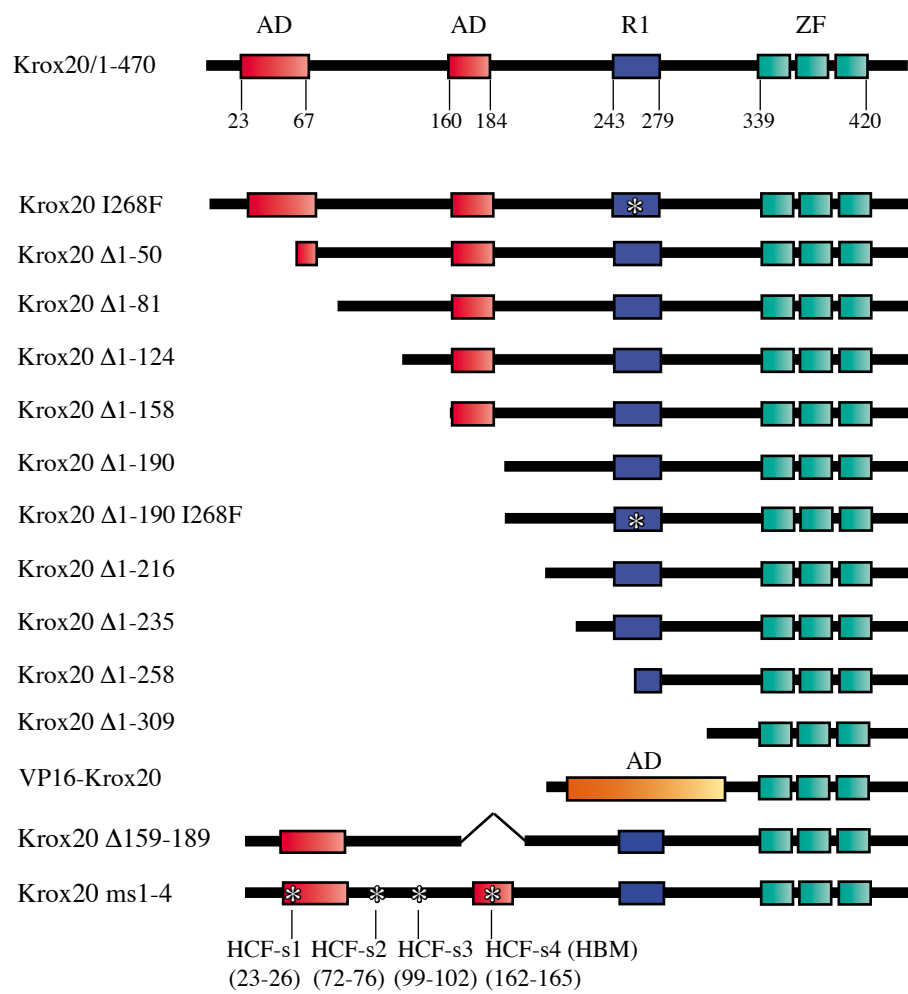
Supplementary Fig. S2. Analysis of *Nab* expression in the chick developing hindbrain. Whole mounts (A-C) and flat-mounted hindbrain (D) from chick embryos in situ hybridized

with a *Nab* probe at the indicated somite stage (ss). At 7 ss, the expression of *Nab* is strong in r3 and being initiated in r5. Later on the gene is expressed in r3 and r5.

Supplementary Fig. S3. Analysis of *HCF* expression in the chick developing hindbrain. A unique *HCF* gene is known so far in the chick genome and was used to perform *in situ* hybridizations. (A-C) Whole mounts (lateral views) and (D-F) flat-mounted hindbrains from embryos at the indicated somite stage (ss). In (C-F) double *in situ* hybridization with *Krox20* was performed and stained in orange. *HCF* is expressed in a decreasing gradient from the midbrain to the posterior part of the hindbrain and overlaps with the *Krox20*-positive domains (r3 and r5).

Supplementary Fig. S4. The different HCF-1 binding sites are redundant for transcriptional activity. (A-P) Flat-mounted hindbrains from chick embryos electroporated on the left side with the expression plasmids indicated above and analyzed by *in situ* hybridization with the probes indicated on the left side. Introduction of one (ms1, ms2, ms3, m4), two (ms1/4, ms2/3) or three (ms1/2/4) mutations in the HCF binding sites does not abolish the activation potential in respect of *Krox20*.

A



B

	Krox20	Krox20 Δ1-50	Krox20 Δ1-81	Krox20 Δ1-124	Krox20 Δ1-158	Krox20 Δ1-190	Krox20 Δ1-216	Krox20 Δ1-235	Krox20 Δ1-258	Krox20 Δ1-309
<i>Krox20</i>	++	++	++	+	+	0	nd	nd	-	-
<i>Nab</i>	++	++	++	+	+	0	nd	nd	0	0
<i>EphA4</i>	++	++	++	++	++	++	++	+/-	+/-	+/-
<i>Follistatin</i>	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0
<i>Hoxb1</i>	--	nd	nd	nd	--	--	nd	nd	-	-

Figure 1

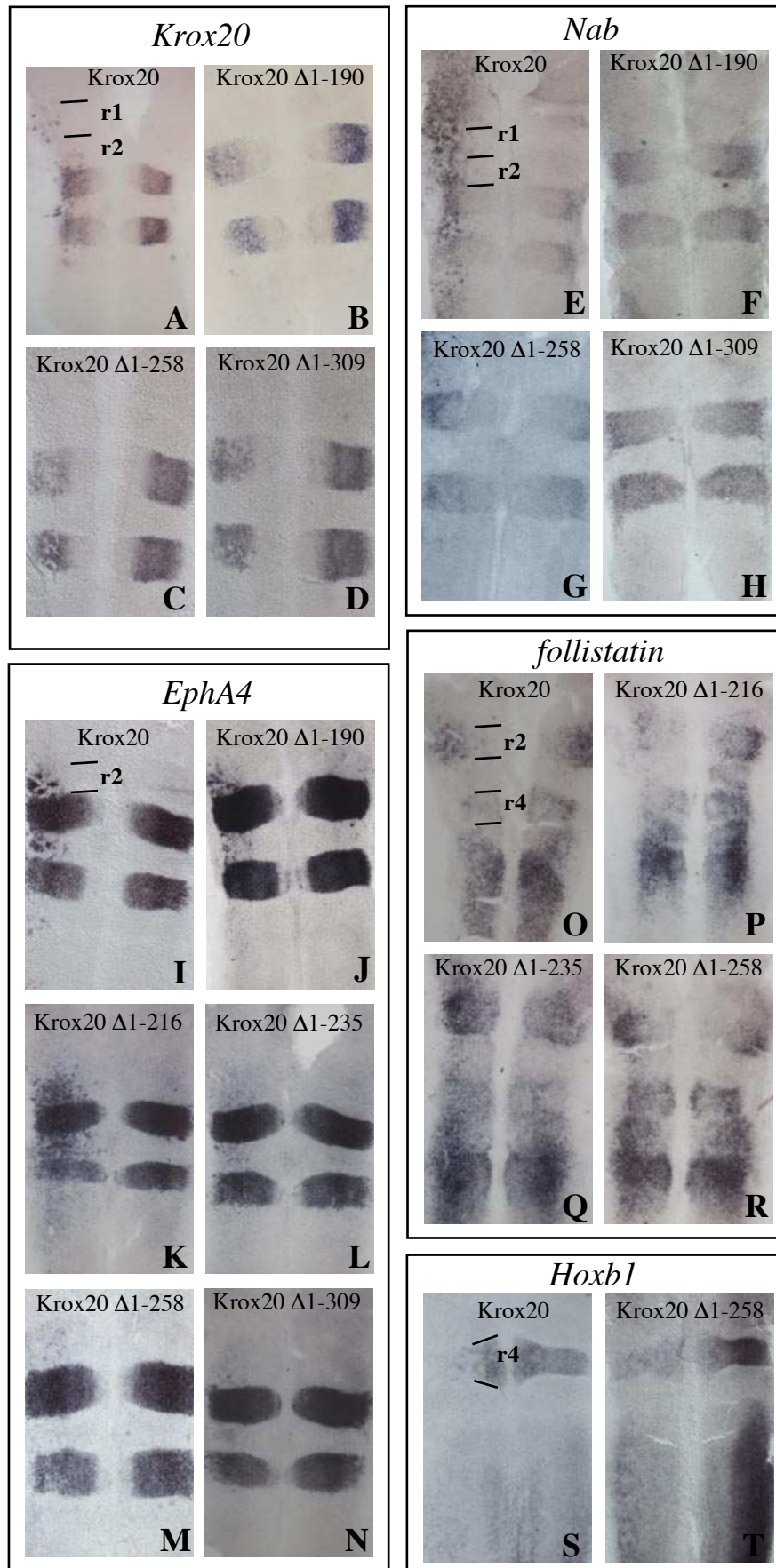


Figure 2

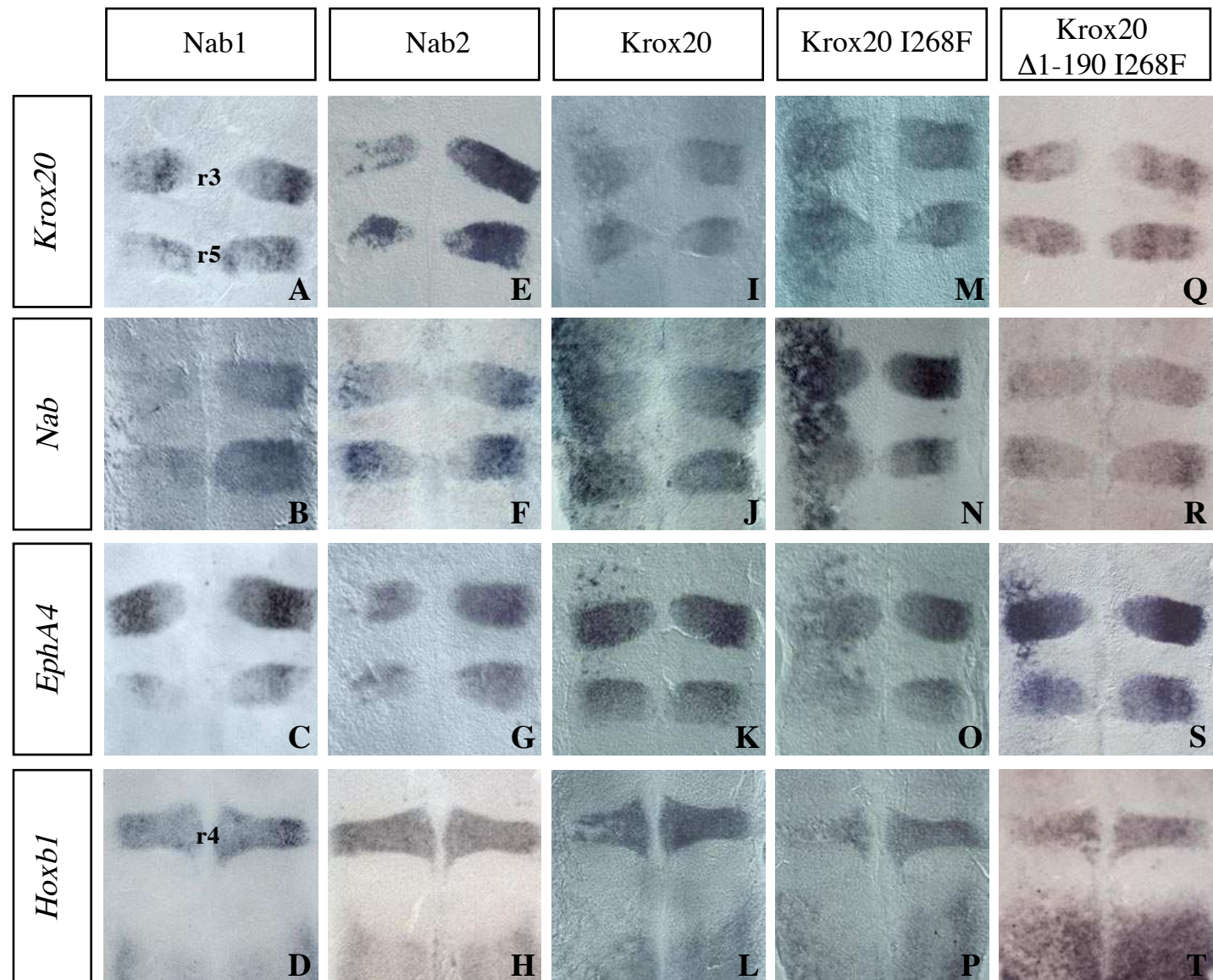


Figure 3

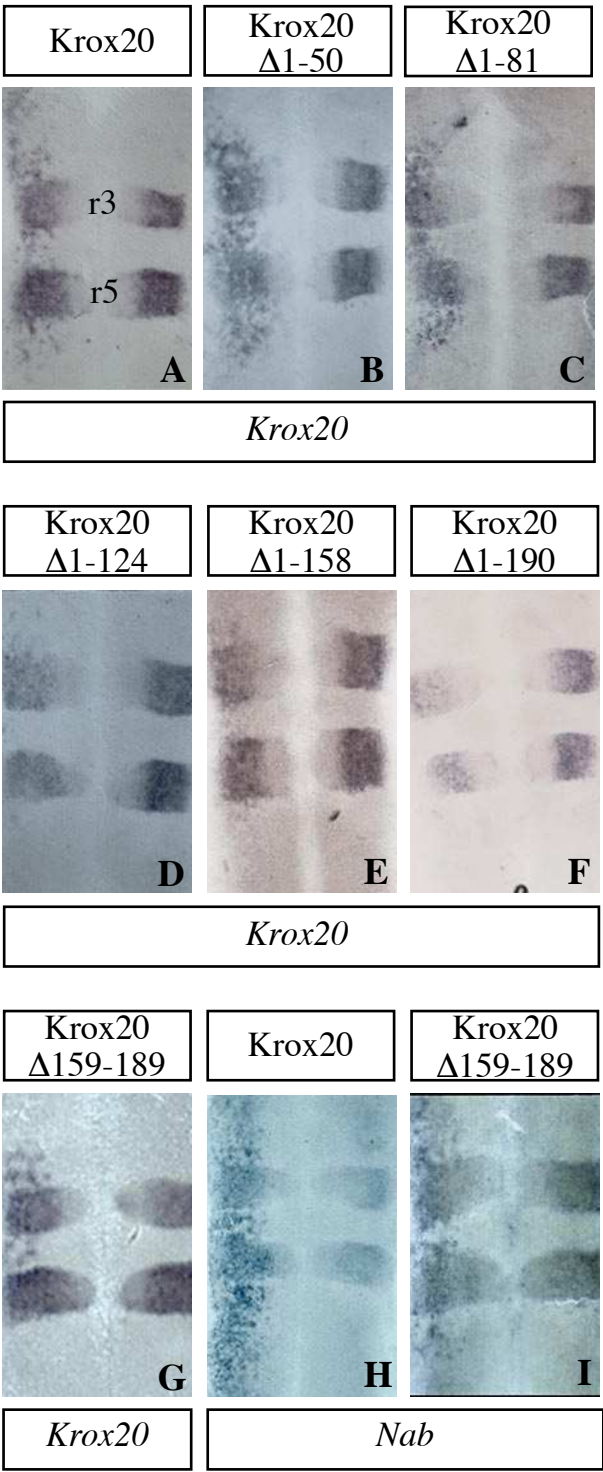


Figure 4

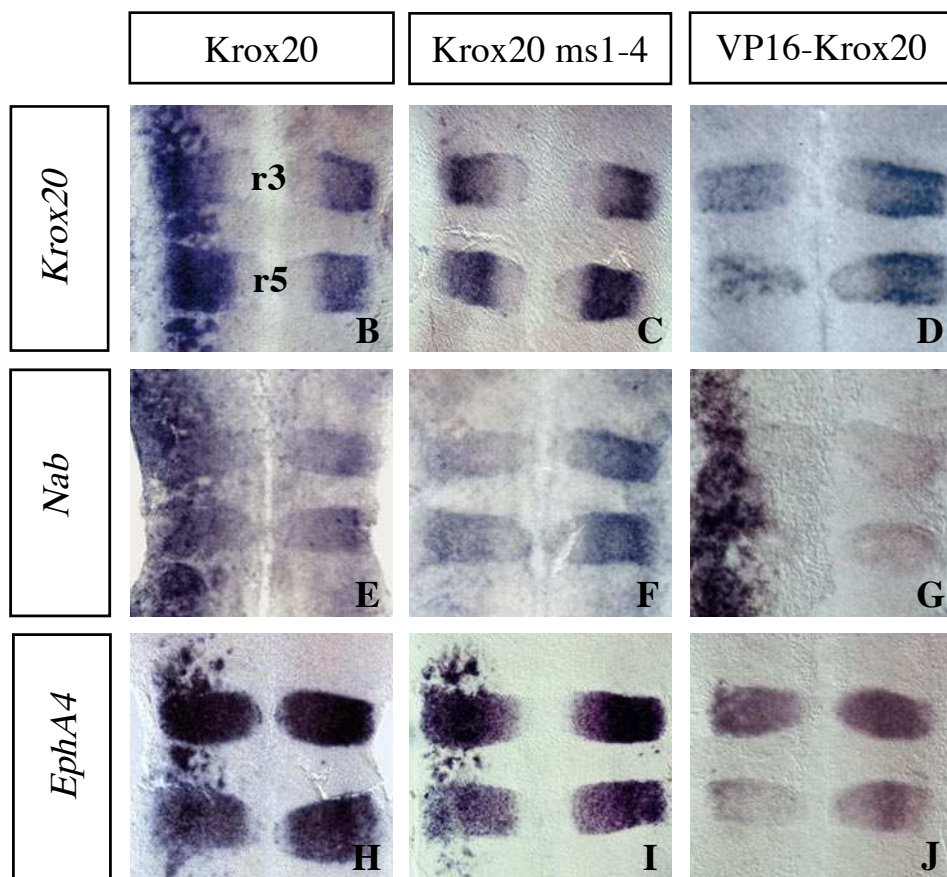
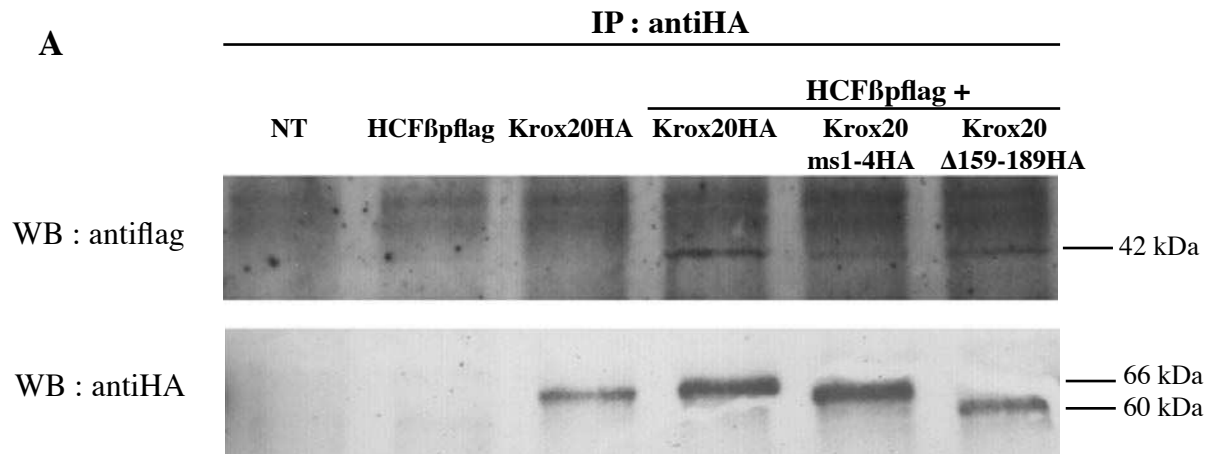


Figure 5

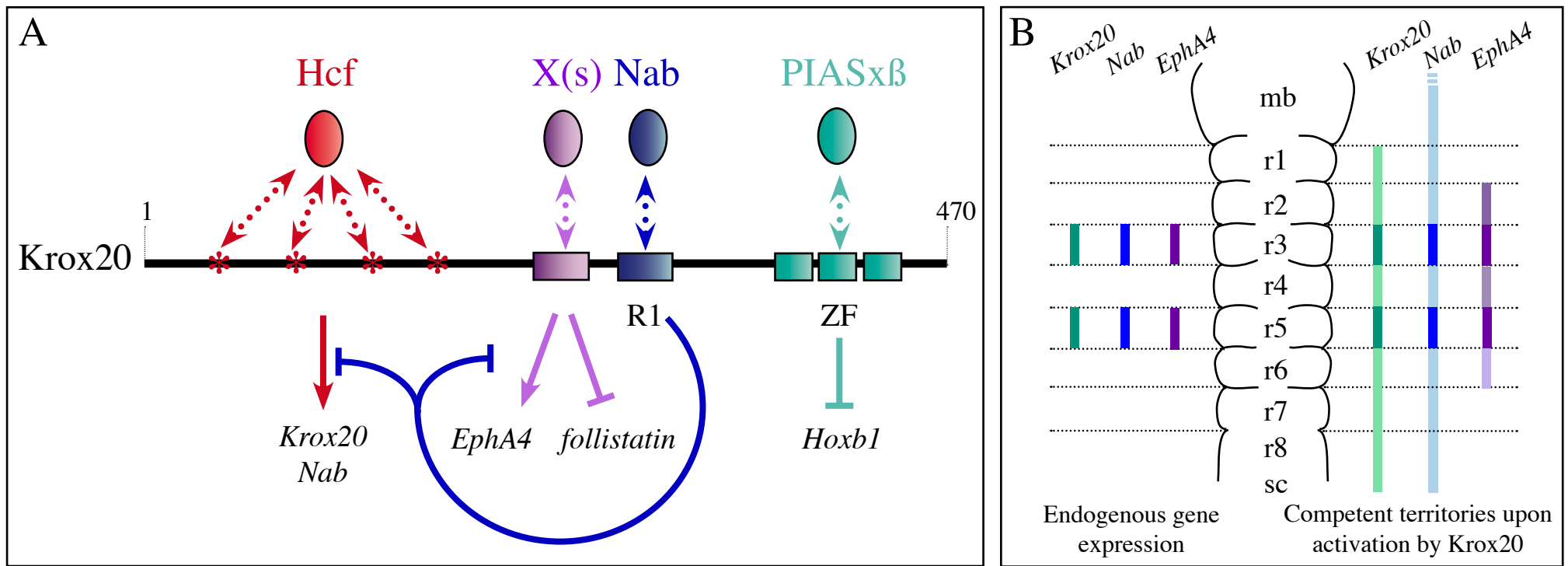


Figure 6

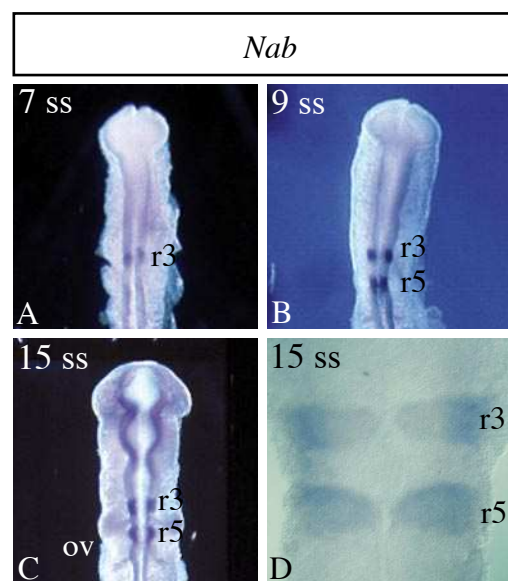


Figure S2

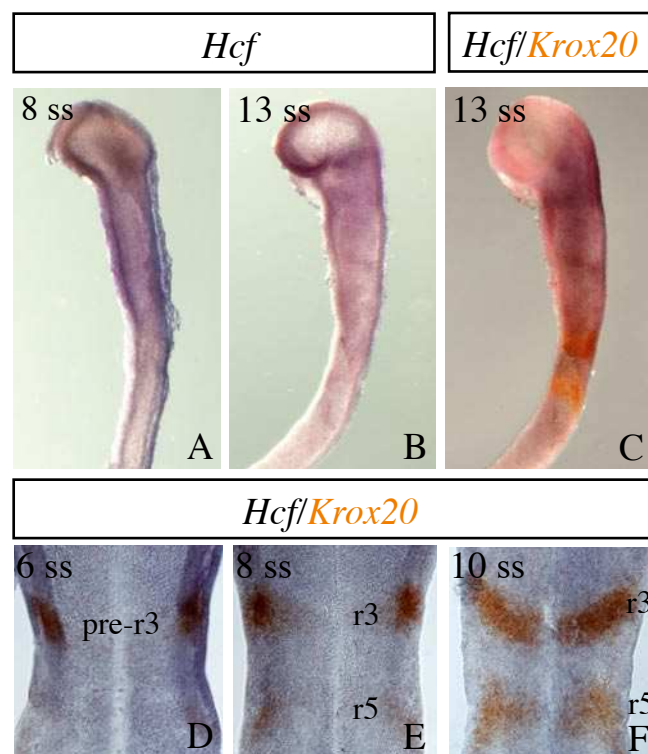


Figure S3

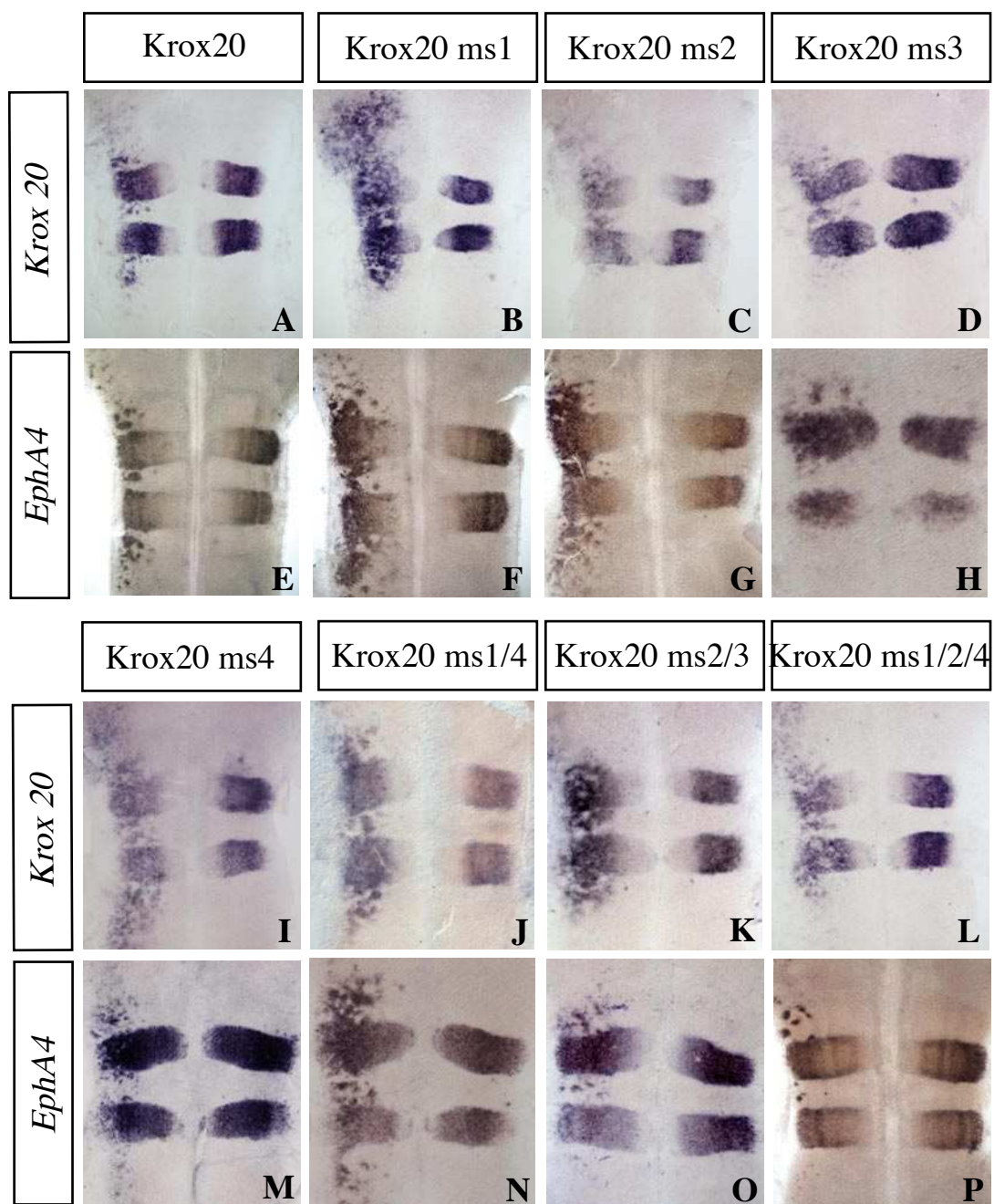


Figure S4

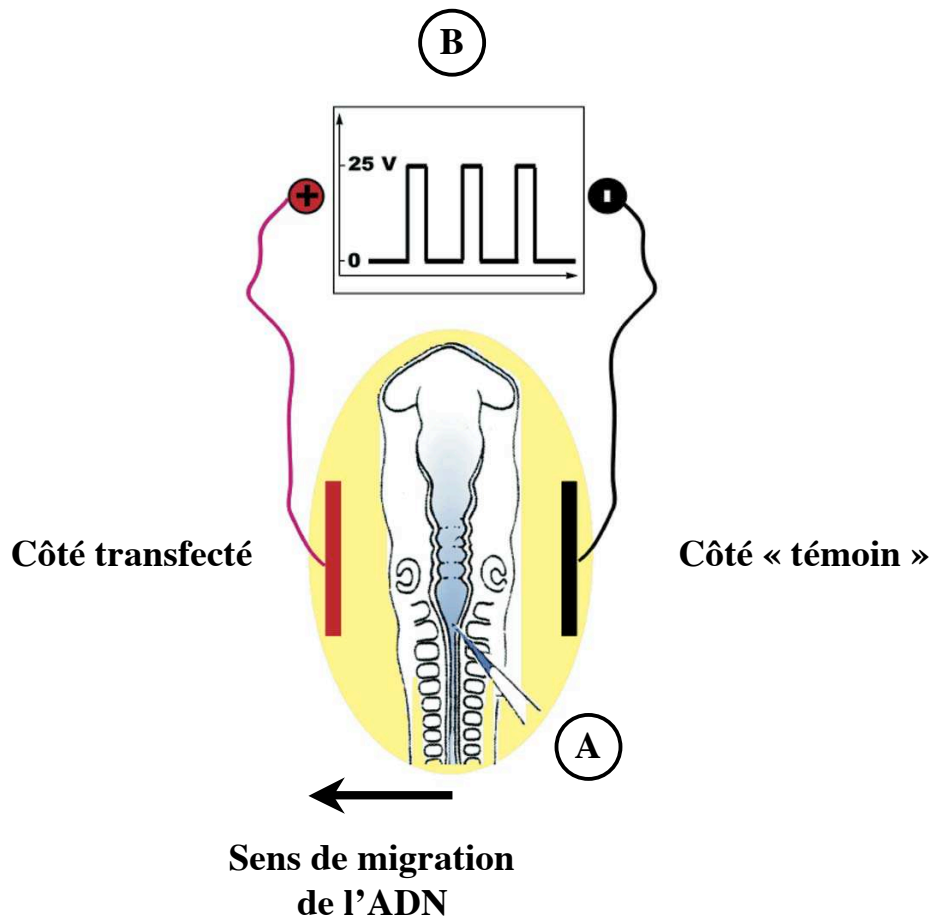


Figure A1 : Schématisation de la technique d'électroporation chez l'embryon de poulet

Les oeufs sont préalablement incubés à 37°C afin d'atteindre le stade de développement HH8-9 (environ 4 à 6 somites) et sont ensuite ouverts de façon à accéder facilement à l'embryon.

A - Injection dans la lumière du tube neural de l'embryon d'une solution contenant le ou les plasmides d'intérêt.

B - Application d'un courant électrique sous forme d'une série de pulses, après avoir placé les électrodes de part et d'autre de l'embryon, parallèlement à l'axe antéro-postérieur. Ce courant induit une désorganisation temporaire de la membrane plasmique, permettant l'entrée des plasmides dans les cellules du neuroépithélium. L'ADN étant chargé négativement, il migre uniquement vers l'anode, ce qui permet de réaliser une transfection hémilatérale, le côté non électroporé de l'embryon pouvant servir de témoin interne.

Les œufs sont ensuite refermés et réincubés environ 20h, temps permettant l'expression des plasmides et le développement des embryons jusqu'au stade souhaité. Ceux-ci sont alors récupérés afin d'être utilisés pour différents types d'études.

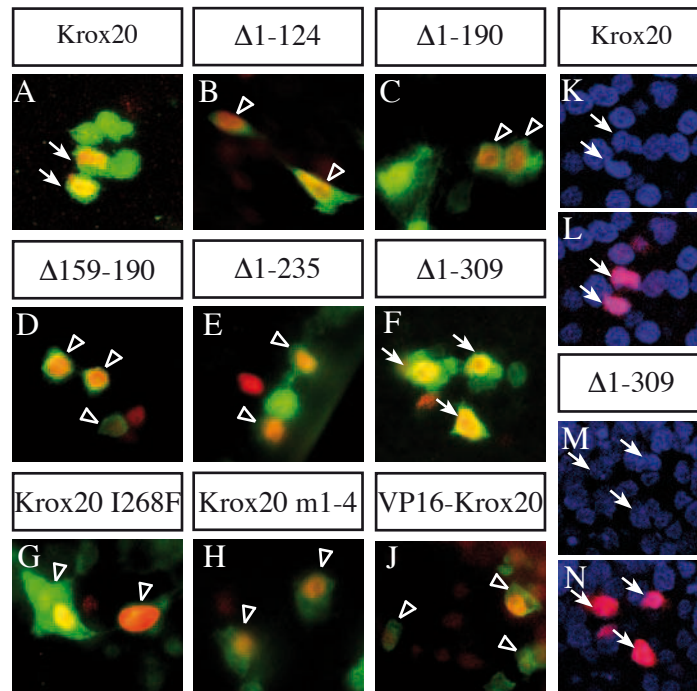


Figure A2 : Expression et localisation des différentes versions de Krox20 étudiées

A - J : Après co-électroporation avec un plasmide codant la GFP, la protéine étudiée est visualisée par immunomarquage (en rouge). La protéine GFP (en vert) est ubiquitaire, tandis que les différentes versions de Krox20 testées sont nucléaires (flèches et têtes de flèche).

K - N : Les résultats précédemment obtenus sont confirmés par détection de la protéine Krox20 électroporée (en rouge) avec un marquage nucléaire réalisé avec du Hoechst (en bleu). Les photographies K et L correspondent à l'image A (protéine Krox20 sauvage), les photographies M et N à l'image F (version de la protéine Krox20 ne conservant que le domaine à doigts-de-zinc). Les noyaux exprimant la protéine d'intérêt sont signalés par une flèche blanche. K et M : marquage nucléaire seul. L et N : co-marquage de la protéine d'intérêt (en rouge) et des noyaux (en bleu).

	Krox20	Krox20 Δ1-50	Krox20 Δ1-81	Krox20 Δ1-124	Krox20 Δ1-158	Krox20 Δ1-190	Krox20 Δ1-216	Krox20 Δ1-235	Krox20 Δ1-258	Krox20 Δ1-309	Krox20 I268F	Krox20 190-I268F	Krox20 ms1-4	VP16 Krox20	Krox20 Δ159-189
<i>Krox20</i>	++ 19/25	++ 5/5	++ 4/4	+ 11/11	+ 10/11	- 14/14	nd	nd	- 2/2	- 4/5	+++ 2/2	0 7/7	0 11/14	0 6/6	++ 3/3
<i>Nab</i>	++ 19/20	++ 1/1	++ 2/3	+ 3/5	+ 3/4	0 17/17	nd	nd	0 1/1	0 4/4	+++ 16/17	0 7/7	0 8/8	+++ 6/6	++ 5/6
<i>EphA4</i>	++ 32/34	++ 1/1	++ 1/1	++ 4/4	++ 4/4	++ 12/12	++ 6/7	+/0 3/3	+/0 6/8	+/0 5/5	+++ 12/13	++ 11/11	++ 15/19	0 9/9	++ 5/7
<i>Follis- tatin</i>	- 5/8	- 1/2	- 1/1	- 3/3	- 2/2	- 5/12	- 4/5	0 5/5	0 1/1	0 5/5	nd	nd	nd	nd	nd
<i>Hoxb1</i>	-- 20/26	nd	nd	nd	-- 1/1	-- 6/6	nd	nd	- 3/3	- 4/7	- 3/4	-- 5/5	nd	nd	nd

Figure A3 : Tableau statistique de l'activité des différentes versions de Krox20 testées sur la régulation de diverses cibles transcriptionnelles

Les résultats présentés correspondent aux effets de différentes versions de *Krox20* électroporées chez l'embryon de poulet sur l'expression de diverses cibles transcriptionnelles endogènes. Les constructions testées sont indiquées sur la première ligne du tableau, les cibles transcriptionnelles dont l'expression a été vérifiée par hybridation *in situ* sont présentées dans la première colonne. L'activation ectopique des cibles induites par Krox20 est indiquée comme suit : + (faible), ++ (moyenne) ou +++ (forte). De même, la répression induite par Krox20 est indiquée par - (faible) ou -- (forte), l'absence de modification de l'expression étant signalée par un 0. Les nombres indiqués représentent le nombre d'embryons présentant l'effet décrit sur le nombre total d'embryons considérés pour chaque condition.

C – Résumé des résultats présentés dans l'article 2

Krox20/Egr2 est un gène maître codant un facteur de transcription à doigts-de-zinc impliqué dans le développement du système nerveux central et périphérique. Des travaux précédemment menés dans le laboratoire ont notamment permis de montrer que *Krox20*, exprimé dans les cellules de Schwann promyélinisantes et myélinisantes, joue un rôle essentiel durant le processus de myélinisation du système nerveux périphérique. En effet, en l'absence de ce facteur, les cellules de Schwann restent bloquées à l'état promyélinisant et n'expriment pas de protéines de myéline, suggérant un rôle majeur de *Krox20* dans l'induction de la phase de myélinisation active. Des mutations affectant la séquence codante du gène *Krox20* ont par ailleurs été caractérisées chez des patients souffrant de différentes formes de maladies de Charcot-Marie-Tooth (CMT), pathologies correspondant à des myélinopathies du système nerveux périphérique.

Nous avons généré une lignée de souris portant une mutation ponctuelle au niveau du locus *Krox20* correspondant à une mutation récessive caractérisée chez des patients souffrant de la forme la plus sévère de Charcot-Marie-Tooth, appelée Neuropathie Hypomyélinisante Congénitale (CHN). Cette mutation induit une perte d'interaction entre *Krox20* et ses cofacteurs Nab, qui semblent également jouer un rôle important dans le processus de myélinisation. Les souris mutantes homozygotes obtenues présentent deux semaines après leur naissance de forts défauts de locomotion, évoluant de façon rapide vers une paralysie des membres et meurent autour de l'âge de trois semaines. Des études menées par microscopie électronique sur des échantillons de nerfs sciatiques prélevés à différents âges ont permis de montrer que ces souris présentent une altération du processus de myélinisation, conduisant à une forte hypomyélinisation. L'expression de différents gènes est de plus dérégulée chez les animaux mutants, avec une forte diminution de l'expression des marqueurs de myéline, tels *Mpz* ou *MBP*, et un maintien d'expression de gènes normalement inhibés aux stades étudiés, tels *Krox24/Egr1* et *Oct6/SCIP*. Les souris homozygotes mutantes présentent également une fusion de certains nerfs crâniens, défaut également observé chez le mutant *Krox20*^{-/-}.

D – Texte de l'article 2

RESULTS

Progressive and fatal paralysis in *Krox20*^{I268F/I268F} mutants

To generate the *Krox20*^{I268F} allele, we first constructed a targeting construct carrying the I268F mutation and the neomycine resistance gene (Fig. 1A), which was introduced into ES cells by homologous recombination and then transferred into the mouse germ line to obtain the *Krox20*^{I268Fneo} allele. In the targeting construct the neo gene is flanked by two loxP sites and the *Krox20*^{I268F} allele was therefore obtained by crossing an heterozygous *Krox20*^{I268Fneo} males with PGK-Cre^m females (Lallemand et al., 1998). The *Krox*^{I268F} allele differs from the wild type only by the presence of the I268F mutation and of a residual loxP site located in the 3' flanking region (Fig. 1A). This latter modification is not likely to affect *Krox20* expression and therefore any phenotype attached to the *Krox20*^{I268F} allele should be the result of the change in the coding sequence. After verification of the presence of the I268F mutation in the founders of the line, the genotyping of the animals was performed on the basis of the presence or absence of the loxP site (Fig. 1B).

No obvious phenotype was observed in *Krox20*^{I268F} heterozygous animals, which were normally fertile (data not shown). Homozygous mutant mice were obtained at the expected mendelian ratios. However, they were usually smaller than wild type or heterozygous litter-mates, and from the second postnatal week started to loose weight (Fig. 1C and data not shown). The same period marked the appearance of obvious locomotion defects and at P15 all animals showed tremors during locomotion and abnormal hindlimbs positioning. At around P17, mutant mice showed severe difficulties in muscular coordination and in rising on their hindlimbs and sometimes on

their forelimbs (Supplementary video 1). These defects progressed to a paralysis of posterior and, subsequently, anterior limbs, leading to a complete loss of locomotion at three weeks (Fig. 1D and Supplementary video 2). The animals usually died at around that time. High frequency breathing was also observed, suggesting that the death might be linked to breathing or heart failure. The evolution of *Krox20*^{I268F/I268F} animals was very stereotyped: the progression of the phenotype varied only of few days from animal to animal and all of them died between P19 and P22. These data indicate that the I268F substitution leads to progressive and fatal paralysis at the homozygous state.

***Krox20*^{I268F/I268F} mice suffer from peripheral hypomyelination**

The phenotype of *Krox20*^{I268F/I268F} animals led us to investigate possible alterations of peripheral nerves. First we performed an analysis of brachial and sciatic nerves at P17, when locomotion is already strongly affected. Gross examination of these nerves revealed that they were abnormal in the homozygous mutant, where they appeared translucent and lacked the typical striated organization of myelinated nerves observed in wild type or heterozygous animals (Fig. 2A, B, E, F, I, J). Analysis of transverse semi-thin sections from sciatic nerves stained with toluidine blue (Fig. 2C, G, K), followed by examination of ultra-thin sections by electron microscopy (Fig. 2D, H, L) established the existence of a major alteration of the myelin sheath in homozygous mutant mice. The number of myelinated axons was diminished and more strikingly the thickness of the myelin sheath appeared to be systematically reduced. Hence large-diameter, totally amyelinated axons (Fig. 2L, M) were frequently found in homozygous mutant nerves, a feature that was never observed in wild type or heterozygous animals at this age (Fig. 2D, H). But no apparent axonopathy was

detected and the total number of axons was not affected. The amyelinated axons were associated with Schwann cells, suggesting these cells had established a one to one relationship with axons, a characteristic of the promyelinating stage of Schwann cell development. Myelin unfoldings were also frequently observed in homozygous mutant nerves (Fig. 2L, N, arrows), but no onion bulb structures. Finally occasional macrophages were also observed (Fig. 2O), suggesting the existence of an inflammatory reaction.

To quantify the modifications of the myelin sheath thickness in *Krox20*^{I268F/I268F} animals, we performed a morphometric analysis of the ultrastructural data, measuring the g-ratio (axon diameter over myelinated fibre total diameter). A mean value of the g-ratio of 0.79 was found for the homozygous mutants, in contrast to 0.62 for wild type animals, a very significant difference ($P < 0.005$). Consistently, an analysis of axonal distribution according to the g-ratio indicated a dramatic shift to higher values in mutant as compared to wild type animals, with in particular the presence in the mutants of more than 20% of axons with a g-ratio ranging from 0.9 to 1 and corresponding to a very strong to total loss of myelin (Fig. 2P). In conclusion, this analysis reveals that the I268F mutation results at P17 in a clear hypomyelination of the sciatic nerve, with both a decrease in the number of myelinated fibres and a reduction of myelin sheath thickness. This phenotype is likely to affect other peripheral nerves as suggested by the aspect of the brachial nerves and to be responsible for the observed locomotion defects.

To investigate whether the hypomyelination observed in the homozygous mutants was linked to a deficiency in myelin protein accumulation, we performed an immunostaining analysis of the distribution of the MBP and P0 proteins, two major

myelin components involved in its compaction and stabilization. Both MBP and P0 levels were strongly reduced in mutant sciatic nerves as compared to the wild type situation (Fig. 2Q, U, T, X). As expected from the ultrastructural analysis, immunostaining for neurofilaments, which labels axons, did not reveal significant differences in axonal density between homozygous mutant and wild type nerves (Fig. 2R,V). Finally, nuclei staining revealed a drastic increase in cell density in *Krox20*^{I268F/I268F} nerves (Fig. 2S, W). These are essentially Schwann cells as indicated by the ultrastructural analysis (data not shown). Therefore the hypomyelination of *Krox20*^{I268F/I268F} nerves is accompanied by a dramatic loss of major myelin proteins and a strong accumulation of Schwann cells.

The myelination defect in *Krox20*^{I268F/I268F} mice involves two distinct phases

To analyse the origin of the hypomyelination observed at P17, we performed an electron microscopy study of the sciatic nerve between P8 and P20. This revealed that at P8 in *Krox20*^{I268F/I268F} animals the axons are either amyelinated or covered with a very thin myelin sheath, as compared to the wild type situation where myelination is largely engaged and some sheaths have already reached mature size (Fig. 3A, E). At P14 the situation has only marginally improved in homozygous mutant animals, with a slight increase in the thickness of myelin sheaths, but still a large number of amyelinated fibres, whereas myelination is almost complete in wild type animals (Fig. 3B, F). Furthermore, unfoldings, as seen at P17, are observed in the mutants, as well as uncompacted fibres (Fig. 3I). Schwann cells nuclei appear voluminous, suggesting active synthesis (Fig. 3F). At P17 myelination in *Krox20*^{I268F/I268F} animals appears to have improved, with a higher proportion of myelinated axons and increased thickness

of the myelin sheaths (Fig. 3C, G). However, as discussed above, the mutant nerves are still hypomyelinated (Fig. 2, 3C, G) and appear infiltrated by macrophages (Fig. 2O). Finally, at P20, when myelination is completed in wild type animals, mutant mice show a degraded situation as compared to P17, with a significant reduction of the proportion of myelinated axons and observation of macrophages in the process of eliminating myelin debris (Fig. 3D, H, J).

In conclusion, this analysis of peripheral nerves during the postnatal period reveals that the myelination defect in *Krox20*^{I268F/I268F} mice involves two phases. In the first one, extending approximately from birth to P17, myelin appears to form, but at a reduced rate as compared to wild type animals, resulting in a delay in the formation of normal sheaths. In the second phase, extending from P17 to the death of the animals, at around P20, previously formed myelin is actively eliminated. An interpretation of these observations is that the I268F mutation results both in a reduced rate of myelin synthesis and in the generation of abnormal myelin, as indicated by the presence of unfoldings and uncompacted myelin. During the first phase, the reduced rate of synthesis results in a delay in the generation of the myelin sheath. Presence of abnormal myelin will progressively lead to the establishment of an inflammatory response that could result in the massive degradation of the myelin sheath observed during the second phase.

The myelination delay correlates with maintenance of Schwann cell proliferation

As indicated above, the myelination defect in mutant sciatic nerves is accompanied by a significant increase in the number of Schwann cells at P17. To investigate the origin of this accumulation, we analyzed possible variations in the rate

of cell proliferation or apoptosis in sciatic nerves of *Krox20*^{I268F/I268F} and wild type animals at different stages. The proportion of cells in S phase and therefore an estimate of the rate of cell proliferation was evaluated by bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation following a 2h pulse. At both P8 and P14, a 2-3 fold increase in the proportion of BrdU-positive cells was observed in mutant as compared to wild type animals (Fig. 4A-D, I). In contrast, no significant differences were found at P17 and P20 (Fig. 4I). The level of apoptosis was estimated by TUNEL labelling. No significant difference was observed between *Krox20*^{I268F/I268F} and wild type mice at any stage (Fig. 4E-H, J). Altogether these data suggest that the accumulation of Schwann cells observed at P17 in the homozygous mutants is due essentially to an increase in cell proliferation at earlier stages. It is interesting to note that there is a correlation between the defect in myelination at P8 and P14 and the increased cell proliferation. Consistently, when most Schwann cells have engaged into myelination at P17, they have also stopped proliferating. Apoptosis does not appear to be involved in regulating the number of Schwann cells, even during the period of active myelin degradation. This degradation process does not lead either to a reinitiation of cell proliferation.

Analysis of the *Krox20*^{I268F/I268F} molecular phenotype

Since *Krox20* is a transcription factor, the I268F mutation is expected to result in modifications in gene expression, which are responsible for the observed Schwann cell phenotype. To identify such molecular alterations, we used quantitative RT-PCR to compare the levels of mRNA corresponding to a subset of genes between *Krox20*^{I268F/I268F} and wild type animals. These genes were selected on the basis of their previous implication in myelination or Schwann cell development or reported

regulation during these processes. We performed the measurements both at P4, an early stage of the myelination process, and P20, when the myelin sheath is being degraded in the mutant, and the results are presented in Fig. 5. From these data the tested genes were classified into three groups. The first one corresponds to genes showing an at least two-fold higher expression in the mutant at both P4 and P20 or only at P20 (Fig. 5A), the second one to genes showing an at least two-fold reduced expression at P4 or P20 (Fig. 5B) and the third one to genes with more limited variations (Fig. 5C). It is striking to observe that the behaviour of the vast majority of the tested genes is consistent with the I268F mutation reducing the activity of the Krox20 protein. Hence, most of the genes belonging to the first group (overexpressed in the mutant) are associated to Schwann cell proliferation, as *c-Jun* (Parkinson et al., 2004) or correspond to markers of undifferentiated (CcnD1, FoxD3, Id2, Id4, Sox2) (Le et al., 2005a), pro-myelinating (SCIP/Oct6) (Zorick et al., 1996) or non-myelinating (Krox24) (Topilko et al., 1997) Schwann cells, that are normally down-regulated during myelination driven by Krox20. This is also the case at P4 for L1 CAM, a marker of immature and non-myelinating Schwann cells (Nieke and Schachner, 1985), but presents a non significant difference in the levels of expression is limited. The genes of the second group (repressed in the mutant) are either myelin markers (Mpz, Prx) (Gillespie et al., 1994; Wood and Engel, 1976), associated with the inhibition of c-Jun activity and of proliferation (Jip1) (Parkinson et al., 2004) or known to be down-regulated in a *Krox20* hypomorphic mutant (Igf2) (Le et al., 2005a). Therefore these genes are known or expected to be up-regulated by Krox20. In the case of MAG, a marker of ealy myelinating cells, the reduction in the mutant observed at P4 is not of significant extent. Finally, a reduced level of expression of another

myelin protein, MBP, was also observed in the mutant by Western blotting (Supplementary Fig. S1). Altogether these data suggest that the I268F mutation appears as a partial loss-of-function, reducing Krox20 potential both for gene activation and repression. This effect is even more striking when one takes into account that the mutation also results in an increase in the level of *Krox20* mRNA itself.

There are however two genes that do not comply with this interpretation. *Nab1* and *Nab2* are known to be up-regulated by Krox20 both in the developing hindbrain (Mechta-Grigoriou et al., 2000 ; Desmazieres et al, submitted) and in Schwann cells (Le et al., 2005b). Therefore it is surprising to find that they are over-expressed in *Krox20*^{I268F/I268F} animals, rather dramatically in the case of *Nab2* (12-fold increase). This latter observation was confirmed at the protein level by Western blotting analysis (Supplementary Fig. S1). This particular behaviour of *Nab* genes may relate to the fact that the I268F mutation has been shown to increase the capacity of Krox20 to activate *Nab* genes in the hindbrain (Desmazieres et al, submitted, see below).

In conclusion, the modifications in gene expression observed in *Krox20*^{I268F/I268F} animals are in line with the myelination defect and the prolongation of the period of cell proliferation, and consistent with a reduction of the activity of the Krox20 protein. However, the opposite behaviour of *Nab* genes suggest that the I268F mutation is not simply hypomorphic and that it may have different consequences on a large majority of downstream genes on one side and on a small minority on the other.

The I268F mutation affects cranial nerves organisation

Since *Krox20* plays an essential role in hindbrain patterning (Giudicelli et al., 2001; Schneider-Maunoury et al., 1998; Schneider-Maunoury et al., 1997; Schneider-Maunoury et al., 1993; Seitanidou et al., 1997; Voiculescu et al., 2001), we investigated the possibility that the I268F mutation might also affect this process. More specifically *Krox20* is necessary to the development of rhombomeres (r) 3 and 5 and we examined the extent and specification of these rhombomeres. In situ hybridisations were performed between 3 and 26 somite stage (ss) with probes for *Krox20*, *Nab1*, *Nab2* and *EphA4*, which are all expressed in r3 and r5, and for *Hoxb1*, which is expressed in r4 and in the posterior hindbrain and spinal cord. Along that period no difference was found between *Krox20*^{I268F/I268F} and wild type embryos in the positioning, size and extend of r3 and r5 (Fig. 6A-L). However minor modifications in the levels of expression were observed for *Krox20* and *Nab* genes, with a longer persistence of *Krox20* ventral expression (Fig. 6E, F) and a slight elevation in the level of *Nab1* mRNA in r3 and of *Nab2* mRNA in r5 (Fig. 6 G-J). This latter increase in *Nab* gene expression is consistent with the previously observed higher efficiency of *Krox20*^{I268F} in *Nab* gene activation upon electroporation in the chick embryo (Desmazieres et al, submitted). No changes were found in the cases of *EphA4* and *Hoxb1* (Fig. 6 K, L and data not shown). Altogether these data suggest that the I268F mutation does not seriously affects r3 and r5 formation and is therefore not likely to have further effects on hindbrain development.

Another phenotype associated with *Krox20* loss-of-function mutation is a modification of the organization of cranial nerves and ganglia, namely a fusion of trigeminal (Vth) and facial/acoustic (VIIth/VIIIth) ganglia and an abnormal proximity

of glossopharyngeal (IXth) and vagal (Xth) nerves (Le et al., 2005a ; Schneider-Maunoury et al., 1993). To investigate whether the I268F mutation might also affect the cranial nerve and ganglia pattern, we performed an immunostaining analysis at E10.5 with an antibody directed against neurofilaments (2H3) on wild type, heterozygous and homozygous mutants. While cranial nerves organization is not affected in heterozygous embryos (data not shown), it is altered in *Krox20*^{I268F/I268F} embryos, with a variable penetrance (Fig. 6P-R). The most common defect is a partial fusion of the IXth and Xth nerves (n=3/6, Fig. 6R), whereas a fusion of the Vth and VIIth/VIIIth ganglia is only occasionally observed (n=1/6, Fig. 6R). This observation of a phenotype similar to that of the loss-of-function mutation, but with an incomplete penetrance, is consistent with the interpretation of the I268F mutation having an hypomorphic effect in Schwann cells. In contrast, in the hindbrain this reduction of Krox20 activity is not sufficient to affect the formation of r3 ad r5.

MATERIAL & METHODS

Generation of mutant mice and genotyping

The *Krox20*^{I268FNeo} allele was obtained by modifying the construct previously used for *Krox20*^{fl_{oxneo}} allele (Taillebourg et al., 2002). To generate the *Krox*^{I268F} mice, we mated *Krox20*^{I268FNeo} males with PGK-Cre^m (Lallemand et al., 1998) females, thus deleting the neomycine gene flanked by loxP sites. Presence of the I268F mutation in the founders was verified by generating a PCR fragment using primers m1 (5'- TCC ACC ACT TCC ACC TCC TC -3') and m2 (5'- ACA ACC TTC TGC TGG GCA GG -3'), then sequenced using the following primer : 5' – CAC GGT GCT GCT GGC CCA - 3' . Genotyping was then performed using primers p1 (5'- GGG CTT GCA TTC TAC AGT GGT GGT C -3'), p2 (5'- AGT TGA CAG CCC GAG TCC AGT GG -3') and p3 (5'- TTG GCG CCT ACC GGT GGA TGT GG -3'). Recombinant DNA and animal manipulations were performed according to French and European Union regulations.

Electronic Microscopy

Sciatic nerves were fixed for 3h in 2,5% glutaraldehyde in Soerensen's buffer and osmificated for 1h in 2% OsO₄ (Polysciences). Nerves were rinsed in Soerensen's buffer, dehydrated in graded acetone, and embedded in Epon 812-Araldite. For light microscopy analysis, sections were stained with toluidine blue. Ultrathin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate and observed with a Philips CM10 electron microscope. g-ratio was calculated by division of the axonal diameter by total fiber diameter. Measurements of g-ratio were determined for approximately 150 axons with

at least a diameter of $1\mu\text{m}$ per mouse considered, using three mice for each genotype. Statistical significance was evaluated using the Student's test.

Immunohistochemistry

Nerves were collected, fixed in 4% paraformaldehyde for 2h, incubated overnight at 4°C in 20% sucrose, embedded in Tissue-Tek OCT compound (Gassalem, Limeil-Brévannes, France), and frozen in isopentane (-60°C). Sixteen-micromoter-thick longitudinal or transversal sections were collected using a Leica (Nussloch, Germany) cryotome. Sections were incubated for 30 min in 0.1M PBS containing 5% normal goat serum and 0,25% Triton X-100 and then overnight at 4°C with the following primary antibodies : a rat polyclonal anti-MBP antibody (1:100; Millipore), a mouse monoclonal P0 antibody (1: 5, mouse IgG hybroma, Yoshimura et al., 1996), a mouse monoclonal neurofilament 2H3 antibody (1:500, Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa city, IA). Sections were then incubated for 1h with appropriate fluophore-conjugated secondary antibody (Jackson ImmunoResearch, West grove, PA). For bromodeoxyuridine (BrdU) detection, sections were treated for 30 min at RT with 2N HCl in 0,1M PBS containing 0,25% Triton X-100, washed twice in 0,1M borate buffer, pH8,5, and incubated at 4°C with a rat anti-BrdU antibody (Oxford Biotech, Oxford, UK), which was subsequently revealed with a Cy3-labeled anti-rat antibody (Jackson). Nuclei were counterstained with Hoechst 33342. Sections were mounted in Aqua poly/Mount (Polysciences, Warrington, PA) and analyzed on Leica DMRD and TCS 4D confocal microscopes.

Cell proliferation and apoptosis assays

The rate of cell proliferation was estimated by BrdU incorporation. One intraperitoneal injection of BrdU (30mg/kg body weight, Sigma) was performed and the animals were killed 2h after the injection. Sciatic nerves were collected and processed for BrdU immunostaining, and nuclei were counterstained with bisbenzimidazole (Hoechst 33342; Sigma). The rate of apoptosis was estimated using TUNEL-staining kit (Apoptag Red in situ Apoptosis Detection kit, Chemicon International) according to the manufacturer's instructions. The number of BrdU-positive or TUNEL-positive nuclei and the total number of nuclei were counted (around 1500 nuclei for each condition). Results shown are the averages $\pm$ sd from two to three animals for each time point. Statistical significance was evaluated using the Student's test.

qRT-PCR

500ng of total RNA isolated from mouse sciatic nerves were used to generate cDNA. Relative genes expression was measured by quantitative RT-PCR with Cyclophilin, pPox and Tubulin normalization of samples in triplicate using QuantiTect SYBR-Green (Qiagen) kit on a Lightcycler (Roche) detector, the experience being reiterated independently two times. Primer sequences are available upon request.

Western Blotting analysis

Sciatic nerves were homogenized in lysis buffer (50mM Tris, pH 7.5, 150mM NaCl, 5mM EDTA, 1% Triton X-100, 1% SDS) with brief sonication on ice. Protein levels were quantified using the Bio-Rad (Hercules, CA) protein assay with BSA as a

standard. Equal amounts of proteins (10-20 μ g) were fractioned by eletrophoresis on a 10% SDS-polyacrylamide gel and electroblotted onto Hybond-C nitrocellulose membranes (Amersham Biosciences, Orsay, France). Blots were blocked in Tris-buffered saline containing 0,1% Tween (TBS-T) and supplemented with 5% milk powder, subsequently incubated overnight at 4° C in this buffer with primary antibodies : Krox20 antibody (1: 1000; Covance, Berkeley, CA), Nab1 antibody (gift from S. Engelhardt), Nab2 antibody (Santa-Cruz Biotechnology), MBP antibody (1:1000; Millipore). Blots were finally exposed to an anti-rabbit or an anti-mouse secondary antibody conjugated with HRP (Amersham Biosciences and Sigma, respectively) in TBS-T for 2h at room temperature. Blots were developed using the ECL reagents (Amersham Biosciences) according to the manufacturer's instructions.

Whole-mount in situ hybridization and immunochemistry

Postimplantation mouse embryos were recovered at the appropriate stage (8-9.5 day post-coïtum, dpc), fixed overnight at 4°C in PBS containing 4% paraformaldehyde and progressively dehydrated in methanol and processed for whole-mount *in situ* hybridization as described (Seitanidou et al., 1997). The digoxigenin probes were as follow : *Nab1* and *Nab2* (Mechta-Grigoriou et al., 2000), *Krox20* (Wilkinson et al., 1989), *EphA4* (Gilardi-Hebenstreit et al., 1992). Flat-mounted neural tubes of stained embryos were photographed using Leica DMRD microscope.

Neurofilament immunochemistry on whole-mount 10.5 dpc embryos was performed as previously described (Helmbacher et al., 2000). Embryos were then photographed using Nikon SMZ1500 system.

REFERENCES

- Gilardi-Hebenstreit, P., Nieto, M.A., Frain, M., Mattei, M.G., Chestier, A., Wilkinson, D.G. and Charnay, P.** (1992) An Eph-related receptor protein tyrosine kinase gene segmentally expressed in the developing mouse hindbrain. *Oncogene* 7, 2499-506.
- Gillespie, C.S., Sherman, D.L., Blair, G.E. and Brophy, P.J.** (1994) Periaxin, a novel protein of myelinating Schwann cells with a possible role in axonal ensheathment. *Neuron* 12, 497-508.
- Giudicelli, F., Taillebourg, E., Charnay, P. and Gilardi-Hebenstreit, P.** (2001) Krox-20 patterns the hindbrain through both cell-autonomous and non cell-autonomous mechanisms. *Genes Dev* 15, 567-80.
- Helmbacher, F., Schneider-Maunoury, S., Topilko, P., Tiret, L. and Charnay, P.** (2000) Targeting of the EphA4 tyrosine kinase receptor affects dorsal/ventral pathfinding of limb motor axons. *Development* 127, 3313-24.
- Lallemand, Y., Luria, V., Haffner-Krausz, R. and Lonai, P.** (1998) Maternally expressed PGK-Cre transgene as a tool for early and uniform activation of the Cre site-specific recombinase. *Transgenic Res* 7, 105-12.
- Le, N., Nagarajan, R., Wang, J.Y., Araki, T., Schmidt, R.E. and Milbrandt, J.** (2005a) Analysis of congenital hypomyelinating *Egr2*^{Lo/Lo} nerves identifies *Sox2* as an inhibitor of Schwann cell differentiation and myelination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 2596-601.
- Le, N., Nagarajan, R., Wang, J.Y., Svaren, J., LaPash, C., Araki, T., Schmidt, R.E. and Milbrandt, J.** (2005b) Nab proteins are essential for peripheral nervous system myelination. *Nat Neurosci* 8, 932-40.
- Mechta-Grigoriou, F., Garel, S. and Charnay, P.** (2000) Nab proteins mediate a negative feedback loop controlling Krox-20 activity in the developing hindbrain. *Development* 127, 119-28.
- Nieke, J. and Schachner, M.** (1985) Expression of the neural cell adhesion molecules L1 and N-CAM and their common carbohydrate epitope L2/HNK-1 during development and after transection of the mouse sciatic nerve. *Differentiation* 30, 141-51.
- Parkinson, D.B., Bhaskaran, A., Droggiti, A., Dickinson, S., D'Antonio, M., Mirsky, R. and Jessen, K.R.** (2004) Krox-20 inhibits Jun-NH2-terminal kinase/c-Jun to control Schwann cell proliferation and death. *J Cell Biol* 164, 385-94.

- Schneider-Maunoury, S., Gilardi-Hebenstreit, P. and Charnay, P.** (1998) How to build a vertebrate hindbrain. Lessons from genetics. *C R Acad Sci III* 321, 819-34.
- Schneider-Maunoury, S., Seitanidou, T., Charnay, P. and Lumsden, A.** (1997) Segmental and neuronal architecture of the hindbrain of Krox-20 mouse mutants. *Development* 124, 1215-26.
- Schneider-Maunoury, S., Topilko, P., Seitanidou, T., Levi, G., Cohen-Tannoudji, M., Pournin, S., Babinet, C. and Charnay, P.** (1993) Disruption of Krox-20 results in alteration of rhombomeres 3 and 5 in the developing hindbrain. *Cell* 75, 1199-214.
- Seitanidou, T., Schneider-Maunoury, S., Desmarquet, C., Wilkinson, D.G. and Charnay, P.** (1997) Krox-20 is a key regulator of rhombomere-specific gene expression in the developing hindbrain. *Mech Dev* 65, 31-42.
- Taillebourg, E., Buart, S. and Charnay, P.** (2002) Conditional, floxed allele of the Krox20 gene. *Genesis* 32, 112-3.
- Topilko, P., Levi, G., Merlo, G., Mantero, S., Desmarquet, C., Mancardi, G. and Charnay, P.** (1997) Differential regulation of the zinc finger genes Krox-20 and Krox-24 (Egr-1) suggests antagonistic roles in Schwann cells. *J Neurosci Res* 50, 702-12.
- Voiculescu, O., Taillebourg, E., Pujades, C., Kress, C., Buart, S., Charnay, P. and Schneider-Maunoury, S.** (2001) Hindbrain patterning: Krox20 couples segmentation and specification of regional identity. *Development* 128, 4967-78.
- Wilkinson, D.G., Bhatt, S., Chavrier, P., Bravo, R. and Charnay, P.** (1989) Segment-specific expression of a zinc-finger gene in the developing nervous system of the mouse. *Nature* 337, 461-4.
- Wood, J.G. and Engel, E.L.** (1976) Peripheral nerve glycoproteins and myelin fine structure during development of rat sciatic nerve. *J Neurocytol* 5, 605-15.
- Yoshimura, K., Negishi, T., Kaneko, A., Sakamoto, Y., Kitamura, K., Hosokawa, T., Hamaguchi, K. and Nomura, M.** (1996) Monoclonal antibodies specific to the integral membrane protein P0 of bovine peripheral nerve myelin. *Neurosci Res* 25, 41-9.
- Zorick, T.S., Syroid, D.E., Arroyo, E., Scherer, S.S. and Lemke, G.** (1996) The transcription factors SCIP and Krox-20 mark distinct stages and cell fates in Schwann cell differentiation. *Mol Cell Neurosci* 8, 129-45.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Generation of the *Krox20*^{I268F} allele. (A) Schematic representation of the different *Krox20* alleles, including the wild-type gene, the targeting construct, and the intermediate (*Krox20*^{I268Fneo}) and final (*Krox20*^{I268F}) alleles carrying the I268F point mutation. The point mutation is indicated by an asterisk and the loxP sites are symbolized by black arrowheads. Arrows indicate the positions of the different primers used for PCR amplification. The sizes of the amplified fragments used for genotyping are indicated underneath. (B) PCR analysis of animals issued from crosses between *Krox20*^{I268Fneo/+} or *Krox20*^{I268F/+} animals. Wild-type (+/+), heterozygous (+/I268Fneo or +/I268F) and homozygous (I268Fneo/I268Fneo or I268F/I268F) mutant cases are shown. (C) Photographs of wild-type (white arrowhead) and mutant (black arrowhead) littermates at P15. The mutant is smaller and shows tremors and weakness of the hindlimbs. (D) At P20, the same mutant has developed a paralysis of both anterior and posterior limbs and is affected by breathing problems. Ba, BamHI ; Bg, BglII ; RI, EcoRI ; S, SpeI ; S1, SfiI.

Figure 2: *Krox20*^{I268F/I268F} mice show a peripheral hypomyelination at P17. Gross examination of brachial (A,E,I) and sciatic nerves (B,F,J) indicates that the homozygous mutant nerves are translucent and show an abnormal organization. Observations of toluidin blue-stained semi-thin sections (C,G,K) and electron microscopy analysis of ultra-thin sections (D,H,L) of sciatic nerves show that the myelin from heterozygous mice is similar to the wild type whereas it is altered in homozygous mutant mice. (M,N,O) Higher magnifications indicate the presence of

totally amyelinated fibers (asterisks in M), of myelinated fibers with an abnormally thin sheath and of unfoldings (arrows) in the mutant mice. Macrophages (arrowhead in O), that could be implicated in the degradation of abnormal myelin sheath, are also observed. (P) The g-ratio (axon diameter/total myelinated fiber diameter) is higher in mutant as compared to wild-type mice at P17 (statistical significance was analyzed using the Student's *t* test : * $p < 0.05$, ** $p < 0.025$, *** $p < 0.005$). The mean g-ratio in the wild-type is of 0.62 versus 0.79 in the mutant ($p < 0.005$). (Q-X) Analysis of transverse sciatic nerve sections by immunostaining. P0 and MBP expression is strongly decreased in the mutant (U,V) as compared to the wild-type (Q,R). Staining for the axonal marker NF200 indicates that axonal density is not affected in the mutant (S,W), whereas Hoechst 33342 staining shows that there is an increase in Schwann cell number (T,X). In the inset (T,X) co-immunostaining with MBP, NF200 and Hoechst 33342 confirms that MBP is localised around the axons. Scale bars : A, B, E, F, I, J : 1mm, C, G, K : 25 μ m, D, H, L : 5 μ m, M, N : 1 μ m, O : 0,5 μ m, Q-X : 50 μ m, T, X (zoom) : 20 μ m.

Figure 3: Time-course of myelination reveals a biphasic defect in the mutant. (A-J) Electron micrographs of sciatic nerve transverse sections between P8 and P20. At P8 and P14, the mutant nerves are hypomyelinated as compared to the wild-type, with amyelinated fibers and thinner myelin sheaths (A,B,E,F). At P17, myelination in mutant mice has improved, but the nerves are still hypomyelinated (C,G). At P20, when myelination is completed in wild-type animals, mutant mice show a degraded situation as compared to P17 (D,H). Higher magnifications of homozygous mutant nerves reveal uncompacted forming sheath at P14 (I) and the presence of macrophages

at P20, suggesting that degradation of the myelin is an active process (J). Scale bars : A-H : 2,5µm, I, J : 0,5µm.

Figure 4: Persistence of Schwann cell proliferation in *Krox20*^{I268F/I268F} mutant mice. (A-D) Rate of cell proliferation was estimated by BrdU incorporation as revealed by immunostaining 2 hr after intraperitoneal injection. The micrographs show BrdU staining alone (A,C) or combined with nuclei counterstaining using Hoechst 33342 (B,D) on sciatic nerve sections from wild-type (+/+) or mutant (I268F/I268F) mice at P14. (E-H) Apoptosis was estimated using TUNEL staining. The micrographs show TUNEL staining alone (E,G) or combined with nuclei counterstaining using Hoechst 33342 (F,H) on sciatic nerve sections from wild-type (+/+) or mutant (I268F/I268F) mice at P20. (I,J) Representation of the percentage of BrdU- (I) or TUNEL-positive (J) nuclei at different stages. There is an increase in the rate of proliferation in mutant mice as compared to wild-type animals at P8 and P14, whereas no significant difference in apoptosis was observed at any stage. Histogram data are given as mean ± s.e.m. Statistical significance was determined using the Student's *t* test : * *p*<0.05, ***p*<0.01. Scale bar : 25µm.

Figure 5: The myelination defect correlates with abnormal levels of expression of several genes involved in Schwann cell differentiation or proliferation. The mRNA levels were determined by RT-PCR analysis on samples of sciatic nerves at P4 and P20. The data are presented as the fold increase or decrease in mRNA level in homozygous mutant as compared to wild-type animals. (A) The expression of a first subset of genes is increased in mutant as compared to wild-type animals. The ratios

superior to the threshold of two-fold (indicated by the upper red line) were considered as significant. (B) For a second subset of genes the expression is decreased in mutant compared to wild-type animals. The ratios superior to the threshold of two-fold (indicated by the lower red line) were considered as significant. (C) A last subset of genes showed only limited variations in expression that were not considered as significant.

Figure 6: The I268F mutation slightly affects hindbrain patterning and cranial nerve organisation. (A-F) Time-course analysis of *Krox20* expression as estimated by *in situ* hybridisation. The only difference between *Krox20*^{I268F/I268F} (B,D,F) and wild type (A,C,E) embryos consists in a slight delay in the extinction of *Krox20* expression in ventral r3 and r5 (arrows in F). (G-J) Analysis of *Nab1* and *Nab2* expression by *in situ* hybridization. Normalisation of the signal with *Fgf8* probe suggests that *Nab1* and *Nab2* expression levels are reinforced in homozygous mutant (H,J) as compared to wild-type (G,I) embryos. (K,L) Analysis of *EphA4* expression by *in situ* hybridization shows no modification in the mutant (M-O) Cranial nerve organisation was analyzed by neurofilament immunolabelling performed at E10.5 on whole mount embryos. Homozygous mutant embryos (N,O) show cranial nerve abnormalities : partial (n=2/6) or total (n=3/6) fusion of the glossopharyngeal (IX) and vague (X) ganglia and, more rarely (n=1/6), of the vestibulo-acoustic (VII/VIII) and trigeminal (V) ganglia (white arrows). ss, somite stage. pr3, pre-rhombomere 3. r, rhombomere. mhb, mid-hindbrain junction.

Figure S1 : Protein levels in mutant and wild-type sciatic nerves. The levels were estimated by Western blotting performed at P4 and P20. The analysis indicates increased levels of Krox20 and Nab proteins and a dramatic reduction in the amount of the myelin marker MBP in the mutant as compared to the wild type mice.

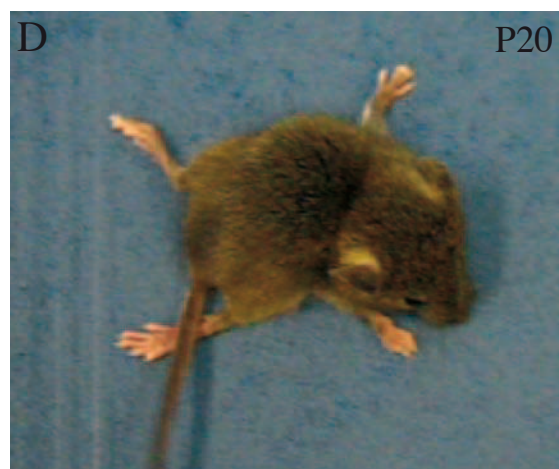
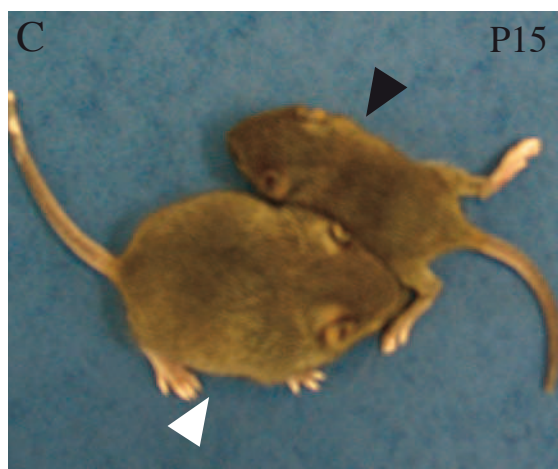
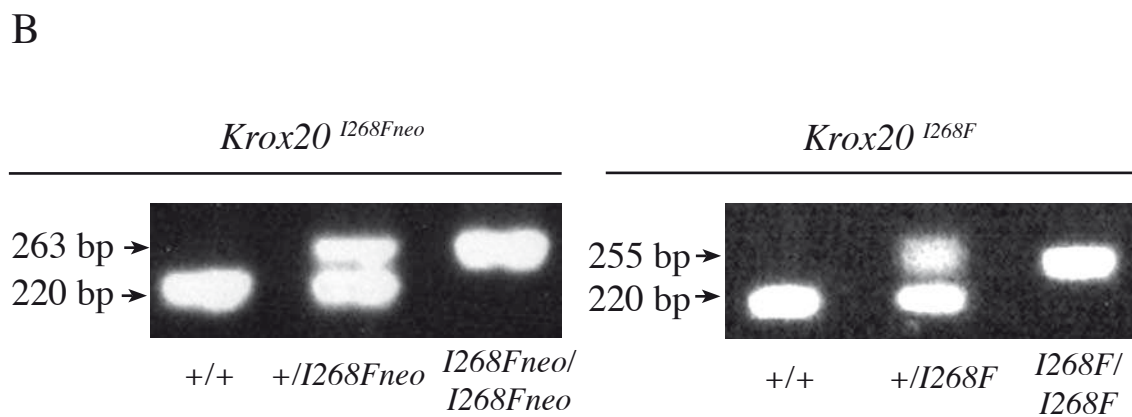
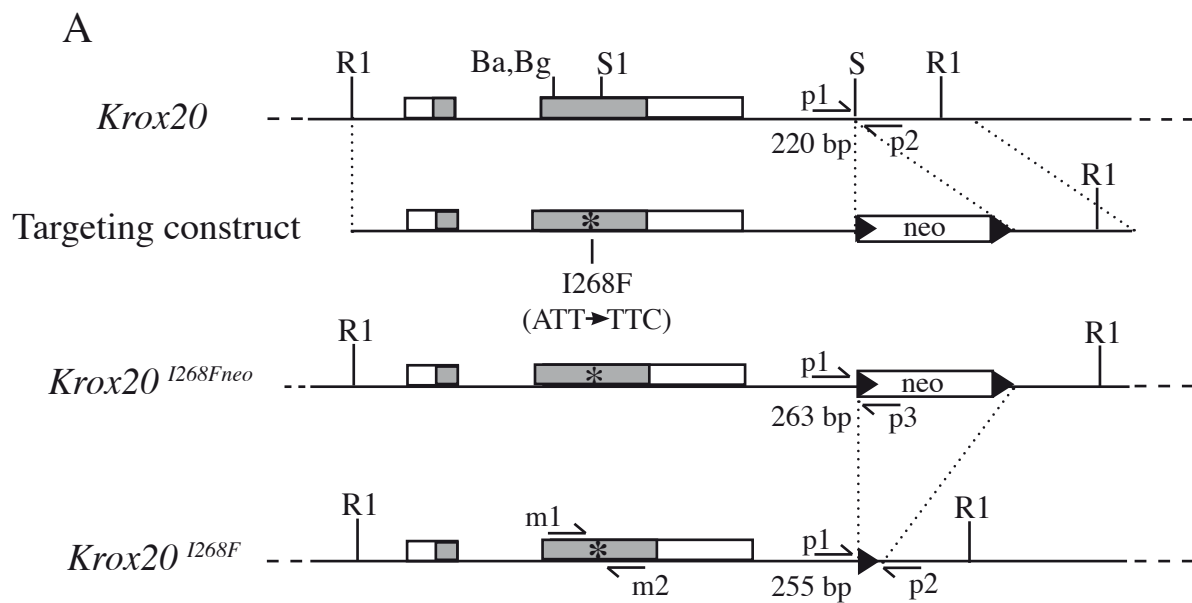


Figure 1

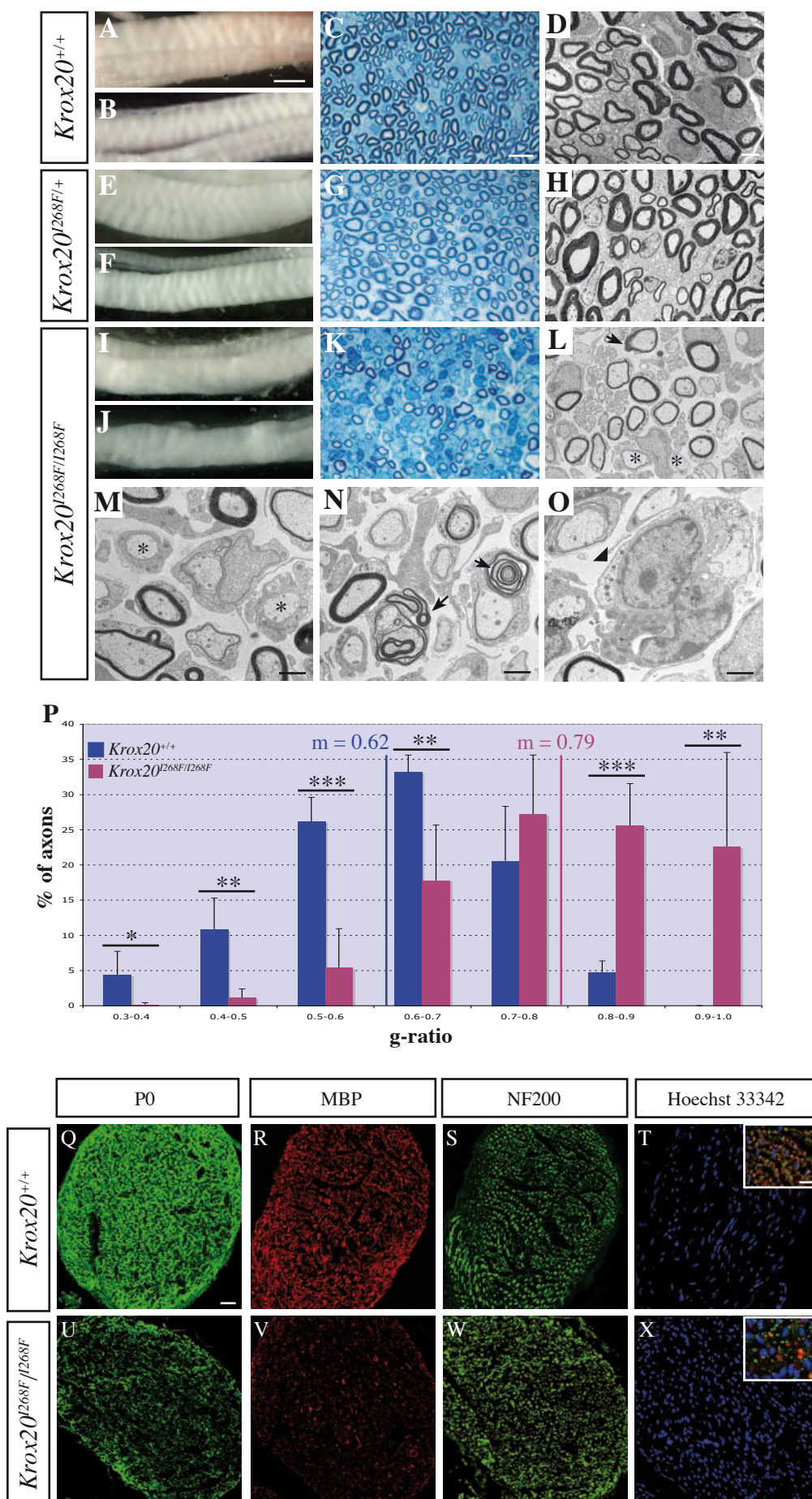


Figure 2

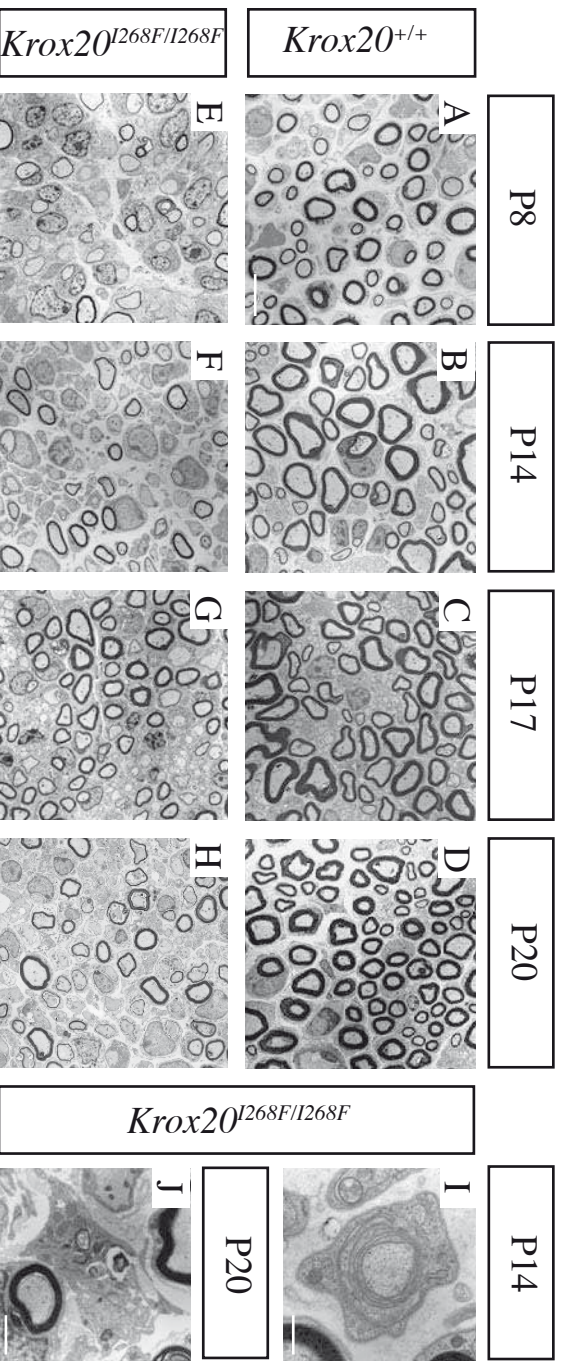


Figure 3

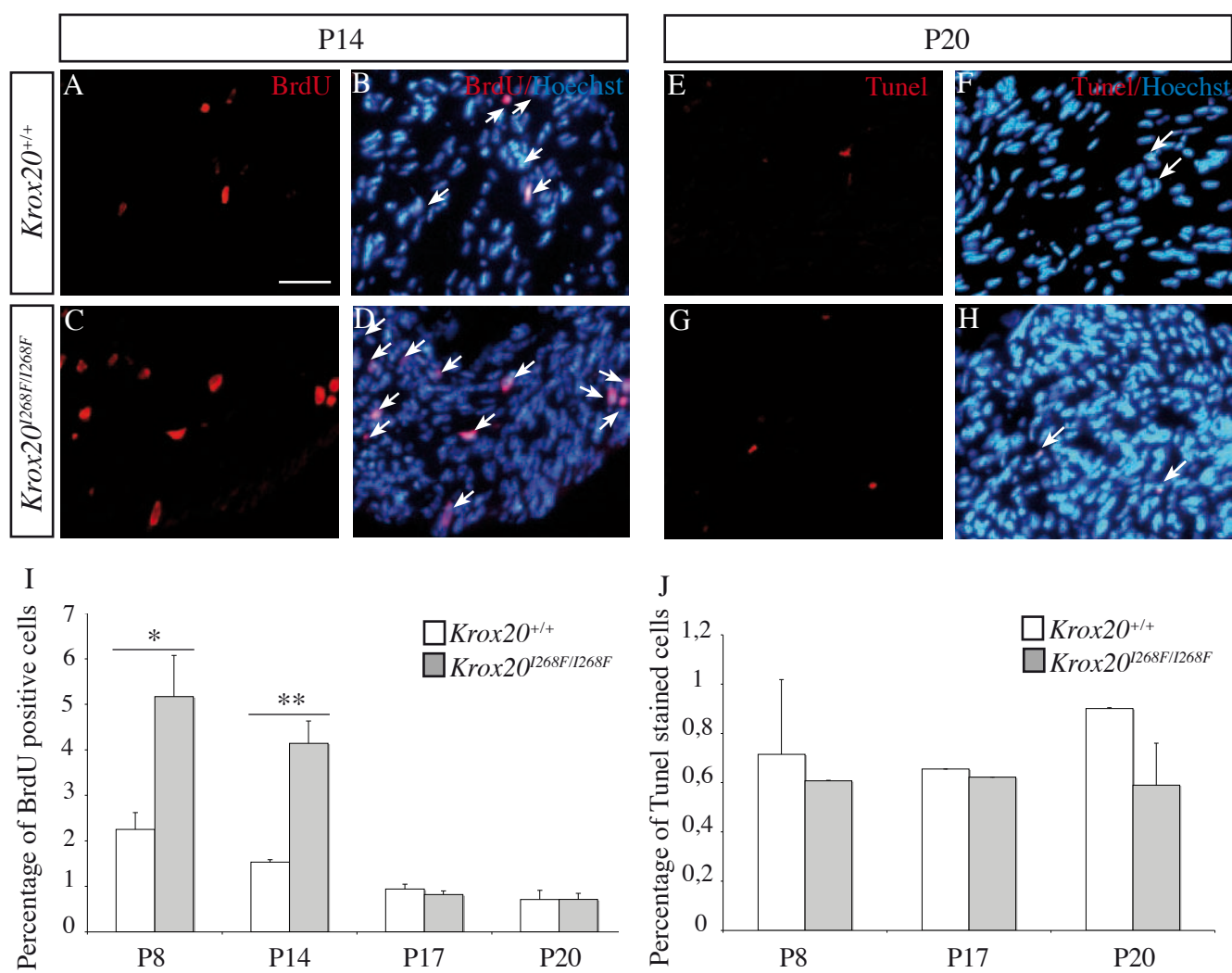


Figure 4

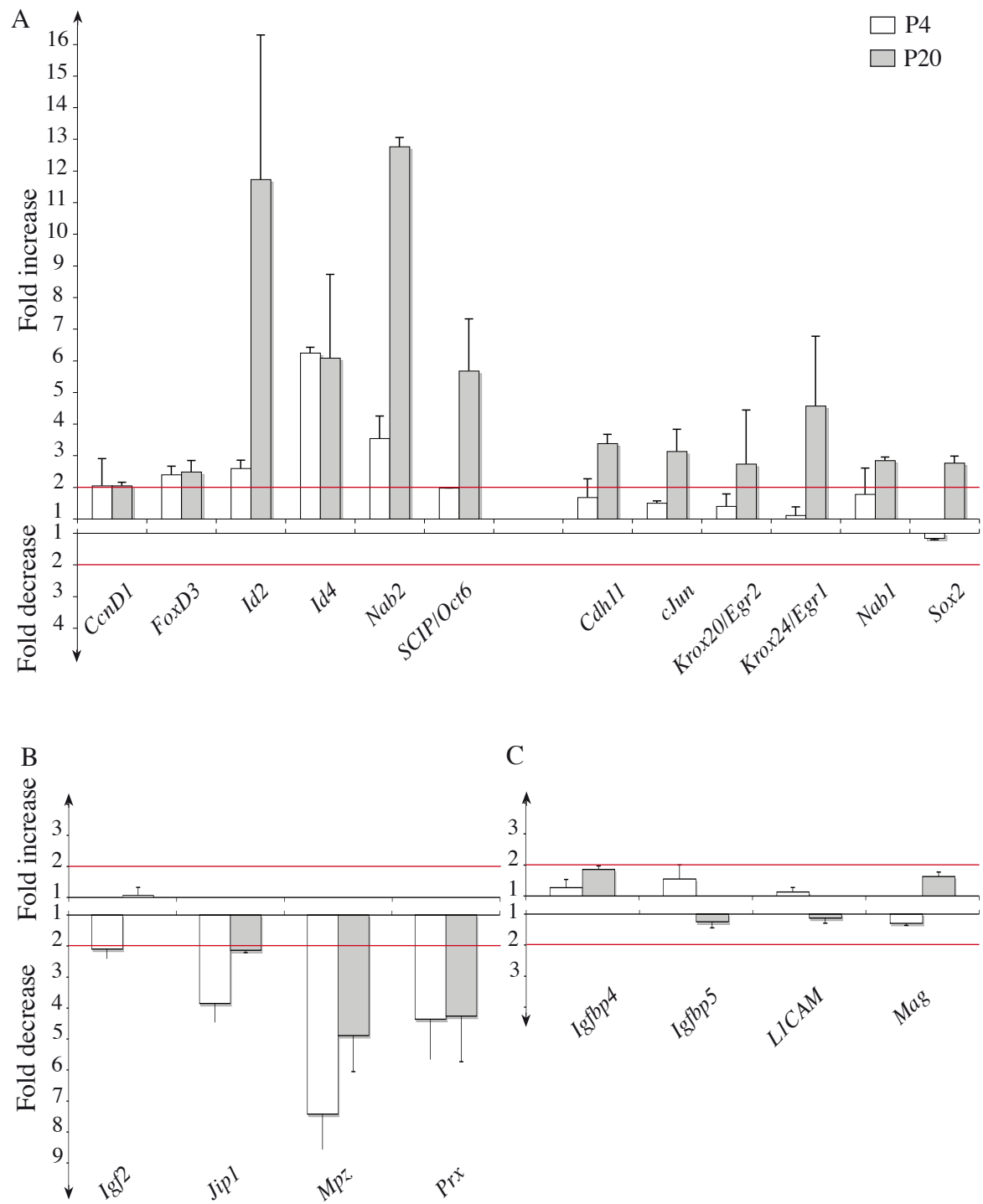


Figure 5

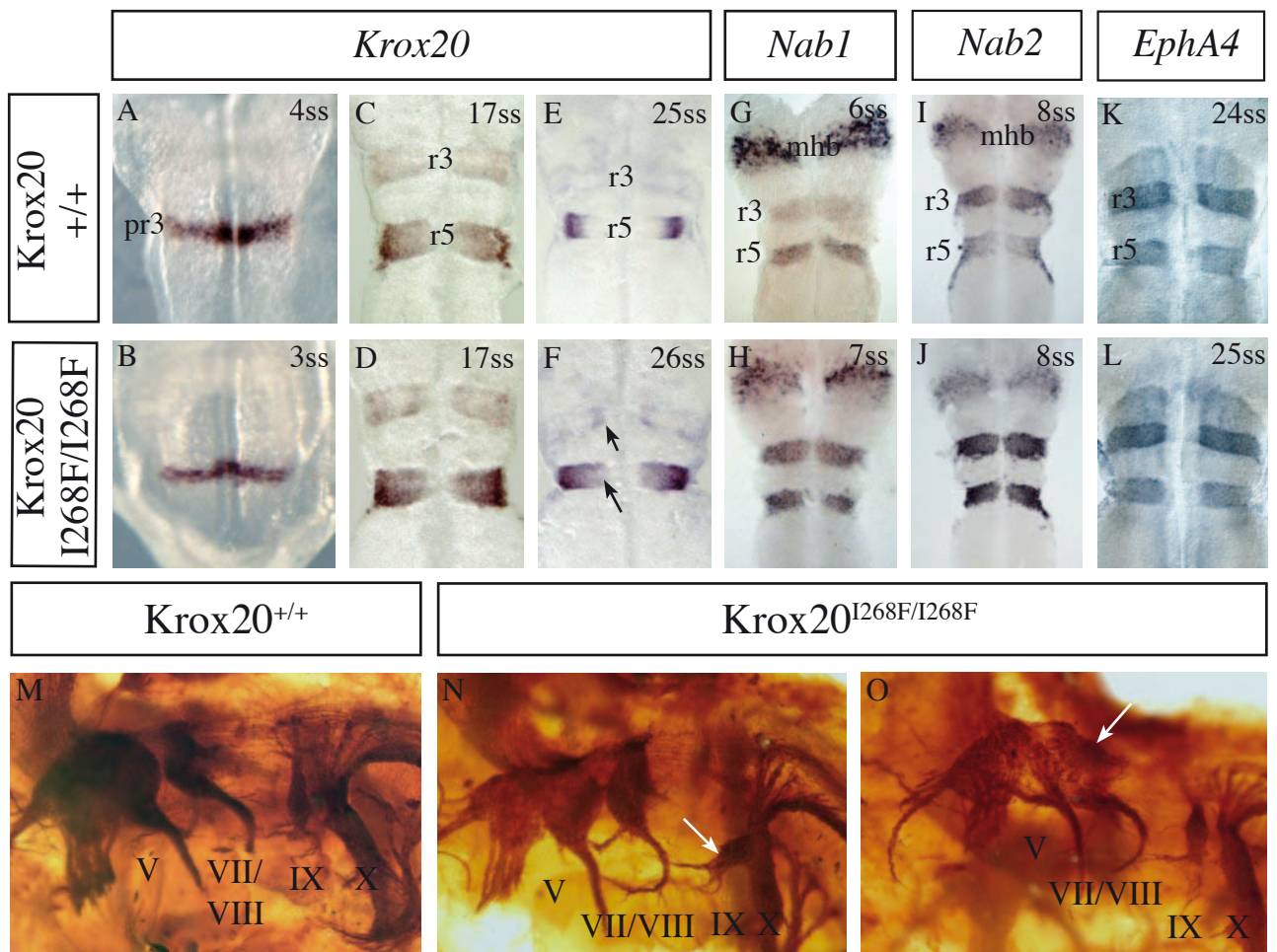


Figure 6

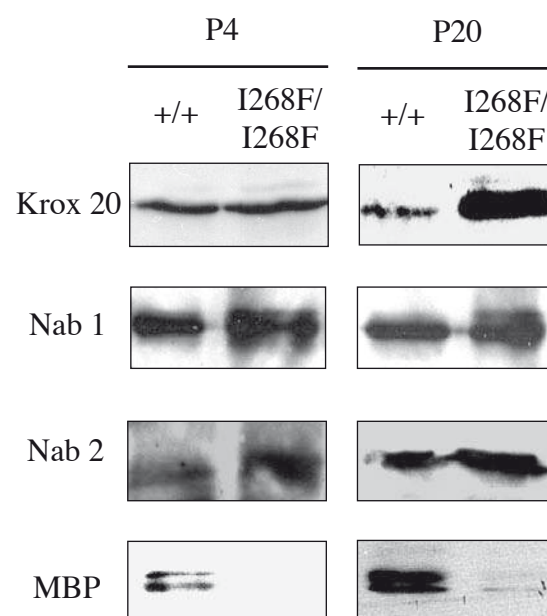


Figure S1

DISCUSSION

Afin de mieux caractériser l'activité de Krox20 lors du développement du système nerveux et la régulation de cette activité par divers cofacteurs, j'ai développé deux projets au cours de ma thèse. Le premier a permis de mieux comprendre le mode d'action de ce facteur transcription, par la caractérisation de différents domaines protéiques impliqués dans la régulation transcriptionnelle de ses diverses cibles. Cette étude a également permis d'établir un rôle *in vivo* pour l'interaction entre Krox20 et HCF-1 et a renforcé l'hypothèse d'un rôle de régulateur négatif de l'activité de Krox20 pour les facteurs Nab durant le processus de segmentation du rhombencéphale. Afin de mieux caractériser le rôle physiologique de l'interaction entre Krox20 et ses cofacteurs Nab lors de la formation du système nerveux central et périphérique, mon second projet de thèse a consisté en l'élaboration d'une lignée de souris portant la mutation ponctuelle I268F intégrée par recombinaison homologue au niveau du locus *Krox20*. Cette mutation, induisant une perte d'interaction entre Krox20 et les Nab, conduit en effet à une suractivité de la protéine Krox20 au niveau du rhombencéphale (article 1) et est également associée à une pathologie du système nerveux périphérique chez l'homme.

Les résultats obtenus quant aux modes d'activité de Krox20 dans le processus de segmentation du rhombencéphale et à la régulation de cette activité par ses différents cofacteurs sont discutés dans un premier temps. La seconde partie de cette discussion concerne plus particulièrement les altérations observées au niveau du système nerveux périphérique du modèle murin généré. La dernière partie aborde de façon plus globale le rôle des facteurs Nab dans la régulation de l'activité de Krox20 et des Egr en général.

1. Rôles et régulations de l'activité de Krox20 au cours de la segmentation du rhombencéphale

Dans le cadre de mon premier projet de thèse, l'utilisation de la technique d'électroporation nous a offert la possibilité de mener une étude dans un contexte *in vivo*, par surexpression de Krox20 dans le rhombencéphale au niveau de son territoire d'expression endogène, mais également de façon ectopique au niveau des territoires adjacents où il n'est normalement pas exprimé. Cette approche a permis d'étudier l'impact de l'expression de *Krox20* sur les gènes endogènes connus pour être ses cibles transcriptionnelles. Nous avons ainsi pu réaliser une étude structure-fonction de la protéine Krox20 en étudiant au niveau du rhombencéphale d'embryons de poulet l'activité de différentes versions de ce facteur de transcription contenant des délétions ou des mutations ponctuelles (article 1).

Cependant, l'approche par électroporation comporte également des limitations. Premièrement, il est difficile de réaliser une électroporation de la plaque neurale avant le stade HH8 (0-4somites), le tube neural étant ouvert et la solution injectée ayant tendance à diffuser,

mais également en raison d'un taux de survie moindre des embryons électroporés. Cette approche est donc difficilement utilisable pour l'étude des événements très précoces de la segmentation. La mise au point d'une autre technique pourrait s'avérer utile, une possibilité pouvant être l'application au niveau de la plaque neurale d'une solution contenant la protéine d'intérêt fusionnée à un peptide transducteur, tels les CPPs (cell-permeable peptides) ou PTDs (protein transduction domains) (pour revue, voir Joliot and Prochiantz, 2004), permettant ainsi l'entrée du facteur étudié dans les cellules du neuroépithélium à des temps précoces. La seconde limitation de la technique d'électroporation est qu'elle correspond à une approche par surexpression. Le facteur étudié est donc induit à des taux supérieurs au taux physiologique et se surimpose éventuellement à une expression endogène, ce qui peut perturber les réseaux dans lesquels il est impliqué. La technique d'électroporation reste cependant une approche intéressante en ce qu'elle permet de réaliser l'étude de l'effet de différentes constructions *in vivo* de façon rapide, les approches par transgénèse ou recombinaison homologue chez la souris étant beaucoup plus lourdes et donc difficilement applicables au type d'étude que nous avons réalisé. L'approche par électroporation est également un bon outil pour réaliser des études préalables à la réalisation de modèles murins.

1.1. Modèle proposé pour l'initiation de l'expression de *Krox20* dans le rhombencéphale

Chez l'embryon de souris, l'expression de l'ARNm de *Krox20* apparaît au stade 0-1 somite en une fine bande au niveau du futur rhombomère r3, celle-ci s'élargissant ensuite jusqu'au stade 4-5s. A cette étape du développement, une seconde bande apparaît au niveau du futur rhombomère r5 et s'élargit par la suite pour finalement atteindre une taille comparable à celle de r3. Chez le poulet, l'apparition de l'expression de *Krox20* est similaire, bien que plus tardive, l'expression au niveau de la frontière r3/r4 apparaissant au stade 5 somites et l'expansion s'arrêtant vers 7/8 somites, moment où apparaît l'expression dans le futur r5, dont l'expansion s'arrête vers 9 somites (Giudicelli et al., 2001). Comme cela a été évoqué dans l'introduction, trois éléments régulateurs de l'expression de *Krox20* au niveau du rhombencéphale ont été caractérisés à ce jour (I.3.3.2, Chomette et al., 2006). L'expression du gène rapporteur *LacZ* placé sous le contrôle de l'élément régulateur C apparaît dans r3 dès le stade 2 somites chez l'embryon de souris et s'étend à r5 au stade 6 somites, reproduisant la dynamique observée lors de l'initiation de *Krox20*. Ceci suggère que l'initiation de *Krox20* dans les futurs rhombomères r3 et r5 serait liée à cette séquence régulatrice. L'élément C contenant des sites de liaison des facteurs Meis et Hox/Pbx, son induction reposerait en partie sur l'activité des membres de ces familles de facteurs de transcription présents à ce stade au niveau du rhombencéphale. La séquence régulatrice B, activée par les facteurs vHNF1, MafB

et les signaux FGF pourrait également jouer un rôle dans l'initiation de *Krox20* au niveau de r5 (Chomette et al., 2006; Chomette et al, soumis, M.Wassef, communication personnelle). L'activation de l'élément autorégulateur A par *Krox20* permet ensuite une stabilisation et amplification de l'expression de ce facteur au niveau des cellules où son expression a été initiée.

Une expression ectopique du gène *Krox20* endogène est observée après électroporation chez l'embryon de poulet de constructions codant diverses formes du facteur de transcription *Krox20*. Cette induction repose vraisemblablement dans un premier temps sur la liaison directe de la protéine *Krox20* surexprimée au niveau de l'élément A, court-circuitant la phase d'initiation normalement prise en charge par les éléments B et C au sein des cellules électroporées. Dans un second temps, des cellules voisines non électroporées peuvent également se mettre à exprimer le gène *Krox20* endogène par recrutement non cellulaire autonome, comme cela a précédemment été décrit (I.3.3.3).

Une protéine *Krox20* mutée, ne pouvant plus interagir avec HCF-1, ne peut pas induire l'expression endogène du gène *Krox20*. De plus, *HCF-1* est exprimé au niveau du rhombencéphale au stade où l'expression de *Krox20* est activée. Ceci suggère que ce co-facteur pourrait jouer un rôle déterminant lors de l'amplification et la stabilisation de l'expression du gène *Krox20* après son initiation au niveau du rhombencéphale. La régulation autonome de *Krox20* est en effet nécessaire au maintien de son expression au niveau des territoires r3 et r5. La perte de cette expression induit en effet la re-spécification des territoires impairs en territoires pairs et perturbe donc fortement le processus de segmentation, comme cela a été montré par des études de lignage cellulaire (Voiculescu et al., 2001). Il pourrait donc être intéressant de réaliser des études de perte de fonction d'HCF, par expression de siRNA ou de dominant-négatif de ce facteur en utilisant la technique d'électroporation chez l'embryon de poulet. Une autre approche serait de générer par knock-in une lignée de souris portant un allèle de *Krox20* codant une protéine mutée au niveau de ses sites d'interaction avec HCF-1.

En revanche, la protéine *Krox20*^{I268F}, n'interagissant plus avec les facteurs Nab, induit fortement le gène *Krox20* endogène après électroporation chez l'embryon de poulet. Nous n'avons de plus observé aucune altération du processus d'initiation de l'expression de *Krox20* chez les embryons de souris *Krox20*^{I268F/I268F}. L'interaction entre *Krox20* et les Nab n'est donc pas nécessaire au mécanisme d'initiation de l'expression de *Krox20* ni à sa stabilisation.

Afin d'affiner ces résultats, il pourrait être intéressant de vérifier par co-électroporation chez l'embryon de poulet l'effet des protéines *Krox20* mutées pour l'interaction avec HCF-1 et les Nab sur l'activité des différents éléments régulateurs caractérisés pour l'expression de *Krox20* au niveau du rhombencéphale. On pourrait également tester par transgénèse l'activité de ces éléments chez des embryons *Krox20*^{I268F/I268F} à divers stades de développement. Par

ailleurs, un des projets envisagés au laboratoire est la génération de lignées de souris portant chacune la délétion d'un des éléments régulateurs caractérisés, afin de mieux comprendre leur rôle spécifique .

1.2. Intervention potentielle des cofacteurs de Krox20 dans la mise en place des territoires r3 et r5

Si le mécanisme de démarrage de l'expression de *Krox20* au niveau des futurs rhombomères r3 et r5 a été en partie décrit, il existe à l'heure actuelle peu de données sur les processus moléculaires permettant l'expansion de son domaine d'expression et assurant l'établissement des territoires r3 et r5 au niveau du rhombencéphale. Cette expansion se fait non seulement par prolifération cellulaire, mais probablement surtout par le recrutement de cellules possédant une identité paire par défaut et jouxtant le domaine d'expression de *Krox20*. L'induction de *Krox20* dans ces cellules peut notamment reposer sur le mécanisme d'activation non cellulaire autonome caractérisé lors de la surexpression de *Krox20* au niveau du tube neural d'embryon de poulet (Giudicelli et al., 2001). Cette hypothèse est par ailleurs soutenue par le fait que, chez les embryons de souris *Krox20*^{-/-}, la taille des territoires exprimant le gène *LacZ* inséré dans le locus *Krox20* est inférieure chez les embryons homozygotes comparé aux embryons hétérozygotes, présentant un phénotype sauvage (Schneider-Maunoury et al., 1993). Le mécanisme d'autorégulation de *Krox20* joue un rôle primordial dans le processus d'expansion en stabilisant l'expression de *Krox20* dans les cellules recrutées, de façon directe via l'élément régulateur A et possiblement de façon indirecte par induction des gènes *Hoxa2* et *Hoxb2*, qui activent à leur tour le gène *Krox20* via leur liaison à l'élément C (Chomette et al, soumis).

Le facteur HCF-1, jouant un rôle primordial pour l'autorégulation de *Krox20*, pourrait donc participer de façon indirecte à la stabilisation et au maintien des territoires r3 et r5. Il serait intéressant de déterminer la capacité de la version de *Krox20* n'interagissant plus avec HCF-1 à induire les gènes *Hoxa2* et *Hoxb2*, afin de savoir si HCF-1 peut également jouer un rôle à ce niveau. L'expression de *Krox20* le long du tube neural par électroporation ne permet cependant pas l'induction ectopique des gènes *Hoxa2* et *Hoxb2* et ne conduit pas non plus à un renforcement net de leur taux d'expression au sein des territoires où ils sont exprimés. Cependant, les séquences régulatrices permettant l'activation directe par *Krox20* de ces deux gènes ont été caractérisées et elles sont activées en cas d'expression ectopique de *Krox20* chez l'embryon de souris (Nonchev et al., 1996; Sham et al., 1993). Il pourrait donc être intéressant de tester l'effet de la protéine *Krox20* n'interagissant plus avec HCF-1 sur l'activité de ces séquences au niveau du rhombencéphale par des études de co-électroporation. De plus, la génération et l'étude d'une lignée de souris exprimant une protéine *Krox20* mutée au niveau de

ses sites avec HCF-1 pourrait s'avérer là encore être un outil pertinent, cette fois pour l'étude de l'expansion des domaines exprimant *Krox20* en absence de cette interaction.

Par ailleurs, l'expression de *Krox20*, *Nab1* et *Nab2* chez les embryons de souris *Krox20*^{I268F/I268F} montre que la mise en place des rhombomères r3 et r5 n'est pas affectée en absence de l'interaction entre *Krox20* et les Nab. Les Nab ne semblent donc pas être nécessaires à l'expansion des domaines d'expression de *Krox20*.

Les études que nous avons menées par électroporation chez l'embryon de poulet nous ont permis de montrer que le domaine du tube neural compétent pour l'expression de *Krox20* n'est pas restreint aux seuls segments r3 et r5, mais correspond à un domaine continu le long du rhombencéphale ayant comme limite rostrale la frontière entre mésencéphale et rhombencéphale. L'existence de cette limite peut être liée à l'absence du facteur *Gbx2* antérieurement à cette frontière. L'expression de *Krox20*, perdue au niveau de r3 chez les mutants *Gbx2*^{-/-} (Wassarman et al., 1997), est en effet restaurée chez les mutants *Gbx2*^{-/-}*Otx2*^{-/-}. Ceci suggère que *Gbx2* possède un rôle permissif dans la formation du rhombencéphale antérieur, notamment en antagonisant *Otx2* (Li and Joyner, 2001). Le fait que les territoires qui entourent r3 et r5 soient compétents pour l'expression de *Krox20* suggère par ailleurs qu'il doit exister un mécanisme actif conduisant à l'arrêt de l'extension de ces territoires au cours du processus de segmentation.

Cet arrêt de l'expansion de l'expression de *Krox20* peut notamment être lié à l'existence de mécanismes limitant le recrutement non-autonome cellulaire ou l'activité de *Krox20* au sein des cellules l'ayant activé. Des résultats préliminaires suggèrent que l'expression d'HCF-1 chez la souris à un stade correspondant à l'arrêt de l'expansion des domaines r3 et r5 présente des taux variables le long de l'axe antéro-postérieur au niveau du rhombencéphale. Une zone, semblant englober la partie postérieure de r2, la frontière r2/r3 et la partie antérieure de r3, présente notamment un taux d'expression très faible. La réalisation d'un co-marquage par hybridation *in situ* de l'expression de *Krox20* et HCF-1 à ce stade de développement pourrait permettre de confirmer ces données et de déterminer la localisation exacte de ce territoire, dont l'existence suggère qu'une baisse d'activité d'HCF-1 pourrait participer à la limitation de l'expansion de l'expression de *Krox20*.

Une hypothèse alternative est l'existence de facteurs réprimant activement cette expansion. Le caractère plutôt répresseur des Nab sur l'activité de *Krox20* au niveau du rhombencéphale observé par surexpression chez les embryons de poulet et de poisson-zèbre (article 1, Mechta-Grigoriou et al., 2000) suggère que les Nab pourraient jouer un rôle dans l'arrêt de l'extension des domaines d'expression de *Krox20* en inhibant son activité. Le renforcement aux frontières de r5 de l'expression du gène *Nab1* à 8 somites (Mechta-Grigoriou et al., 2000), à un moment proche de l'arrêt de l'expansion de ce domaine, renforce l'hypothèse

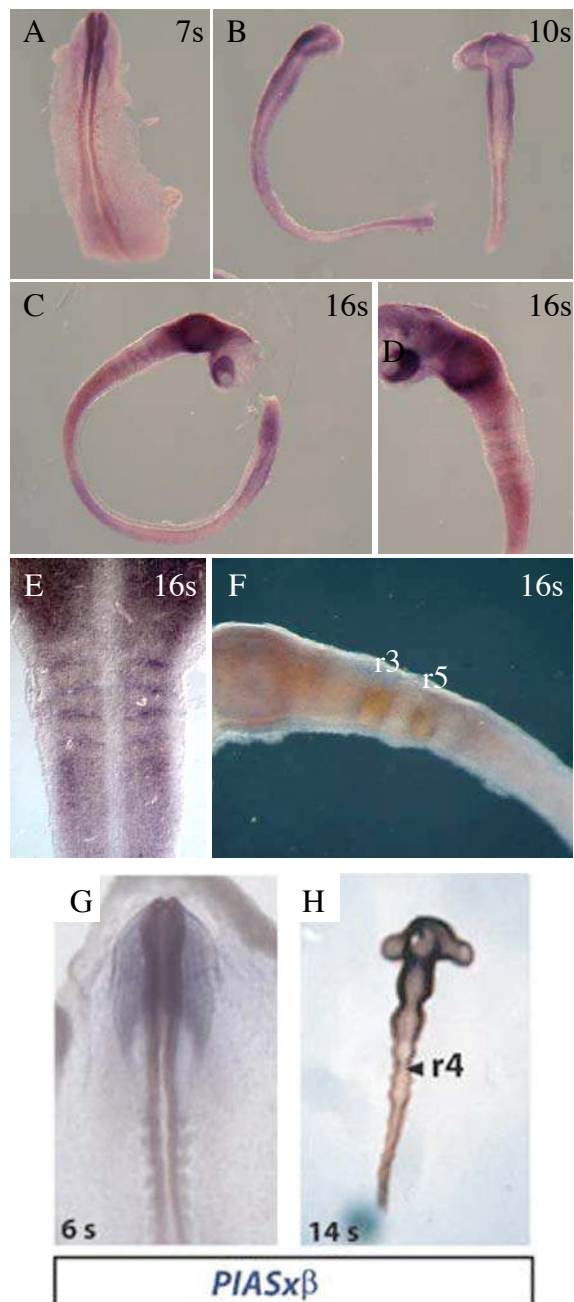


Figure 39 : Profils d'expression de *Ddx20* et *PIASxβ* chez l'embryon de poulet

A à F : expression de *Ddx20* par hybridation *in situ*. E: montage à plat correspondant aux photos C et D. F : co-détection de l'expression de *Ddx20* en bleu et *Krox20* en orange.

G et H : expression de *PIASxβ* (d'après Garcia-Dominguez et al, 2006).

L'expression de *Ddx20* et *PIASxβ* est détectée à partir de 6/7 somites au niveau du tube neural d'embryon de poulet (A et G). L'expression de *Ddx20* suit à ce stade ainsi qu'au stade 10s un gradient renforcé antérieurement. Par la suite, cette expression s'éteint dans la région comprise entre r2 et r6 inclus (C-F), à l'exception des frontières des rhombomères, où elle est maintenue. *PIASxβ* est quant à lui exprimé dans le tube neural antérieur jusqu'à r2 et est de plus renforcé au niveau de r4 au stade 14s.

d'un rôle du facteur Nab1 dans ce processus ou dans la stabilisation des frontières d'expression de *Krox20*. Cependant, les domaines r3 et r5 ne présentent pas une taille accrue chez les embryons *Krox20*^{I268F/I268F}, montrant que ce processus ne repose pas nécessairement sur les Nab. Il est possible que ces facteurs jouent effectivement un rôle dans ce phénomène mais qu'il existe des mécanismes redondants, indépendants de leur activité.

La protéine Ddx20, connue pour avoir une activité répressive sur l'activité de *Krox20 in vitro* (Luciano and Wilson, 2003), pourrait également jouer un rôle dans ce processus. L'étude du profil d'expression du gène *Ddx20* chez l'embryon de poulet réalisée au cours de ma thèse est présenté sur la figure 39. Elle montre que l'expression de *Ddx20*, si elle s'atténue globalement à partir d'environ 12 somites au niveau des rhombomères r2 à r6, reste très prononcée au niveau des frontières des rhombomères r3 et r5. Ceci suggère un rôle de Ddx20 dans l'arrêt de l'expansion des domaines d'expression de *Krox20* ou dans la stabilisation de ces frontières, éventuellement par répression de l'activité de *Krox20* à leur niveau.

1.3. Rôle des cofacteurs de *Krox20* dans l'acquisition et le maintien de l'identité des rhombomères 3 et 5

Les études menées au cours de ma thèse ont également porté sur la régulation de l'activité de *Krox20* concernant l'induction ou la répression de différentes cibles, qui jouent un rôle dans l'intégrité et l'identité des territoires rhombomériques. *Krox20* est connu pour activer directement le gène *EphA4* (Theil et al., 1998), codant un facteur impliqué dans la ségrégation entre rhombomères pairs et impairs. Par ailleurs, *Krox20* réprime des marqueurs de rhombomères pairs, tels la *Follistatine* et *Hoxb1*. On ignore à ce jour si la répression de la *Follistatine* par *Krox20* est un mécanisme direct ou indirect. Une récente étude du laboratoire a en revanche montré que la régulation d'*Hoxb1* est indirecte, *Krox20* séquestrant par interaction protéique via son domaine à doigts-de-zinc le facteur PIASxβ, impliqué dans l'activation d'*Hoxb1* (Garcia-Dominguez et al., 2006). Par ailleurs, PIASxβ est capable en retour de réprimer l'activité de *Krox20* en cas de surexpression au niveau du tube neural.

Nous avons tout d'abord montré que *Krox20* ne peut induire *EphA4* ectopiquement que dans un domaine allant de r2 à r6 inclus, cette activation présentant de plus un gradient antéro-postérieur décroissant. Cette induction restreinte suggère l'existence de cofacteurs régionalisés, pouvant agir en synergie avec *Krox20*, soit par interaction protéique avec ce facteur, soit en se liant directement à l'ADN au niveau de séquences régulatrices distinctes. Des études menées récemment au laboratoire montrent que les facteurs Meis et Hox notamment sont capables d'activer le gène *EphA4* endogène par électroporation chez l'embryon de poulet. La co-électroporation de plasmides d'expression codant *Krox20*, *Hoxa2* et *Meis2* permet notamment d'étendre le domaine compétent pour l'activation d'*EphA4* à r1 (Pascale Gilardi,

communication personnelle). De plus, les facteurs de transcription *Meis2* et *Hoxa2* endogènes sont exprimés durant la segmentation du rhombencéphale chez l'embryon de souris et de poulet jusqu'à la frontière entre r1 et r2 antérieurement, limite correspondant à celle observée pour *EphA4* dans notre étude (Chomette et al., 2006; Hunt et al., 1991b; Prince and Lumsden, 1994). Par ailleurs, l'expression de *Meis2* s'affaiblit progressivement au niveau du rhombencéphale caudal, ce qui peut partiellement rendre compte du gradient d'activation ectopique observé pour *EphA4* après électroporation de *Krox20* (Chomette et al, soumis ; Marie Pouihle, communication personnelle). Enfin, le facteur *Meis2* est capable d'activer un gène rapporteur placé sous le contrôle de la séquence régulatrice précédemment caractérisée comme étant responsable de l'expression d'*EphA4* dans r3 et r5 (Theil et al., 1998). La mutation des sites *Meis* caractérisés *in silico* au niveau de cette séquence abolit son activation par *Meis2*, ce qui suggère que le mécanisme impliqué est direct.

La restriction de l'expression d'*EphA4* en cas d'expression ectopique de *Krox20* le long du tube neural peut également être liée à l'existence de facteurs répresseurs de cette induction. L'expression de *Ddx20* aux stades considérés chez l'embryon de poulet pourrait ainsi être compatible avec la restriction observée pour *EphA4* (figure 39). En effet, aux stades auxquels sont récupérés les embryons électroporés, c'est-à-dire à environ 18s, l'expression de *Ddx20* est éteinte entre r2 et r6, à l'exception des frontières rhombomériques, mais est maintenue antérieurement à r2 et postérieurement à r6.

D'un point de vue plus général, *Ddx20* et *PIASxβ* jouent tous deux un rôle répresseur sur l'activité de *Krox20* et possèdent des profils d'expression se recouvrant partiellement. Ceci suggère une potentielle synergie de ces facteurs durant le processus de segmentation (figure 39). *Ddx20* est en effet connu pour agir en synergie avec les *PIAS*, notamment pour la répression de l'activité du facteur de transcription SF-1 (Lee et al., 2005; Ou et al., 2001; Yan et al., 2003). L'activité de *Ddx20* et des *PIAS* induit une relocalisation de SF-1 au sein du noyau, ce mécanisme pouvant participer à la répression de l'activité de ce facteur de transcription. Il faut noter par ailleurs qu'une relocalisation nucléaire de *Krox20* est observée en présence de *PIASxβ* (Garcia-Dominguez et al., 2006), suggérant l'existence d'un mécanisme similaire. *PIASxβ* et *Krox20* étant impliqués dans un phénomène de répression réciproque et leurs domaines d'expression se recouvrant partiellement durant certaines phases de la segmentation au niveau du rhombencéphale, on peut penser qu'il existe des mécanismes favorisant l'activité de l'un de ces répresseurs aux dépens de l'autre. La présence de *Ddx20* pourrait par exemple favoriser la répression de *Krox20* par *PIASxβ*. Le taux relatif de protéine *Krox20* et *PIASxβ* pourrait également jouer un rôle déterminant. Ainsi, l'expression de *PIASxβ* est renforcée dans r4 au stade 14s chez l'embryon de poulet (Garcia-Dominguez et al.,

2006), ce facteur pouvant jouer un rôle dans la répression de l'expression de *Krox20* au sein de ce rhombomère, de façon redondante ou synergique avec *Hoxb1*.

Par ailleurs, nous avons montré que l'activation d'*EphA4* et la répression de la *Follistatine* par *Krox20* repose sur le même domaine de cette protéine. Le ou les potentiels cofacteurs de *Krox20* associé(s) à cette activité ne sont pas connus actuellement. Caractériser ce(s) cofacteur(s), ainsi que l'aspect direct ou indirect de la répression de la *Follistatine* par *Krox20*, permettrait de mieux comprendre les mécanismes impliqués. En effet, la répression de la *Follistatine* pouvant dépendre d'un facteur activé directement par *Krox20*.

CBP et P300 pourraient être impliqués dans l'activité de *Krox20* nécessitant ce domaine de la protéine. En effet, CBP et P300 sont connus pour jouer un rôle de co-activateurs avec de nombreux facteurs de transcription (Goodman and Smolik, 2000), via leur interaction avec les protéines du complexe transcriptionnel (Abraham et al., 1993; Kwok et al., 1994) et leur capacité à induire l'acétylation des histones (Ogryzko et al., 1996). Les parties N-terminale et C-terminale de CBP/P300 ont été montrées comme interagissant directement avec *Egr1* via un domaine compris dans les 281 premiers acides-aminés de ce facteur de transcription (Silverman et al., 1998), modulant positivement son activité transcriptionnelle. De plus, la co-expression de *Krox20* et *P300* dans des cultures cellulaires augmente les capacités inductrices de *Krox20*. L'activité de CBP/P300 pourrait jouer un rôle global dans les capacités inductrices de *Krox20* et notamment dans la régulation de l'expression de *Krox20*, le domaine acide d'HCF-1 étant également connu pour agir en synergie avec CBP/P300 (Luciano and Wilson, 2002; Luciano and Wilson, 2003). Il serait donc intéressant d'identifier le domaine d'interaction entre CBP/P300 et *Krox20* au sein de la séquence de ce facteur de transcription et de caractériser plus en détail le rôle de cette co-activation pour l'induction des différentes cibles transcriptionnelles de *Krox20* au sein du rhombencéphale.

Par ailleurs, la caractérisation des séquences régulatrices de la *Follistatine* permettant son expression au niveau du rhombencéphale et l'étude d'une liaison éventuelle de *Krox20* à leur niveau sont des éléments essentiels à la caractérisation des mécanismes moléculaires impliqués pour la co-régulation d'*EphA4* et de la *Follistatine* par un même domaine de *Krox20*. Une meilleure compréhension du rôle de la *Follistatine*, connue pour être un répresseur des BMP dans le mésencéphale (Alexandre et al., 2006), pourrait également renseigner sur le caractère fonctionnel de cette co-régulation durant le processus de segmentation du rhombencéphale. Un des rôles de la répression de la *Follistatine* par *Krox20* dans les rhombomères r3 et r5 pourrait être de protéger le signal médié par BMP4 à ce niveau, qui conduit notamment à l'apoptose des cellules de crête neurale issues de ces deux rhombomères (Graham and Lumsden, 1996).

Ce phénomène soulève l'idée de l'existence de groupes de cibles co-régulées, éventuellement en rapport avec leur rôle fonctionnel durant le processus de segmentation. On

observe notamment que *Krox20* et *Nab*, impliqués dans la régulation de l'activité de ce facteur, sont co-régulés par le même sous-domaine de la protéine. Il faut cependant noter que si la régulation de *Krox20* et *Nab* est dépendante du même domaine de *Krox20*, les domaines de compétence déterminés pour l'expression de ces deux gènes ne sont pas les mêmes. Le domaine d'expression de *Krox20* étant plus restreint, il doit exister un mécanisme de régulation plus complexe pour ce gène que pour *Nab* au niveau du rhombencéphale.

Il serait intéressant de caractériser de nouvelles cibles de *Krox20* au niveau du rhombencéphale et de tester l'activité des différents domaines que nous avons caractérisés pour leur régulation, afin de pouvoir éventuellement conforter l'hypothèse de l'existence de classes de gènes co-régulés en relation avec leur fonction durant le processus de segmentation. Comme cela a précédemment été évoqué, l'étude de la réponse des séquences régulatrices contrôlant l'expression des gènes *Hoxa2*, *Hoxb2* et *Hoxb3* au niveau du rhombencéphale à diverses formes délétées de *Krox20* pourrait apporter de nouveaux arguments en faveur ou non de cette hypothèse. De plus, *Krox20* jouant un rôle au niveau de divers tissus et types cellulaires (Laslo et al., 2006; Levi et al., 1996; Safford et al., 2005; Schneider-Maunoury et al., 1993; Shao et al., 1997; Topilko et al., 1994), il faudrait étendre cette étude à ces autres systèmes, afin d'y étudier l'éventuelle conservation des mécanismes que nous avons caractérisés. Les seules données connues à ce sujet pour l'instant sont que la délétion des 261 premiers acides aminés de *Krox20* conduit à la perte d'activation dans les cellules de Schwann à la fois du gène *Périaxine* et de *Mpz*, codant le facteur P0, tandis que l'activité de *Krox20* n'est que réduite dans le cas de la délétion des 183 premiers acides aminés (Parkinson et al., 2003). Ceci suggère que leur régulation repose sur l'implication de plusieurs domaines que nous avons caractérisés. Il serait donc intéressant de tester l'activité des différentes formes de *Krox20* que nous avons générées par transfection dans des cellules de Schwann, afin d'étudier leur activité sur des gènes endogènes ou sur les séquences régulatrices de gènes, tel *Mpz* (LeBlanc et al., 2006), connus pour être activés directement par *Krox20*.

1.4. Intervention potentielle des facteurs Nab dans l'extinction de *Krox20*

L'interaction entre *Krox20* et les Nab ne semble pas jouer un rôle primordial dans la mise en place des rhombomères r3 et r5, ceux-ci se formant normalement chez les embryons *Krox20*^{I268F/I268F}. En revanche, l'expression de *Krox20* est légèrement maintenue chez les embryons *Krox20*^{I268F/I268F} à un stade où elle est normalement absente chez les embryons de souris sauvages, comme présenté dans l'article 2. On observe en particulier un maintien de l'expression ventrale dans r3 et r5. Cela suggère un rôle actif de l'interaction entre *Krox20* et les Nab dans la répression de l'expression de *Krox20* au sein du rhombencéphale, ce mécanisme pouvant reposer sur la répression par les Nab de l'activité de *Krox20* au niveau de

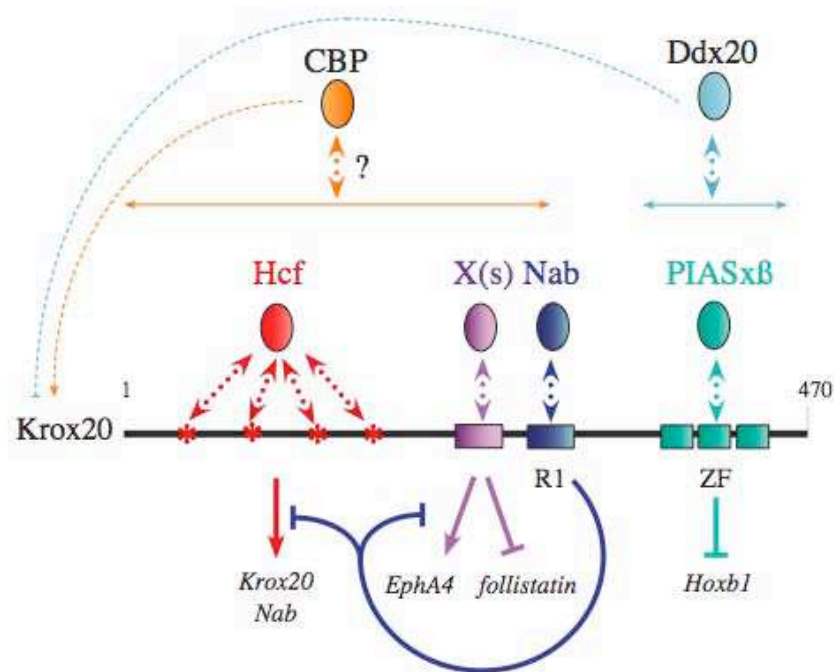


Figure 40 : Modèle intégrant l'activité transcriptionnelle associée aux différents domaines de la protéine Krox20 et à ses différents co-facteurs au niveau du rhombencéphale

Le facteur HCF-1 interagit avec la partie N-terminale de Krox20 via quatre sites de liaison, cette interaction jouant un rôle dans l'activation des gènes *Krox20* et *Nab*. L'activation d'*EphA4* et la répression de la *Follistatine* repose sur un même domaine, interagissant probablement avec un ou plusieurs cofacteurs (Xs) non caractérisés à l'heure actuelle. L'interaction des facteurs Nab avec le domaine répresseur R1 limite l'activité activatrice de Krox20. Enfin, le domaine à doigts-de-zinc (ZF) réprime l'expression d'*Hoxb1* en séquestrant le facteur PIASxβ, qui peut lui-même jouer le rôle de répresseur de l'activité de Krox20. Deux autres cofacteurs potentiels de Krox20 ont été décrits : Ddx20, interagissant avec le domaine à doigts-de-zinc, semble associé à une répression de l'activité de Krox20, tandis que CBP/P300, interagissant potentiellement avec la partie N-terminale de la protéine, aurait plutôt un rôle de co-activateur.

Les chiffres indiquent la numérotation en acides aminés de la protéine, l'extrémité N-terminale correspondant à l'acide aminé numéro 1.

l'élément auto-régulateur A. Les Nab ne semblent pas affecter l'expression de *Krox20* avant la période d'extinction, on peut supposer que cette répression est liée à l'existence d'une évolution du taux relatif entre *Krox20* et les Nab, précocément favorable à l'activité de *Krox20* mais favorisant tardivement l'effet répresseur des Nab. Un mécanisme similaire impliquant le taux d'Egr1 et des Nab a récemment été décrit comme permettant l'expression cyclique de l'hormone lutéinisante (Lawson et al., 2007). On pourrait également supposer que l'évolution de l'activité des Nab peut être liée à des modifications post-traductionnelles ou à l'expression de différents isoformes. Il est par exemple connu qu'il existe plusieurs isoformes de l'ARNm du gène *Nab2* pouvant coder des protéines nucléaires différentes (Fukuda et al., 2007).

Le phénomène d'extinction de *Krox20* pourrait également dépendre d'autres mécanismes, tel l'existence de séquences inhibitrices non identifiées à ce jour, localisées en cis au niveau du locus *Krox20* ou l'expression de micro-ARN dirigé contre l'ARNm de *Krox20*, pouvant à terme limiter son expression. Des études préliminaires faites au laboratoire afin de tester cette dernière hypothèse se sont pour l'instant révélées négatives.

Les données concernant les co-facteurs de *Krox20* au niveau du rhombencéphale suggèrent une régulation complexe de son activité (modèle présenté en figure 40). Certaines régulations semblent être globales, comme celles véhiculées par les Nab, d'autres paraissant spécifiques de cibles transcriptionnelles données, comme dans le cas d'HCF-1. L'essentiel des données obtenues concerne la régulation de *Krox20* lui-même, soit directement, soit indirectement via la régulation du gène *Nab*, suggérant des régulations fines du taux d'expression de ce facteur de transcription durant la segmentation du rhombencéphale.

2. Rôle de *Krox20* au niveau du système nerveux périphérique

L'étude des effets de la mutation *Krox20*^{I268F} chez la souris a révélé deux atteintes majeures au niveau des nerfs du système nerveux périphérique, d'une part un défaut de myélinisation, que nous avons plus particulièrement étudié au niveau des nerfs sciatiques, et d'autre part une fusion partielle de certains nerfs crâniens.

2.1. Les souris homozygotes *Krox20*^{I268F} développent des troubles liés à un défaut de myélinisation du SNP

2.1.1. Description des défauts observés chez les souris *Krox20*^{I268F/I268F}

La génération d'un modèle murin portant la mutation I268F au locus *Krox20* nous a permis d'étudier l'impact sur le processus de myélinisation du SNP de la perte d'interaction

entre les facteurs Krox20 et Nab provoquée par cette mutation (Swirnoff et al., 1998; Warner et al., 1999).

Tandis que les souris hétérozygotes pour la mutation ne présentent aucun phénotype, les souris *Krox20*^{I268F/I268F} présentent des tremblements et développent des défauts de locomotion apparents dès la deuxième semaine après leur naissance, ces altérations concernant d'abord surtout les membres postérieurs et s'étendant par la suite aux membres antérieurs. Une aggravation rapide conduit à une paralysie avancée des membres antérieurs et postérieurs. Les souris homozygotes mutantes souffrent par ailleurs d'une forte altération du rythme respiratoire peu avant leur mort, qui survient au cours de la troisième semaine post-natale. Une étude ultrastructurale détaillée menée sur des nerfs sciatiques de souris mutantes à P17 a montré que le processus de myélinisation est affecté dans ce modèle murin. Les nerfs sciatiques présentent une forte hypomyélinisation des axones de large diamètre, avec l'existence de fibres amyéliniques. Les fibres myélinisées présentent de plus une réduction de l'épaisseur de la gaine de myéline et des défauts d'enroulement sont couramment observés au niveau de ces gaines.

Les cellules de Schwann parviennent à établir un rapport 1 :1 avec les axones mais ne poursuivent pas le processus de myélinisation, suggérant qu'elles restent bloquées au stade pro-myélinisant. Ces résultats montrent que l'interaction entre Krox20 et les Nab est nécessaire au bon déroulement de la myélinisation du SNP et suggèrent que les Nab jouent un rôle agoniste de l'activité de Krox20 durant la différenciation des cellules de Schwann.

Afin de mieux comprendre l'évolution du phénotype observé, nous avons réalisé une étude cinétique sur des nerfs sciatiques de souris sauvages et mutantes à des âges compris entre P8 et P20, correspondant à une phase active de myélinisation du SNP. Cette étude a révélé une altération complexe du processus de myélinisation.

- Précocément, les souris homozygotes pour la mutation présentent un retard de myélinisation du système nerveux périphérique. La myéline formée est de plus anormale, les gaines étant plus fines que celles observées chez les animaux sauvages et certaines présentant des défauts d'enroulement et de compaction.

- Les animaux mutants présentent à P17 un taux de myélinisation seulement légèrement inférieur aux animaux sauvages, suggérant que le retard du processus de myélinisation a partiellement été rattrapé. La myéline formée est cependant toujours anormale, comme observé précédemment.

- A P20, la myéline formée auparavant a été fortement dégradée. Durant cette phase, on observe la présence de macrophages, certains contenant des débris de myéline, ce qui suggère leur implication dans le processus de dégradation.

Des études du taux de prolifération par injection de BrdU et d'apoptose par marquage TUNEL nous ont permis de montrer que la prolifération des cellules de Schwann est anormalement élevée chez les animaux mutants jusqu'à P14, puis qu'elle revient à un taux comparable à celui observé chez les animaux sauvages à partir de P17. Le taux d'apoptose des cellules de Schwann est en revanche à peu près similaire chez les animaux sauvages et mutants aux différents temps que nous avons étudiés.

Un modèle hypothétique du déroulement de la myélinisation du SNP chez les animaux mutants *Krox20*^{I268F} serait qu'il existerait dans un premier temps un retard de myélinisation, possiblement lié à un maintien d'un taux anormalement haut de la prolifération. La répression de cette prolifération s'accompagnerait de la formation de myéline chez les animaux mutants, mais les gaines de myéline formées étant anormales, elles seraient ensuite dégradées au cours d'une phase inflammatoire.

Il serait intéressant de déterminer si le blocage de la myélinisation durant la phase précoce est dû au défaut d'arrêt de prolifération observé. On pourrait en effet supposer que la répression de la prolifération soit un prérequis pour que le processus de formation de la gaine de myéline puisse se mettre en place. L'expression forcée de c-Jun et de Notch conduit notamment un retard dans le processus de myélinisation au niveau du SNP (K.J. Jessen et R. Mirsky, communication personnelle). Or il a été montré que Krox20 réprime l'activité de c-Jun dans les cellules de Schwann, en induisant l'expression de JIP-1, qui inhibe la phosphorylation activatrice de c-Jun (Parkinson et al., 2004). Par ailleurs, Notch est connu pour lui-même inhiber l'activité de JIP-1, supposant un rôle antagoniste entre Notch et Krox20 dans les cellules de Schwann (Kim et al., 2005b). Krox20 réprime également l'expression du gène c-Jun, intervenant donc à deux niveaux de régulation distincts. De plus, il est connu que l'absence de Krox20 conduit à un maintien de l'expression d'Oct6/SCIP, marqueur des cellules pro-myélinisantes, stade auquel les cellules de Schwann prolifèrent et sont sujettes au phénomène d'apoptose (Zorick et al., 1999). Krox20 pourrait donc favoriser la myélinisation notamment par son activité de répression de la prolifération, l'interaction avec Nab semblant être impliquée dans ce processus.

Afin de vérifier le rôle du maintien de prolifération dans le blocage de la myélinisation, il pourrait être intéressant d'essayer de bloquer la prolifération des cellules de Schwann chez les mutants *Krox20*^{I268F/I268F} afin de vérifier si cela permet de réduire le délai de formation de la myéline chez ces animaux. Cette étude pourrait reposer sur une approche *in vitro*, en bloquant la prolifération de cultures cellulaires primaires de cellules de Schwann prélevées chez des souris *Krox20*^{I268F/I268F} par un traitement à l'aphidicholine (McKinnon et al., 1993) ou sur une approche *in vivo*, par injection de doses élevées de BrdU par voie intrapéritonéale.

Il est intéressant de noter que les défauts de locomotion s'aggravent de façon importante durant la phase de dégradation de la myéline, les symptômes étant alors plus prononcés qu'en l'absence de myéline liée au retard du processus de myélinisation. La phase de dégradation s'accompagnant de la présence de macrophages, on peut penser qu'il y a une réaction inflammatoire, pouvant éventuellement altérer les axones. Aucune axonopathie n'est cependant clairement observée chez les mutants *Krox20*^{I268F/I268F}. Il pourrait être intéressant d'appliquer un traitement anti-inflammatoire aux souris *Krox20*^{I268F/I268F} durant la période de forte aggravation de leur phénotype afin de vérifier si cela permet de limiter l'évolution des symptômes observés et la dégradation de la myéline précédemment formée. Diverses molécules anti-inflammatoires, testées dans le cas de maladies démyélinisantes du SNC pourraient être utilisées, telles que les interférons, les statines ou la minocycline (Lubetzki et al., 2005).

Enfin, l'hypomyélinisation du système nerveux périphérique est un processus global, affectant notamment le nerf phrénique, innervant le diaphragme et jouant donc un rôle dans le rythme respiratoire. La démyélinisation du nerf phrénique pourrait donc expliquer les troubles respiratoires semblant entraîner la mort des souris mutantes, sans qu'une altération du système nerveux central ne soit impliquée dans ce processus.

2.1.2. Les souris *Krox20*^{I268F} comme modèle de CMT

Le modèle murin *Krox20*^{I268F} que j'ai généré au cours de ma thèse présente diverses caractéristiques le rapprochant d'une forme particulièrement grave de CMT, liée à une mutation ponctuelle similaire chez l'humain. Dans le modèle murin comme chez les patients humains, la pathologie se déclenche uniquement à l'état récessif, suggérant qu'elle correspond plutôt à une perte de fonction et conduit à des symptômes précoces et sévères. Les deux formes de CMT comportant un démarrage précoce sont les neuropathies hypomyélinisantes congénitales (CHN) et le syndrome de Dejerine-Sottas (DSS).

Le système nerveux périphérique est affecté chez les souris *Krox20*^{I268F} mutantes par une importante hypomyélinisation, mêlant fibres axonales amyéliniques et fibres myélinisées présentant une gaine de myéline anormale. Par ailleurs, on note une absence de cellules de Schwann regroupées « en pelure d'oignons » autour des axones, structures couramment observées dans les cas de DSS, correspondant à un regroupement de cellules de Schwann immatures autour des axones.

Ces caractéristiques suggèrent donc que notre modèle murin reproduit plutôt une forme de CHN, comme cela est observé chez l'homme. Cependant, l'existence d'un phénomène inflammatoire n'est généralement pas associé aux syndromes de type CHN, mais plutôt aux formes démyélinisantes de CMT (Pareyson, 2004). Les formes de neuropathies

démyélinisantes inflammatoires ont été associées chez certains patients à de forts taux d'anticorps dirigés contre des protéines de myéline (Gabriel et al., 2000; Khalili-Shirazi et al., 1993). Ceci laisse supposer que la désorganisation des gaines de myéline pourrait entraîner de façon active une réponse immunitaire en exposant ces protéines de structure normalement localisées au sein de la myéline. Un phénomène comparable est potentiellement associé à la phase de dégradation de la myéline présentée par notre modèle.

Le processus inflammatoire semble majoritairement responsable des aggravations observées chez les patients souffrant de CMT, car il entraîne à terme une atteinte axonale (Bjartmar et al., 1999). Le maintien d'une neuroprotection par les cellules de Schwann semble en effet être un point important pour limiter l'aggravation des symptômes (Kamholz et al., 2000, J.M. Vallat, communication personnelle). La phase de dégradation de la myéline correspond à une très forte aggravation du phénotype observé dans notre modèle murin, reproduisant les symptômes observés chez l'humain. Notre modèle pourrait donc s'avérer utile, par la caractérisation des mécanismes moléculaires liés à l'aggravation drastique et rapide des défauts de locomotion observés chez les souris mutantes et la recherche de méthodes de restauration de la neuroprotection.

Il est difficile de conclure si, chez les patients portant la mutation I268N, le processus de myélinisation n'évolue jamais au-delà de la première phase que nous avons observée chez les mutants *Krox20*^{I268F}, la pathologie correspondant donc uniquement à une hypomyélinisation sans phase de production et dégradation de la myéline, ou si au contraire, la maladie est également biphasique mais n'est détectée qu'à la fin de la deuxième phase d'altération, alors que la dégradation de la myéline a déjà eu lieu. Il n'existe que peu de données sur les cas de CHN, forme peu commune de CMT, probablement en raison de la gravité de cette pathologie parfois fatale, et il est difficile d'appréhender les évolutions de la maladie d'un point de vue histologique et moléculaire chez les patients. Outre le fait que les études par biopsie sont rares et ne peuvent évidemment pas être répétées régulièrement pour suivre l'évolution de la pathologie, il ne semble pas exister de bases de données présentant le suivi des patients et l'évolution de leurs symptômes.

Par ailleurs, notre modèle murin présente une fusion de certains nerfs crâniens, ce qui sera discuté par la suite. Les patients humains présentant une mutation similaire à celle introduite dans notre modèle ne semblent cependant pas développer de symptômes liés à d'éventuels défauts de l'organisation des nerfs crâniens et des études menées par IRM n'ont détectées aucun défaut particulier à ce niveau. Toutefois, un patient atteint de CMT et portant une autre mutation du gène *Krox20* a présenté tardivement des symptômes suggérant l'existence de défauts des nerfs crâniens, tandis que sa fille, portant la même mutation ne présentait au moment de l'étude que les symptômes d'une CMT classique, les études menées

par IRM étant normales pour ces deux patients (Pareyson et al., 2000). Ces données montrent qu'il est difficile d'exclure l'existence d'atteintes des nerfs crâniens, dont les effets peuvent rester inaperçus ou se développer tardivement. Là encore, le suivi des patients pourrait s'avérer capital afin de pouvoir évaluer si les modèles murins développés reproduisent fidèlement les pathologies humaines.

Les autres mutations ponctuelles de Krox20 associées à des neuropathies démyélinisantes correspondent toutes à des mutations affectant le domaine à doigts de zinc localisé dans la partie C-terminale de la protéine et altérant donc sa capacité à interagir avec l'ADN (Warner et al., 1998). Il est surprenant de noter que ces mutations sont toutes dominantes et que plus le taux de liaison résiduel à l'ADN est élevé, plus le phénotype observé est grave. Ceci suggère l'existence d'un caractère dominant-négatif pour ces mutations. Des études moléculaires récentes, qui seront décrites ultérieurement, semblent confirmer cette hypothèse dans le cas de la double mutation S382R/D383Y (Arthur-Farraj et al., 2006).

2.1.3. Altérations moléculaires observées au cours du processus de myélinisation chez les animaux *Krox20*^{I268F}

Afin de caractériser les événements moléculaires associés aux phases de retard de myélinisation et de dégradation de la myéline observées dans notre modèle murin et de comprendre le rôle précis de la perte d'interaction entre Krox20 et les Nab à leur niveau, j'ai réalisé une étude de l'expression de divers gènes connus pour être exprimés à différents stades du processus de myélinisation. Cette étude a été menée à des temps précoce (P4), lorsque la prolifération est anormalement élevée et tardif (P20), lors du processus de dégradation de la myéline. Ces résultats sont également complétés par des études d'expression protéique par western-blot et immunohistochimie (article 2).

Chez les animaux mutants, la phase de retard du processus de myélinisation est associée à une expression renforcée de marqueurs de cellules de Schwann indifférenciées, tels que les gènes *Id* ou *Foxd3* et de marqueurs de prolifération, telle la *cycline D1*. Le taux d'*IGF2* est également diminué chez les animaux mutants. Ce facteur, sécrété par les cellules de Schwann et se liant aux récepteurs de type IGF1R, joue un rôle dans la survie de ces cellules. Il favorise aussi la prolifération des cellules de Schwann à proximité des fibres non myélinisées et leur différenciation, en augmentant notamment l'expression de protéines de myéline comme P0 (Stewart et al., 1996). La diminution de l'expression d'*IGF2* pourrait donc participer au retard de différenciation des cellules de Schwann chez les animaux mutants. L'expression du gène *Jip1*, normalement activé par Krox20, est de plus très altérée. JIP-1 semble notamment impliqué dans la répression de l'activité de c-Jun, et joue donc un rôle anti-prolifératif au

niveau des cellules de Schwann (Parkinson et al., 2004). Le retard de myélinisation des cellules de Schwann pourrait donc notamment reposer sur une persistance de l'activité proliférative de c-Jun, favorisant un maintien à l'état immature de ces cellules. Le défaut d'arrêt de la prolifération semble cependant n'être que transitoire, le taux de prolifération observé chez les animaux mutants redevenant ultérieurement comparable à celui des animaux sauvages. Par ailleurs, à P4, l'expression des gènes codant les protéines de myéline est fortement diminuée, ce qui est cohérent avec un retard du processus de myélinisation.

Par ailleurs, l'étude de l'expression de différents gènes durant la phase de dégradation de la myéline chez les mutants montre un maintien de l'expression de marqueurs du stade pro-myélinisant, tel *Oct6/SCIP*, ou non-myélinisant, tel *Krox24*, qui devraient être éteints à ce stade de développement. Le taux d'expression des protéines de structure de la myéline, tel que P0 et MBP, est toujours fortement diminué à P20, alors que le processus de myélinisation s'est enclenché, ce qui pourrait notamment expliquer au moins partiellement les défauts d'enroulement et de compaction observés au niveau des gaines de myéline. Des défauts de myélinisation sont en effet observés dans des modèles murins présentant une expression altérée des protéines de myéline (Adlkofer et al., 1997a; Adlkofer et al., 1995; Adlkofer et al., 1997b; Giese et al., 1992; Popko et al., 1987; Quattrini et al., 1999; Suter et al., 1992; Valentijn et al., 1992; Wrabetz et al., 2000). L'implication d'une dérégulation de l'expression des lipides et de leurs taux relatifs dans les anomalies observées lors du processus de myélinisation chez les mutants *Krox20*^{I268F/I268F} n'est cependant pas à exclure, *Krox20* contrôlant également l'expression d'enzymes impliquées dans la synthèse des lipides (Leblanc et al., 2005).

La perte d'expression des marqueurs de myéline pourrait partiellement s'expliquer par la nécessité de l'interaction entre *Krox20* et les Nab pour l'activation de certaines cibles décrites comme directement induites par ce facteur, tel *Mpz* ou *Cx32* (LeBlanc et al., 2006; Musso et al., 2001; Musso et al., 2003). Cependant, des études *in vitro* suggèrent que les Nab jouent un rôle antagoniste de l'activité *Krox20* pour l'induction pilotée par une séquence régulatrice intronique caractérisée pour *Mpz*, une surexpression concomittante de Nab et *Krox20* limitant l'activité inductrice de ce dernier (LeBlanc et al., 2006). La diminution de l'expression des marqueurs de myéline pourrait donc reposer sur d'autres mécanismes dans notre modèle.

En particulier, *Oct6* et *Sox2*, dont l'expression est maintenue, sont connus pour réprimer l'expression des marqueurs de myéline (Le et al., 2005a; Zorick et al., 1996). De plus, le maintien d'*Oct6* pourrait expliquer l'augmentation du taux d'expression de *Krox20* à P20 chez les animaux mutants, *Oct6* étant impliqué dans l'activation directe de ce gène au niveau des cellules de Schwann (Ghislain and Charnay, 2006). De plus, l'expression de *Nab2* est fortement renforcée dès P4 dans notre modèle. Ce gène est connu comme étant une cible directe de *Krox24/Egr1* (Kumbrink et al., 2005) et les Nab sont également activés par *Krox20*

dans les cellules de Schwann (Le et al., 2005b). Si le taux accru de Krox24 et Krox20 à P20 peut rendre compte de l'augmentation d'expression du gène *Nab2* à ce stade, l'expression renforcée de ce gène dès P4, alors que l'expression de *Krox20* et *Krox24* est normale, suggère que la perte d'interaction entre les Nab et Krox20 augmente la capacité de ce dernier à induire *Nab2*.

Les données obtenues suggèrent que l'absence d'interaction entre Krox20 et Nab conduit à des dérégulations moléculaires complexes perturbant le processus de myélinisation à deux niveaux distincts, premièrement lors de la transition entre cellules pro-myélinisantes et cellules myélinisantes et ensuite lors de la phase active de formation de la gaine de myéline. L'interaction entre Krox20 et les Nab pourrait donc être nécessaire à la répression de la prolifération, avant de participer à la régulation de la phase de production de la myéline. Réaliser des études moléculaires sur des cultures cellulaires dérivées de cellules de Schwann des souris *Krox20*^{I268F} pourrait permettre de caractériser de manière fine les mécanismes impliqués dans les altérations du processus de myélinisation chez ces mutants. Il serait notamment intéressant de caractériser de nouvelles cibles directes de Krox20 dans les cellules de Schwann afin de vérifier l'effet promoteur-spécifique de la perte d'interaction entre Krox20 et les Nab. En particulier, la phase de dégradation ne correspond pas à un phénomène de dédifférenciation des cellules de Schwann chez les animaux mutants, mais plutôt à un état associé à des expressions génétiques aberrantes, suggérant l'existence de rôles variés et probablement cible-dépendants pour l'interaction entre Krox20 et les Nab. Enfin, il est intéressant de noter que les dérégulations observées pour différents marqueurs varient au cours du temps, suggérant l'importance d'étudier les altérations moléculaires d'un point de vue cinétique, l'expression de ces gènes variant également de façon physiologique au cours du processus de myélinisation.

2.1.4. Comparaison du modèle murin *Krox20*^{I268F} avec les modèles murins précédemment développés

Il existe à ce jour divers modèles murins correspondant à des pertes de fonctions partielle ou totale du gène *Krox20* et des gènes *Nab* (Decker et al., 2006; Le et al., 2005a; Le et al., 2005b; Topilko et al., 1994; Voiculescu et al., 2000).

Dans le cas du mutant perte de fonction *Krox20*^{-/-} comme dans le cas du mutant hypomorphe *Egr2*^{lo/lo}, obtenu par insertion du gène *néomycine* au niveau du premier intron du gène *Krox20*, les nerfs périphériques sont totalement amyélinisés, tandis que dans le cas des doubles mutants *Nab*, on observe une hypomyélinisation (Le et al., 2005a; Le et al., 2005b; Topilko et al., 1994). Par ailleurs, il est intéressant de noter que dans le cas du mutant *Krox*^{Cre/flox}, où l'allèle conditionnel *Krox20* est délété peu après l'allumage de *Krox20* dans les

cellules de Schwann par expression du gène *Cre* inséré au locus *Krox20*, on observe également une amyélinisation du SNP. L'expression initiale de *Krox20*, qui n'est pas maintenue en raison de la délétion, ne suffit pas pour engager le processus de myélinisation (Decker et al., 2006). Elle est néanmoins suffisante à la formation de r3 et r5 au niveau du SNC. Dans tous les modèles évoqués, les cellules de Schwann arrivent à établir un rapport 1 : 1 avec les axones, la formation de la gaine de myéline se bloquant après un tour et demi chez les mutants *Krox20*, la différenciation des cellules semblant s'arrêter au stade pro-myélinisant. De façon cohérente avec ces observations, le taux de prolifération des cellules de Schwann reste anormalement élevé dans tous ces modèles murins.

La perte d'interaction entre *Krox20* et les Nab conduit à des défauts similaires à ceux observés dans le cas des mutants perte de fonction. Ceci suggère un rôle agoniste de ces facteurs lors du processus de différenciation des cellules de Schwann, contrairement à ce qui a été observé au niveau du système nerveux central. Les Nab pourraient jouer dans un premier temps le rôle de co-répresseur de diverses cibles exprimées normalement lors de l'état prolifératif et réprimées par *Krox20* lors du passage à l'état myélinisant. Si l'effet répresseur de *Krox20* sur des facteurs associés à des états prolifératifs, tels les *Id*, *Sox2* ou *Oct6* (Le et al., 2005a; Zorick et al., 1999), a déjà été décrit, aucune de ces cibles n'a été montrée comme étant réprimée directement par *Krox20* à ce jour.

Par ailleurs, le phénotype plus sévère observé pour les mutants *Krox20* comparé aux doubles mutants *Nab* et à notre modèle suggère que *Krox20* conserve une activité résiduelle en l'absence d'interaction avec les Nab au cours du processus de myélinisation. Ainsi, le phénomène d'amyélinisation chez les mutants *Krox20* pourrait notamment s'expliquer par le maintien d'un taux de prolifération élevé en l'absence de ce facteur, tandis que dans le cas des mutants *Krox20*^{I268F/I268F}, l'arrêt de prolifération aurait finalement lieu et le processus de myélinisation, bien qu'anormal, serait amorcé.

Au niveau moléculaire, les dérégulations observées pour notre modèle reproduisent globalement celles caractérisées par des études de puces à ADN pour les mutants *Egr2*^{lo/lo} et les doubles mutants *Nab* (Le et al., 2005b). Cependant, des marqueurs décrits comme dérégulés dans certains des modèles précédemment évoqués ne montrent pas d'altération significative dans notre modèle. C'est notamment le cas pour le gène codant la L1-CAM, surexprimée chez les mutants *Egr2*^{lo/lo}, ou pour *Igfbp4*, spécifiquement inhibé chez les doubles mutants *Nab*.

Par ailleurs la comparaison des résultats obtenus par l'étude de notre modèle murin avec une précédente étude menée par surexpression de la protéine *Krox20*I268N dans des cultures de cellules de Schwann (Le et al., 2005b) montre que ces résultats ne sont pas forcément reproductibles dans le contexte *in vivo*. Ainsi, l'expression d'*Igfbp5* n'est pas altérée dans notre modèle, alors qu'elle est augmentée en cas de surexpression de *Krox20*^{I268N} dans des cellules de

Schwann. De plus, *Igf2* est inhibé dans les modèles *Egr2^{lo/lo}* et chez les doubles mutants *Nab*, tandis qu'il est surexprimé en cas d'expression de *Krox20^{I268N}* dans des cellules de Schwann en culture, notre modèle reproduisant plutôt les résultats observés dans les autres modèles murins. En revanche, la *Cadhérine11* est surexprimée aussi bien dans notre modèle que dans les modèles *Egr2^{lo/lo}*, *Nab1^{-/-}Nab2^{-/-}* et après surexpression de *Krox20^{I268N}* dans des cellules en culture. Deux hypothèses peuvent expliquer ces résultats. La première est que l'activité de la protéine Krox20I268N dans un contexte de surexpression conduit à un effet ne reproduisant pas son activité physiologique normale. La seconde hypothèse est que son activité peut effectivement varier de façon cible-spécifique, ne correspondant pas toujours à un rôle agoniste de Krox20 et des Nab, mais que cet effet est « uniformisé » dans le contexte global *in vivo*, l'altération de certaines de ces activités jouant un effet majeur masquant d'autres dérégulations en aval ou de moindre importance. Là encore, l'étude de ces régulations moléculaires au niveau de cultures de cellules de Schwann dérivées de notre modèle pourrait permettre de trancher entre ces deux hypothèses, ces cellules exprimant la forme mutée de la protéine Krox20 de façon endogène.

Enfin, l'homologue des Nab chez la Drosophile a été décrit comme pouvant interagir avec des facteurs de transcription ne contenant pas de domaine R1 (Clements et al., 2003; Felix et al., 2007), suggérant que les Nab pourraient jouer un rôle indépendant des Egr. Les défauts observés en cas de perte d'interaction entre Krox20 et les Nab pourraient donc également partiellement reposer sur l'augmentation d'expression de protéines Nab observée dans ce contexte anormal, renforçant la possibilité d'altération de diverses fonctions cellulaires en raison de leur libération par absence d'interaction avec Krox20.

Une seule autre mutation de la protéine Krox20, la mutation S382R/D383Y, associée chez l'humain à une forme sévère de CMT a été étudiée de façon détaillée, par surexpression dans des cellules de Schwann (Arthur-Farraj et al., 2006; LeBlanc et al., 2007; Nagarajan et al., 2001). La protéine Krox20 portant cette mutation présente une activité complexe. Elle joue un rôle de dominant-négatif pour l'activation de *Mpz* par Krox20 dans des cellules de Schwann en culture, en limitant notamment la fixation du facteur Sox10, qui agit normalement en synergie avec Krox20, mais active encore faiblement la *Périaxine* et *Nab2*. Cette protéine mutée assure de plus malgré tout une protection des cellules de Schwann contre le processus d'apoptose induit par les TGFβ et inhibe *cJun* de façon dose dépendante. Divers marqueurs de prolifération sont cependant toujours exprimés en sa présence, aboutissant au maintien d'un état prolifératif normalement réprimé par Krox20. Ces observations renforcent l'idée qu'il existe des modifications moléculaires complexes dans le cas des mutations ponctuelles de Krox20 associées aux CMT, rendant leur étude particulièrement délicate.

A

	<i>Krox20</i> ^{-/-}	<i>Egr2</i> ^{lo/lo}	<i>Nab1</i> ^{-/-} <i>Nab2</i> ^{-/-}	<i>Krox20</i> ^{I268F/I268F}
r3 et r5	absents	nd	nd	présents
Nerfs crâniens	Fusion des nerfs V et VII/VIII et des nerfs IX et X	Fusion des nerfs V et VII/VIII et des nerfs IX et X	Pas de défaut détecté	Fusion des nerfs V et VII/VIII et des nerfs IX et X

B

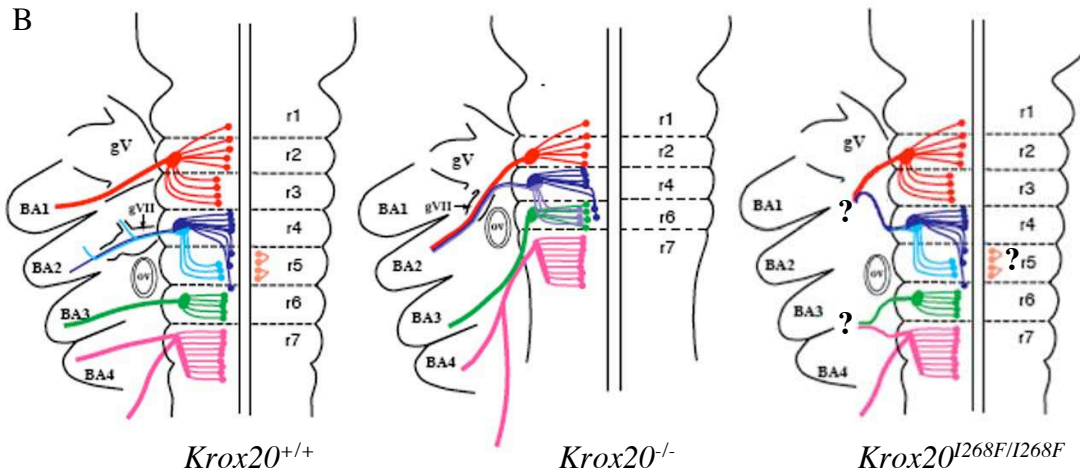


Figure 41 : Récapitulation des défauts observés au niveau de la segmentation du rhombencéphale et des nerfs crâniens chez différents modèles murins

A - Comparaison des défauts observés pour les embryons de souris *Krox20*^{-/-}, *Egr2*^{lo/lo}, *Nab1*^{-/-}*Nab2*^{-/-} et *Krox20*^{I268F/I268F}. nd : non décrit.

B - Schéma comparant l'organisation des nerfs crâniens et la segmentation du rhombencéphale chez les animaux sauvages, *Krox20*^{-/-} et *Krox20*^{I268F/I268F}. Chez ce dernier mutant, on observe une fusion de certains nerfs crâniens malgré la présence des rhombomères r3 et r5. La présence du nerf VI et la localisation exacte des projections fusionnées n'ont pas été vérifiées. BA : arc branchial, g : ganglion, ov : vesicule otique, r : rhombomère.

Modifié d'après Schneider-Maunoury et al, 1997.

2.2. Les souris *Krox20*^{I268F/I268F} présentent des défauts au niveau des nerfs crâniens

2.2.1. Description des défauts observés dans notre modèle et comparaison avec les modèles précédemment développés

Le second type de défaut observé au niveau du SNP dans notre modèle murin est la fusion avec une pénétrance variable des nerfs crâniens V et VII/VIII ainsi que celle des nerfs IX et X, dont la mise en place a été évoquée en introduction (I.2.2.1). Ce défaut est également observé chez les mutants *Krox20*^{-/-} et *Egr2*^{lo/lo}, mais, de façon surprenante, n'a pas été décrit dans le cas des doubles mutants *Nab* (figure 40 ; Le et al., 2005a; Le et al., 2005b; Schneider-Maunoury et al., 1993). Ce dernier résultat suggère que la mutation I268F pourrait conduire à une altération de la fonction de la protéine Krox20 mutée indépendamment de l'intervention des Nab, puisqu'ils ne semblent pas nécessaires au développement correct des nerfs crâniens. L'absence de défauts au niveau du double mutant *Nab* pourrait également être liée à une pénétrance variable de ce phénotype, potentiellement affecté par les variations de fonds génétiques.

Une des hypothèses retenues concernant les défauts des nerfs crâniens observés chez les mutants *Krox20* était que l'absence des rhombomères r3 et r5 chez les embryons mutants pouvait provoquer des contraintes physiques altérant l'agencement ordonné des nerfs crâniens (Schneider-Maunoury et al., 1993). Cependant, les rhombomères r3 et r5 sont présents chez les embryons *Krox20*^{I268F/I268F} et les profils d'expression des gènes régulés par Krox20 sont globalement peu altérés (article 2). Les altérations observées pourraient donc en réalité être liées à des altérations de la fonction de Krox20 au niveau d'autres types cellulaires intervenant dans la mise en place des nerfs crâniens.

2.2.2. Les anomalies observées pourraient être liées à un défaut de cellules de crête neurale

Les défauts observés pourraient donc notamment être liés à des modifications des flux de crête neurale chez les embryons mutants, les cellules de crête neurale issues de r6 participant notamment à la formation du nerf IX (pour revue, Cordes, 2001). *Krox20* et les *Nab* sont exprimés dans les cellules de crête neurale dérivant du rhombomère r5, ces cellules se joignant au flux des cellules issues de r6. Des études de lignage cellulaire menées en utilisant les souris *Krox20*^{Cre/+} croisées à des lignées conditionnelles rapportrices suggèrent que *Krox20* est exprimé au moins transitoirement dans des cellules participant à la formation du nerf IX (Voiculescu et al., 2001), particulièrement touché dans notre modèle.

Afin de visualiser les cellules de crête neurale de façon globale, nous avons réalisé des marquages par hybridation *in situ* de l'expression du gène *id2*, exprimé par ces cellules et

impliqué dans le contrôle de leur prolifération et de leur différenciation. Aucune anomalie particulière de l'expression de ce gène n'a été détectée chez les embryons mutants. Nous avons également observé spécifiquement les cellules de crête neurale dérivées de r5 en suivant l'expression du gène *Krox20* et là encore aucune altération particulière n'a été détectée. Ces données, bien que préliminaires, suggèrent qu'il n'y a pas d'altération majeure de la formation et la migration des cellules de crête neurale chez les embryons *Krox20*^{I268F/I268F}, la fusion des nerfs crâniens observées dépendant probablement d'un autre processus.

Une étude que j'ai récemment menée en collaboration avec Piotr Topilko apporte des résultats intéressants. Nous avons en effet reproduit les défauts de nerfs crâniens observés chez les souris *Krox20*^{I268F} et *Krox20*^{-/-} en croisant des souris HTPA-Cre, exprimant la Cre recombinase dans toutes les cellules dérivées de cellules de crête neurale avec la lignée KGDT. Cette lignée contient le gène codant la toxine diphtérique au niveau du locus *Krox20* et conduit à la production de cette toxine tuant les cellules qui expriment *Krox20*, après recombinaison de cet allèle par la Cre. Les cellules affectées dans ce croisement à 10,5 jpc correspondent aux cellules de crête neurale exprimant *Krox20* et à une population cellulaire particulière, nommée cellules de capsule frontière (notées BCC, pour Boundary Cap Cells), qui dérivent de cellules de crête neurale et qui expriment les gènes *Krox20* et *Nab* à partir de 10 jpc environ. Plusieurs pistes d'étude visant à caractériser le rôle éventuel des BCC dans les défauts observés au niveau des crâniens sont développées dans le paragraphe suivant.

2.2.3. Les fusions des nerfs crâniens pourraient être liées à une altération de fonction des cellules de capsule frontière

Les cellules de capsule frontière (BCC) sont de petits groupes de cellules gliales localisées aux points de sortie et d'entrée des racines dorsales et ventrales des nerfs au niveau du tube neural. Elles participent à la formation d'une partie des cellules gliales et neuronales du SNP. De plus, en leur absence, on observe une sortie des corps cellulaires des motoneurones hors du tube neural (Maro et al., 2004; Vermeren et al., 2003). La fonction de *Krox20* dans ces cellules reste inconnue à ce jour, mais diverses données étayent l'hypothèse de l'intervention de l'altération de la fonction des BCC dans la fusion des nerfs observées chez les embryons mutants pour *Krox20*. En effet, chez les mutants *Krox20*^{-/-}, les populations de cellules de capsule frontière associées aux racines des nerfs qui sont par la suite fusionnées sont elles-même regroupées de façon anormale (Schneider-Maunoury et al., 1993). Il semble par ailleurs que les BCC atteignent les futurs points de sortie des nerfs avant les afférences sensorielles et la sortie des nerfs moteurs (Altman and Bayer, 1982; Niederlander and Lumsden, 1996), suggérant un rôle dans l'attraction des axones vers ces points de sortie et d'entrée, ces sites semblant définis par des signaux émis par le tube neural. Chez la drosophile, la localisation des

cellules gliales du SNP préfigure également les points de sortie des axones moteurs le long du SNC et l'ablation de ces cellules gliales a montré qu'elles étaient requises pour le positionnement correct de ces points de sortie (Sepp et al., 2001). Les BCC pourraient jouer un rôle dans le guidage axonal, des études menées au niveau du rhombomère r5 montrant que les axones du nerf VII (facial) semblent guidés par des informations agissant à longue distance plutôt que par des signaux locaux, leur migration vers leur point de sortie n'étant pas altérée en cas d'inversion rostro-caudale du rhombomère r5 (Guthrie and Lumsden, 1992). De plus, des études *in vitro* suggèrent que les axones de neurones sensoriels cultivés sur des tranches de moelle épinière croissent préférentiellement en direction des BCC (Guthrie and Lumsden, 1992).

L'altération d'une fonction des BCC au niveau de la formation des nerfs crâniens chez les embryons mutants pour *Krox20* pourrait être liée à l'activité de *Krox20* au sein de ces cellules. Cependant, une dérégulation d'un signal émis sous le contrôle de *Krox20* au niveau de r3 et r5 permettant la localisation correcte des cellules BCC au niveau des futurs points de sortie des nerfs VII/VIII et IX est également envisageable. Afin de vérifier si la mutation de *Krox20* a un impact sur la fonction des BCC et notamment leur pouvoir attractant sur les axones, on pourrait réitérer les manipulations effectuées par Golding et Cohen en utilisant des neurones sensoriels issus de souris sauvages cultivés sur des tranches de moelle épinière prélevées chez des embryons *Krox20*^{-/-} ou *Krox20*^{I268F/I268F} et ayant conservées les racines des nerfs portant les BCC. Par ailleurs, des études menées au laboratoire ont permis de caractériser différents gènes exprimés spécifiquement dans les BCC. La construction de lignées contenant le gène Cre inséré au niveau du locus de ces gènes est en cours au laboratoire afin de réaliser des études de lignage cellulaire des BCC par croisement avec des lignées rapportrices conditionnelles (Fanny Couplier, communication personnelle). Il serait particulièrement intéressant de croiser ces lignées Cre avec la lignée KGDT afin d'éliminer spécifiquement les cellules de BCC, qui expriment *Krox20*. Cette étude pourrait permettre de conclure quant à l'implication des BCC dans les défauts des nerfs crâniens observés chez les embryons mutants pour *Krox20*.

L'altération de l'organisation des nerfs crâniens, et notamment la fusion du nerf IX et du nerf X, pourraient conduire à une perturbation de leur fonction chez les animaux mutants. Ainsi, la perte de poids rapide observée chez les animaux mutants pourrait être provoquée par des défauts de prise alimentaire en cas d'anomalie du nerf IX, impliqué dans la déglutition. De plus, l'altération du nerf X pourrait entre autre conduire à des défauts des rythmes cardiaque et respiratoire, processus dans lesquels il joue un rôle régulateur important.

3. Rôle de l'interaction entre facteurs Krox/Egr et Nab dans différents systèmes

3.1. Les Nab sont exprimés sous le contrôle de Krox20 et d'autres Egr

Au cours de ma thèse, je me suis particulièrement intéressée au rôle de l'interaction entre Krox20 et les facteurs Nab. Comme cela est présenté dans l'article 1, les facteurs Nab sont exprimés sous le contrôle de Krox20 au niveau du rhombencéphale. En effet, le gène *Nab* endogène est exprimé dans les rhombomères r3 et r5 chez l'embryon de poulet et est fortement activé ectopiquement sans restriction le long du tube neural après surexpression de *Krox20* par électroporation. Ces résultats concordent avec ceux obtenus chez l'embryon de souris (Mechta-Grigoriou et al., 2000). Les gènes *Nab* sont en effet exprimés également au niveau de r3 et r5, l'expression du gène *Nab2* suivant fidèlement celle de *Krox20*, tandis que celle de *Nab1* apparaît de façon légèrement décalée dans le temps. De plus, l'absence d'expression de *Krox20* chez les embryons de souris *Krox20*^{-/-} conduit à la perte d'expression des gènes *Nab*. *Krox20* induit également les *Nab* dans des cultures de cellules de Schwann (Le et al., 2005b). D'autres Egr sont par ailleurs connus pour activer les *Nab* dans de nombreux types cellulaires (Kumbrink et al., 2005; Laslo et al., 2006; Lawson et al., 2007). Il a par ailleurs été montré que cette activation est directe dans le cas de l'induction du gène *Nab2* par *Egr1*, ce facteur se liant à divers sites au niveau du promoteur du gène *Nab2* humain et activant ce promoteur *in vitro* (Kumbrink et al., 2005).

3.2. Les Nab sont impliqués dans une boucle de régulation négative

Les études menées *in vivo* par surexpression des Nab ou de la protéine *Krox20*^{I268F} chez l'embryon de poulet (article 1) suggèrent un rôle répresseur des Nab sur les activités inductrices de *Krox20* au niveau du rhombencéphale, confirmant les résultats observés précédemment par surexpression des Nab chez le poisson-zèbre (Mechta-Grigoriou et al., 2000).

Afin d'étudier plus finement le rôle de l'implication de l'interaction de *Krox20* avec les facteurs Nab au niveau de la régulation de ses cibles transcriptionnelles dans le rhombencéphale, j'ai développé au cours de ma thèse deux approches visant à provoquer une perte de fonction du gène *Nab* endogène. La première approche testée a consisté en l'utilisation de la technique d'interférence ARN chez l'embryon de poulet. Cette technique repose sur la production de petits ARN doubles brins, qui recrutent au niveau des ARNm dont ils sont spécifiques des complexes protéiques de dégradation et induisent ainsi l'élimination de ces ARNm. L'électroporation d'un plasmide contenant une séquence codant des siRNA spécifiques de *Nab* s'est révélé être un outil efficace pour réprimer l'expression de l'ARNm de *Nab* dans le rhombencéphale, mais aucun effet n'a été observé sur l'expression de *Krox20* et d'*EphA4*. De même, l'expression de siRNA dirigés contre l'ARNm de *Krox20* n'induit pas de

d'*EphA4*, mais n'est pas nécessaire au maintien de son expression à ce stade de développement. La seconde approche testée en parallèle a consisté à exprimer des variants dominant-négatifs des protéines Nab1 et 2 de souris portant une mutation précédemment décrite comme bloquant l'interaction entre ces facteurs et Krox20, mais également comme séquestrant les protéines Nab normales via le domaine NCD1, impliqué dans leur capacité à se multimériser (Svaren et al., 1998). Cette approche a conduit à une très forte activation du gène *Nab* endogène et à une répression des gènes *Krox20* et *EphA4*, l'activité Nab endogène induite débordant probablement l'activité des facteurs dominant-négatifs. Ces résultats nous ont permis de montrer la sensibilité de la boucle de régulation négative à l'activité de la protéine Krox20 et à sa répression par l'interaction entre Krox20 et les Nab, mais n'a pas permis de démontrer un rôle de l'interaction Krox20-Nab sur les cibles étudiées à ce stade de développement excepté pour la régulation du gène *Nab* lui-même.

L'essentiel des études menées pour étudier le rôle de l'interaction entre les facteurs Egr et les facteurs Nab repose sur des expériences de co-transfections cellulaires des facteurs impliqués, sous des formes sauvages ou mutées. Ces études ont essentiellement permis d'établir le rôle des Nab comme répresseur de l'activité des Egr (Qu et al., 1998; Russo et al., 1995; Swirnoff et al., 1998). Cependant, elles impliquent la production de doses massives des facteurs surexprimés, qui pourraient perturber l'effet normal de l'interaction Egr-Nab en modifiant les taux relatifs de ces facteurs. Des études récentes ont en effet suggéré que ces taux relatifs jouent un rôle fonctionnel important dans les contextes où les facteurs Nab possèdent un rôle antagoniste des Egr (Lawson et al., 2007; Lucerna et al., 2003).

Cependant, le rôle répresseur de cette interaction a été confirmé dans certaines des études réalisées par expression d'Egr portant la mutation abolissant leur capacité à interagir avec les Nab, montrant que ces formes mutées ont une activité transcriptionnelle renforcée (Russo et al., 1993; Russo et al., 1995; Warner et al., 1998). De plus, l'expression des gènes *Nab* est renforcée de façon dose dépendante en présence de l'allèle muté *Krox20*^{I268F} endogène dans notre modèle murin, et l'extinction de Krox20 est légèrement retardée. La mutation I268F ne conduit donc pas à une perte de fonction, mais plutôt à un renforcement de l'activité de Krox20.

Krox20, et plus généralement les Egr, pourraient donc induire une boucle d'autorégulation négative de leur activité en activant l'expression des *Nab*. Cette boucle d'autorégulation négative permet probablement d'éviter des effets délétaires en cas de suractivité des Egr. Une suractivation d'Egr1 et une perte de l'expression de Nab2 sont ainsi fréquemment retrouvées dans des cas de carcinomes de la prostate chez l'homme, suggérant qu'une suractivité d'Egr1 est associée à l'évolution de cette pathologie (Abdulkadir, 2005; Abdulkadir et al., 2001). Cette boucle d'autorégulation paraît également pouvoir piloter une

extinction de l'expression des *Egr* (article 2), un arrêt de l'expression des gènes induits par les *Egr* (Lucerna et al., 2003), de même qu'être impliqués dans des activités cycliques reposant sur les taux relatifs d'*Egr* et des *Nab* (Lawson et al., 2007).

D'autres facteurs de transcription impliqués dans le développement du système nerveux présentent également des boucles d'autorégulation négative, suggérant que ce mécanisme est relativement courant pour réguler finement l'activité d'acteurs majeurs du développement. Ainsi, le facteur de transcription *Mash1* s'autorégule négativement de manière indirecte, possiblement via une induction des facteurs bHLH répresseurs *Hes* (Kageyama and Ohtsuka, 1999; Meredith and Johnson, 2000). De plus, les protéines *Hes*, jouant notamment un rôle majeur dans la voie Notch, s'autorégulent négativement par liaison directe au niveau de leurs séquences régulatrices.

Il est cependant intéressant de noter que les *Nab* jouent un rôle prépondérant dans les cellules de Schwann, où il ne semble pas exister de boucle d'autorégulation directe de *Krox20*, suggérant que l'interaction entre *Krox20* et les *Nab* a pu acquérir de nouvelles fonctions majeures en l'absence de leur rôle de régulateur négatif du taux d'expression de *Krox20*.

3.3. Les *Nab* jouent également un rôle d'agonistes de *Krox20* et des *Egr*

Les résultats obtenus lors de notre étude sur le rôle de l'interaction entre *Krox20* et les *Nab* durant la différenciation des cellules de Schwann renforce l'hypothèse d'un rôle agoniste de *Krox20* et *Nab* dans ce système, comme cela avait été proposé précédemment lors de l'étude des doubles mutants *Nab* (Le et al., 2005b). La perte de l'interaction entre *Krox20* et les *Nab* induit en effet un processus d'hypomyélinisation, phénotype comparable, bien que moins sévère, à celui observé en l'absence de *Krox20* dans les cellules de Schwann. Cette activité agoniste pourrait alors être liée à un rôle de co-activateur de *Krox20* pour des cibles codant des facteurs favorisant la myélinisation et/ou de co-répresseur pour des cibles codant des facteurs favorisant l'état immature proliféraif des cellules de Schwann. Les *Nab* ont déjà été décrits comme pouvant avoir un rôle agoniste de co-activateurs des *Egr* pour l'activation du promoteur de l'hormone lutéinisante (LH) et du promoteur d'IL-2 (Collins et al., 2006; Sevetson et al., 2000) ou de co-répresseurs des *Egr* (Laslo et al., 2006; Wang et al., 2005) lors d'études menées dans des cultures cellulaires, suggérant effectivement l'existence de fonctions diverses pour cette interaction.

Une hypothèse a été avancée quant au mécanisme lié au rôle de co-activateur des *Nab* (Sevetson et al., 2000). Elle est basée sur l'observation que dans le cas du promoteur de l'hormone lutéinisante (LH) co-activé par *Egr1* et *Nab*, le nombre de sites de liaison d'*Egr1* est restreint, un nombre élevé de sites étant plutôt associé à une co-répression. Ceci pourrait notamment reposer sur l'interaction entre les *Nab* et le complexe transcriptionnel. Dans le cas

notamment reposer sur l'interaction entre les Nab et le complexe transcriptionnel. Dans le cas du promoteur de la LH, un faible nombre de protéines Nab recruterait le complexe transcriptionnel au niveau du promoteur, promouvant ainsi la transcription. Dans le second cas, le taux de fixation des complexes Egr-Nab serait renforcé en raison du plus grand nombre de sites de liaison à l'ADN, et la présence d'une plus grande quantité de facteurs Nab conduirait à un recrutement, puis à une séquestration du complexe transcriptionnel. Le fait qu'un seul site de liaison des Egr ait été caractérisé au niveau de la séquence régulatrice d'IL2, gène co-activé par Egr1 et les Nab dans les lymphocytes T, semble renforcer cette hypothèse (Collins et al., 2006). Il a cependant été récemment montré que la régulation du gène codant la LH repose sur un mécanisme complexe d'accumulation des Egr et des Nab (Lawson et al., 2007), suggérant que les processus contrôlant le caractère de l'interaction Egr-Nab repose également sur le taux relatif de ces facteurs. Il est également intéressant de noter qu'Egr1 et Nab activent IL-2, favorisant la fonction des cellules T, dans un contexte où Egr2 et Egr3 sont également exprimés et jouent un rôle antagoniste à celui d'Egr1 en anergisant ces cellules (Collins et al., 2006; Safford et al., 2005). Il serait donc intéressant de caractériser le rôle de l'interaction des Nab et d'Egr2 et Egr3 dans ces types cellulaires, afin de vérifier si elle joue un rôle dans les effets antagonistes des Egr dans les cellules T et dans l'équilibre de leurs activités respectives.

Les Nab pourraient également jouer le rôle de co-répresseur de Krox20 au niveau de cibles que ce facteur pourrait réprimer directement lors de la différenciation des cellules de Schwann. Ce mécanisme pourrait notamment impliquer le mécanisme de recrutement de CHD4 par les Nab, conduisant à des modifications chromatinienne limitant la transcription (Srinivasan et al., 2006). Caractériser de nouvelles cibles directes de Krox20 au niveau des cellules de Schwann semble nécessaire pour permettre de conclure quant au rôle de l'interaction entre Krox20 et les Nab. On pourrait notamment chercher à caractériser de nouvelles zones d'interaction de Krox20 avec l'ADN par une approche de ChIP on chip, cette technique pouvant permettre de caractériser rapidement un grand nombre de sites d'interaction d'un facteur de transcription au niveau du génome. Des approches par recherche *in silico* de sites de liaison potentiels dans les régions de l'ADN jouxtant des cibles putatives de Krox20 pourraient également être de bonnes approches préliminaires à la caractérisation de nouvelles cibles directes de Krox20 dans les cellules de Schwann. Cette stratégie repose notamment sur la recherche de sites reproduisant l'agencement type de sites fonctionnels caractérisés précédemment au niveau des séquences régulatrices de cibles directes de Krox20. Ainsi, on pourrait rechercher pour les cibles exprimées au niveau des cellules de Schwann, des motifs de liaison voisins pour Krox20 et Sox10, ces facteurs semblant souvent agir en synergie dans ce type cellulaire.

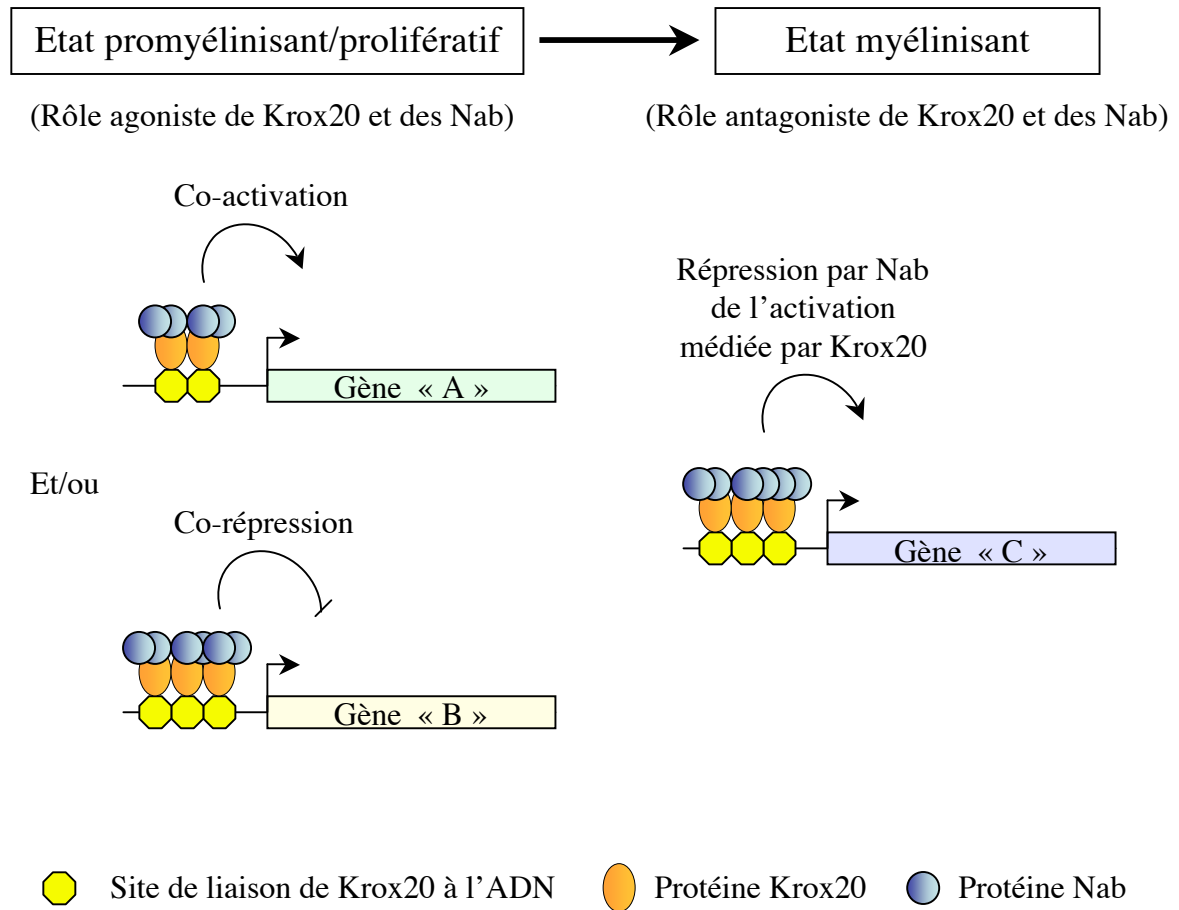


Figure 42 : Modèle du rôle de l'interaction entre Krox20 et Nab lors du processus de différenciation des cellules de Schwann

Dans le modèle présenté, l'interaction entre Krox20 et les Nab aurait tout d'abord un rôle agoniste permettant la transition entre état immature et état myélinisant pour les cellules de Schwann, par co-activation de cibles favorisant l'état myélinisant (gènes « A ») et/ou co-répression de marqueurs de cellules indifférenciées ou immatures, favorisant notamment un état prolifératif (gènes « B »). Des cibles de répression directe par Krox20 pourraient exister parmi les gènes *Id*, *Oct6*, *Foxd3* ou *Sox2*. Dans un second temps, une fois le processus de myélinisation active engagé, les Nab joueraient plutôt leur rôle traditionnel de régulateur négatif de l'activité de Krox20, comme cela semble être le cas pour le gène *Mpz* et le gène de la *Périaxine* (gènes « C »).

Cependant, les Nab semblent pouvoir également être des antagonistes de l'activité de Krox20 au niveau de ses cibles directes codant des protéines de myéline, telles *Mpz* ou *Prx*, la surexpression de Nab limitant leur activation par Krox20 (LeBlanc et al., 2006; Parkinson et al., 2003). Un modèle de l'activité de l'interaction de Krox20 et des Nab pourrait donc être une première phase où ces facteurs joueraient un rôle agoniste précocement, permettant l'arrêt de la prolifération et le passage de l'état pro-myélinisant à myélinisant. Durant la phase de myélinisation, les Nab joueraient plutôt un rôle antagoniste de celui de Krox20, assurant ainsi une régulation de son activité (figure 42).

CONCLUSION

Les travaux effectués au cours de ma thèse renforcent l'idée d'une grande complexité des mécanismes de régulation pilotés par Krox20 au cours du développement du rhombencéphale et du processus de myélinisation du système nerveux périphérique. La poursuite des études moléculaires commencées dans ces travaux pourrait permettre de vérifier si l'activité de Krox20 repose également sur les différents domaines caractérisés au cours de notre étude et si cette activité est régulée par les mêmes co-facteurs dans d'autres systèmes que le rhombencéphale. Les résultats obtenus quant aux cofacteurs de Krox20, notamment HCF-1 et Nab, suggèrent en effet un rôle majeur de ces protéines dans la régulation de l'activité de Krox20. Il serait intéressant de mener une étude détaillée du rôle d'HCF-1 dans d'autres systèmes exprimant Krox20 ou d'autres Egr, les facteurs Egr1 et Egr3 contenant notamment des sites d'interaction potentiels avec HCF-1, afin de déterminer s'il existe d'autres rôles physiologiques à cette interaction ou si elle est spécifique du rhombencéphale.

Enfin, nos données et celles précédemment publiées montrent un rôle déterminant de l'interaction entre les Egr et les Nab, pouvant conduire à diverses pathologies chez l'humain. Le modèle murin de CMT que nous avons développé pourrait s'avérer très utile à la compréhension des mécanismes moléculaires précis impliqués dans cette forme de pathologie particulièrement grave.

REFERENCES

- Aamar, E. and Frank, D. (2004) *Xenopus* Meis3 protein forms a hindbrain-inducing center by activating FGF/MAP kinase and PCP pathways. *Development* 131, 153-63.
- Abdulkadir, S.A. (2005) Mechanisms of prostate tumorigenesis: roles for transcription factors Nkx3.1 and Egr1. *Ann N Y Acad Sci* 1059, 33-40.
- Abdulkadir, S.A., Carbone, J.M., Naughton, C.K., Humphrey, P.A., Catalona, W.J. and Milbrandt, J. (2001) Frequent and early loss of the EGR1 corepressor NAB2 in human prostate carcinoma. *Hum Pathol* 32, 935-9.
- Abraham, S.E., Lobo, S., Yaciuk, P., Wang, H.G. and Moran, E. (1993) p300, and p300-associated proteins, are components of TATA-binding protein (TBP) complexes. *Oncogene* 8, 1639-47.
- Abu-Abed, S., Dolle, P., Metzger, D., Beckett, B., Chambon, P. and Petkovich, M. (2001) The retinoic acid-metabolizing enzyme, CYP26A1, is essential for normal hindbrain patterning, vertebral identity, and development of posterior structures. *Genes Dev* 15, 226-40.
- Adlkofer, K., Frei, R., Neuberger, D.H., Zielasek, J., Toyka, K.V. and Suter, U. (1997a) Heterozygous peripheral myelin protein 22-deficient mice are affected by a progressive demyelinating tomaculous neuropathy. *J Neurosci* 17, 4662-71.
- Adlkofer, K., Martini, R., Aguzzi, A., Zielasek, J., Toyka, K.V. and Suter, U. (1995) Hypermyelination and demyelinating peripheral neuropathy in *Pmp22*-deficient mice. *Nat Genet* 11, 274-80.
- Adlkofer, K., Naef, R. and Suter, U. (1997b) Analysis of compound heterozygous mice reveals that the Trembler mutation can behave as a gain-of-function allele. *J Neurosci Res* 49, 671-80.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2002) *Molecular Biology of the Cell*, Garland Science
- Alexandre, D., Clarke, J.D., Oxtoby, E., Yan, Y.L., Jowett, T. and Holder, N. (1996) Ectopic expression of *Hoxa-1* in the zebrafish alters the fate of the mandibular arch neural crest and phenocopies a retinoic acid-induced phenotype. *Development* 122, 735-46.
- Alexandre, P., Bachy, I., Marcou, M. and Wassef, M. (2006) Positive and negative regulations by FGF8 contribute to midbrain roof plate developmental plasticity. *Development* 133, 2905-13.
- Altevogt, B.M., Kleopa, K.A., Postma, F.R., Scherer, S.S. and Paul, D.L. (2002) Connexin29 is uniquely distributed within myelinating glial cells of the central and peripheral nervous systems. *J Neurosci* 22, 6458-70.
- Altman, J. and Bayer, S.A. (1982) Development of the cranial nerve ganglia and related nuclei in the rat. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 74, 1-90.
- Alvarez-Bolado, G., Rosenfeld, M.G. and Swanson, L.W. (1995) Model of forebrain regionalization based on spatiotemporal patterns of POU-III homeobox gene expression, birthdates, and morphological features. *J Comp Neurol* 355, 237-95.
- Amici, S.A., Dunn, W.A., Jr., Murphy, A.J., Adams, N.C., Gale, N.W., Valenzuela, D.M., Yancopoulos, G.D. and Notterpek, L. (2006) Peripheral myelin protein 22 is in complex with $\alpha 6 \beta 4$ integrin, and its absence alters the Schwann cell basal lamina. *J Neurosci* 26, 1179-89.
- Amiguet, P., Gardinier, M.V., Zanetta, J.P. and Matthieu, J.M. (1992) Purification and partial structural and functional characterization of mouse myelin/oligodendrocyte glycoprotein. *J Neurochem* 58, 1676-82.
- Amoyel, M., Cheng, Y.C., Jiang, Y.J. and Wilkinson, D.G. (2005) Wnt1 regulates neurogenesis and mediates lateral inhibition of boundary cell specification in the zebrafish hindbrain. *Development* 132, 775-85.
- Ang, S.L. and Rossant, J. (1994) HNF-3 beta is essential for node and notochord formation in mouse development. *Cell* 78, 561-74.

- Arroyo, E.J., Bermingham, J.R., Jr., Rosenfeld, M.G. and Scherer, S.S. (1998) Promyelinating Schwann cells express Tst-1/SCIP/Oct-6. *J Neurosci* 18, 7891-902.
- Arroyo, E.J. and Scherer, S.S. (2000) On the molecular architecture of myelinated fibers. *Histochem Cell Biol* 113, 1-18.
- Arroyo, E.J., Xu, T., Poliak, S., Watson, M., Peles, E. and Scherer, S.S. (2001) Internodal specializations of myelinated axons in the central nervous system. *Cell Tissue Res* 305, 53-66.
- Arroyo, E.J., Xu, Y.T., Zhou, L., Messing, A., Peles, E., Chiu, S.Y. and Scherer, S.S. (1999) Myelinating Schwann cells determine the internodal localization of Kv1.1, Kv1.2, Kvbeta2, and Caspr. *J Neurocytol* 28, 333-47.
- Arthur-Farraj, P., Mirsky, R., Parkinson, D.B. and Jessen, K.R. (2006) A double point mutation in the DNA-binding region of Egr2 switches its function from inhibition to induction of proliferation: A potential contribution to the development of congenital hypomyelinating neuropathy. *Neurobiol Dis* 24, 159-69.
- Atanasoski, S., Notterpek, L., Lee, H.Y., Castagner, F., Young, P., Ehrenguber, M.U., Meijer, D., Sommer, L., Stavnezer, E., Colmenares, C. and Suter, U. (2004) The protooncogene Ski controls Schwann cell proliferation and myelination. *Neuron* 43, 499-511.
- Bajestan, S.N., Umehara, F., Shirahama, Y., Itoh, K., Sharghi-Namini, S., Jessen, K.R., Mirsky, R. and Osame, M. (2006) Desert hedgehog-patched 2 expression in peripheral nerves during Wallerian degeneration and regeneration. *J Neurobiol* 66, 243-55.
- Baker, J.C., Beddington, R.S. and Harland, R.M. (1999) Wnt signaling in *Xenopus* embryos inhibits bmp4 expression and activates neural development. *Genes Dev* 13, 3149-59.
- Banerjee, S., Pillai, A.M., Paik, R., Li, J. and Bhat, M.A. (2006a) Axonal ensheathment and septate junction formation in the peripheral nervous system of *Drosophila*. *J Neurosci* 26, 3319-29.
- Banerjee, S., Sousa, A.D. and Bhat, M.A. (2006b) Organization and function of septate junctions: an evolutionary perspective. *Cell Biochem Biophys* 46, 65-77.
- Barbacci, E., Reber, M., Ott, M.O., Breillat, C., Huetz, F. and Cereghini, S. (1999) Variant hepatocyte nuclear factor 1 is required for visceral endoderm specification. *Development* 126, 4795-805.
- Baron, P., Shy, M., Kamholz, J., Scarlato, G. and Pleasure, D. (1994) Expression of P0 protein mRNA along rat sciatic nerve during development. *Brain Res Dev Brain Res* 83, 285-8.
- Bastien, J. and Rochette-Egly, C. (2004) Nuclear retinoid receptors and the transcription of retinoid-target genes. *Gene* 328, 1-16.
- Baumgartner, S., Littleton, J.T., Broadie, K., Bhat, M.A., Harbecke, R., Lengyel, J.A., Chiquet-Ehrismann, R., Prokop, A. and Bellen, H.J. (1996) A *Drosophila* neurexin is required for septate junction and blood-nerve barrier formation and function. *Cell* 87, 1059-68.
- Becker, N., Seitanidou, T., Murphy, P., Mattei, M.G., Topilko, P., Nieto, M.A., Wilkinson, D.G., Charnay, P. and Gilardi-Hebenstreit, P. (1994) Several receptor tyrosine kinase genes of the Eph family are segmentally expressed in the developing hindbrain. *Mech Dev* 47, 3-17.
- Beddington, R.S. (1994) Induction of a second neural axis by the mouse node. *Development* 120, 613-20.
- Begemann, G., Marx, M., Mebus, K., Meyer, A. and Bastmeyer, M. (2004) Beyond the neckless phenotype: influence of reduced retinoic acid signaling on motor neuron development in the zebrafish hindbrain. *Dev Biol* 271, 119-29.
- Begemann, G., Schilling, T.F., Rauch, G.J., Geisler, R. and Ingham, P.W. (2001) The zebrafish neckless mutation reveals a requirement for raldh2 in mesodermal signals that pattern the hindbrain. *Development* 128, 3081-94.

- Bell, E., Wingate, R.J. and Lumsden, A. (1999) Homeotic transformation of rhombomere identity after localized *Hoxb1* misexpression. *Science* 284, 2168-71.
- Bellen, H.J., Lu, Y., Beckstead, R. and Bhat, M.A. (1998) Neurexin IV, caspr and paranodin--novel members of the neurexin family: encounters of axons and glia. *Trends Neurosci* 21, 444-9.
- Bellone, E., Di Maria, E., Soriani, S., Varese, A., Doria, L.L., Ajmar, F. and Mandich, P. (1999) A novel mutation (D305V) in the early growth response 2 gene is associated with severe Charcot-Marie-Tooth type 1 disease. *Hum Mutat* 14, 353-4.
- Bergemann, A.D., Cheng, H.J., Brambilla, R., Klein, R. and Flanagan, J.G. (1995) ELF-2, a new member of the Eph ligand family, is segmentally expressed in mouse embryos in the region of the hindbrain and newly forming somites. *Mol Cell Biol* 15, 4921-9.
- Bermingham, J.R., Jr., Scherer, S.S., O'Connell, S., Arroyo, E., Kalla, K.A., Powell, F.L. and Rosenfeld, M.G. (1996) *Tst-1/Oct-6/SCIP* regulates a unique step in peripheral myelination and is required for normal respiration. *Genes Dev* 10, 1751-62.
- Bermingham, J.R., Jr., Shearin, H., Pennington, J., O'Moore, J., Jaegle, M., Driegen, S., van Zon, A., Darbas, A., Ozkaynak, E., Ryu, E.J., Milbrandt, J. and Meijer, D. (2006) The claw paw mutation reveals a role for *Lgi4* in peripheral nerve development. *Nat Neurosci* 9, 76-84.
- Berthelsen, J., Zappavigna, V., Ferretti, E., Mavilio, F. and Blasi, F. (1998) The novel homeoprotein *Prep1* modulates *Pbx-Hox* protein cooperativity. *Embo J* 17, 1434-45.
- Berthold, C.H. and Rydmark, M. (1983) Electron microscopic serial section analysis of nodes of Ranvier in lumbosacral spinal roots of the cat: ultrastructural organization of nodal compartments in fibres of different sizes. *J Neurocytol* 12, 475-505.
- Bertrand, N., Castro, D.S. and Guillemot, F. (2002) Proneural genes and the specification of neural cell types. *Nat Rev Neurosci* 3, 517-30.
- Bhat, M.A., Rios, J.C., Lu, Y., Garcia-Fresco, G.P., Ching, W., St Martin, M., Li, J., Einheber, S., Chesler, M., Rosenbluth, J., Salzer, J.L. and Bellen, H.J. (2001) Axon-glia interactions and the domain organization of myelinated axons requires neurexin IV/Caspr/Paranodin. *Neuron* 30, 369-83.
- Birgbauer, E. and Fraser, S.E. (1994) Violation of cell lineage restriction compartments in the chick hindbrain. *Development* 120, 1347-56.
- Birgbauer, E., Sechrist, J., Bronner-Fraser, M. and Fraser, S. (1995) Rhombomeric origin and rostrocaudal reassortment of neural crest cells revealed by intravital microscopy. *Development* 121, 935-45.
- Bjartmar, C., Yin, X. and Trapp, B.D. (1999) Axonal pathology in myelin disorders. *J Neurocytol* 28, 383-95.
- Blak, A.A., Naserke, T., Weisenhorn, D.M., Prakash, N., Partanen, J. and Wurst, W. (2005) Expression of *Fgf* receptors 1, 2, and 3 in the developing mid- and hindbrain of the mouse. *Dev Dyn* 233, 1023-30.
- Blanchard, A.D., Sinanan, A., Parmantier, E., Zwart, R., Broos, L., Meijer, D., Meier, C., Jessen, K.R. and Mirsky, R. (1996) *Oct-6 (SCIP/Tst-1)* is expressed in Schwann cell precursors, embryonic Schwann cells, and postnatal myelinating Schwann cells: comparison with *Oct-1*, *Krox-20*, and *Pax-3*. *J Neurosci Res* 46, 630-40.
- Boerkoel, C.F., Takashima, H., Stankiewicz, P., Garcia, C.A., Leber, S.M., Rhee-Morris, L. and Lupski, J.R. (2001) *Periaxin* mutations cause recessive Dejerine-Sottas neuropathy. *Am J Hum Genet* 68, 325-33.
- Bondurand, N., Girard, M., Pingault, V., Lemort, N., Dubourg, O. and Goossens, M. (2001) Human *Connexin 32*, a gap junction protein altered in the X-linked form of Charcot-Marie-Tooth disease, is directly regulated by the transcription factor *SOX10*. *Hum Mol Genet* 10, 2783-95.

- Bosio, A., Binczek, E. and Stoffel, W. (1996) Functional breakdown of the lipid bilayer of the myelin membrane in central and peripheral nervous system by disrupted galactocerebroside synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 13280-5.
- Bosio, A., Bussow, H., Adam, J. and Stoffel, W. (1998) Galactosphingolipids and axono-glial interaction in myelin of the central nervous system. *Cell Tissue Res* 292, 199-210.
- Bouillet, P., Chazaud, C., Oulad-Abdelghani, M., Dolle, P. and Chambon, P. (1995) Sequence and expression pattern of the *Stra7* (*Gbx-2*) homeobox-containing gene induced by retinoic acid in P19 embryonal carcinoma cells. *Dev Dyn* 204, 372-82.
- Bradley, L.C., Snape, A., Bhatt, S. and Wilkinson, D.G. (1993) The structure and expression of the *Xenopus* *Krox-20* gene: conserved and divergent patterns of expression in rhombomeres and neural crest. *Mech Dev* 40, 73-84.
- Braun, M.M., Etheridge, A., Bernard, A., Robertson, C.P. and Roelink, H. (2003) Wnt signaling is required at distinct stages of development for the induction of the posterior forebrain. *Development* 130, 5579-87.
- Brennan, A., Dean, C.H., Zhang, A.L., Cass, D.T., Mirsky, R. and Jessen, K.R. (2000) Endothelins control the timing of Schwann cell generation in vitro and in vivo. *Dev Biol* 227, 545-57.
- Brewster, R., Lee, J. and Ruiz i Altaba, A. (1998) *Gli/Zic* factors pattern the neural plate by defining domains of cell differentiation. *Nature* 393, 579-83.
- Briscoe, J., Chen, Y., Jessell, T.M. and Struhl, G. (2001) A hedgehog-insensitive form of patched provides evidence for direct long-range morphogen activity of sonic hedgehog in the neural tube. *Mol Cell* 7, 1279-91.
- Briscoe, J. and Ericson, J. (2001) Specification of neuronal fates in the ventral neural tube. *Curr Opin Neurobiol* 11, 43-9.
- Britsch, S., Goerich, D.E., Riethmacher, D., Peirano, R.I., Rossner, M., Nave, K.A., Birchmeier, C. and Wegner, M. (2001) The transcription factor *Sox10* is a key regulator of peripheral glial development. *Genes Dev* 15, 66-78.
- Broccoli, V., Boncinelli, E. and Wurst, W. (1999) The caudal limit of *Otx2* expression positions the isthmus organizer. *Nature* 401, 164-8.
- Bronner-Fraser, M. (1994) Neural crest cell formation and migration in the developing embryo. *Faseb J* 8, 699-706.
- Brunet, J.F. and Pattyn, A. (2002) *Phox2* genes - from patterning to connectivity. *Curr Opin Genet Dev* 12, 435-40.
- Bullock, T.H., Moore, J.K. and Fields, R.D. (1984) Evolution of myelin sheaths: both lamprey and hagfish lack myelin. *Neurosci Lett* 48, 145-8.
- Bunge, R.P. (1993) Expanding roles for the Schwann cell: ensheathment, myelination, trophism and regeneration. *Curr Opin Neurobiol* 3, 805-9.
- Bunge, R.P., Bunge, M.B. and Bates, M. (1989) Movements of the Schwann cell nucleus implicate progression of the inner (axon-related) Schwann cell process during myelination. *J Cell Biol* 109, 273-84.
- Campos-Ortega, J.A. (1995) Genetic mechanisms of early neurogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Mol Neurobiol* 10, 75-89.
- Chan, J.R., Watkins, T.A., Cosgaya, J.M., Zhang, C., Chen, L., Reichardt, L.F., Shooter, E.M. and Barres, B.A. (2004) NGF controls axonal receptivity to myelination by Schwann cells or oligodendrocytes. *Neuron* 43, 183-91.
- Charles, P., Tait, S., Faivre-Sarrailh, C., Barbin, G., Gunn-Moore, F., Denisenko-Nehrbass, N., Guennoc, A.M., Girault, J.A., Brophy, P.J. and Lubetzki, C. (2002) Neurofascin is a glial receptor for the paranodin/Caspr-contactin axonal complex at the axoglial junction. *Curr Biol* 12, 217-20.

- Chavrier, P., Janssen-Timmen, U., Mattei, M.G., Zerial, M., Bravo, R. and Charnay, P. (1989) Structure, chromosome location, and expression of the mouse zinc finger gene Krox-20: multiple gene products and coregulation with the proto-oncogene c-fos. *Mol Cell Biol* 9, 787-97.
- Chavrier, P., Vesque, C., Galliot, B., Vigneron, M., Dolle, P., Duboule, D. and Charnay, P. (1990) The segment-specific gene Krox-20 encodes a transcription factor with binding sites in the promoter region of the Hox-1.4 gene. *Embo J* 9, 1209-18.
- Chavrier, P., Zerial, M., Lemaire, P., Almendral, J., Bravo, R. and Charnay, P. (1988) A gene encoding a protein with zinc fingers is activated during G0/G1 transition in cultured cells. *Embo J* 7, 29-35.
- Chen, S., Rio, C., Ji, R.R., Dikkes, P., Coggeshall, R.E., Woolf, C.J. and Corfas, G. (2003) Disruption of ErbB receptor signaling in adult non-myelinating Schwann cells causes progressive sensory loss. *Nat Neurosci* 6, 1186-93.
- Chen, Y., Pollet, N., Niehrs, C. and Pieler, T. (2001) Increased XRALDH2 activity has a posteriorizing effect on the central nervous system of *Xenopus* embryos. *Mech Dev* 101, 91-103.
- Cheng, C.W., Hui, C., Strahle, U. and Cheng, S.H. (2001) Identification and expression of zebrafish Iroquois homeobox gene *irx1*. *Dev Genes Evol* 211, 442-4.
- Cheng, H.J. and Flanagan, J.G. (1994) Identification and cloning of ELF-1, a developmentally expressed ligand for the Mek4 and Sek receptor tyrosine kinases. *Cell* 79, 157-68.
- Cheng, Y.C., Amoyel, M., Qiu, X., Jiang, Y.J., Xu, Q. and Wilkinson, D.G. (2004) Notch activation regulates the segregation and differentiation of rhombomere boundary cells in the zebrafish hindbrain. *Dev Cell* 6, 539-50.
- Chiang, C., Litingtung, Y., Lee, E., Young, K.E., Corden, J.L., Westphal, H. and Beachy, P.A. (1996) Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature* 383, 407-13.
- Ching, W., Zanazzi, G., Levinson, S.R. and Salzer, J.L. (1999) Clustering of neuronal sodium channels requires contact with myelinating Schwann cells. *J Neurocytol* 28, 295-301.
- Chiu, S.Y. and Ritchie, J.M. (1984) On the physiological role of internodal potassium channels and the security of conduction in myelinated nerve fibres. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 220, 415-22.
- Cho, E.A. and Dressler, G.R. (1998) TCF-4 binds beta-catenin and is expressed in distinct regions of the embryonic brain and limbs. *Mech Dev* 77, 9-18.
- Choe, S.K. and Sagerstrom, C.G. (2005) Variable Meis-dependence among paralog group-1 Hox proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 331, 1384-91.
- Choe, S.K., Vlachakis, N. and Sagerstrom, C.G. (2002) Meis family proteins are required for hindbrain development in the zebrafish. *Development* 129, 585-95.
- Chomette, D., Frain, M., Cereghini, S., Charnay, P. and Ghislain, J. (2006) Krox20 hindbrain cis-regulatory landscape: interplay between multiple long-range initiation and autoregulatory elements. *Development* 133, 1253-62.
- Clarke, J.D. and Lumsden, A. (1993) Segmental repetition of neuronal phenotype sets in the chick embryo hindbrain. *Development* 118, 151-62.
- Clements, M., Duncan, D. and Milbrandt, J. (2003) *Drosophila* NAB (dNAB) is an orphan transcriptional co-repressor required for correct CNS and eye development. *Dev Dyn* 226, 67-81.
- Coetzee, T., Fujita, N., Dupree, J., Shi, R., Blight, A., Suzuki, K., Suzuki, K. and Popko, B. (1996) Myelination in the absence of galactocerebroside and sulfatide: normal structure with abnormal function and regional instability. *Cell* 86, 209-19.

- Collins, S., Wolfrum, L.A., Drake, C.G., Horton, M.R. and Powell, J.D. (2006) Cutting Edge: TCR-induced NAB2 enhances T cell function by coactivating IL-2 transcription. *J Immunol* 177, 8301-5.
- Colman, D.R., Kreibich, G., Frey, A.B. and Sabatini, D.D. (1982) Synthesis and incorporation of myelin polypeptides into CNS myelin. *J Cell Biol* 95, 598-608.
- Conlon, R.A. and Rossant, J. (1992) Exogenous retinoic acid rapidly induces anterior ectopic expression of murine Hox-2 genes in vivo. *Development* 116, 357-68.
- Cooke, J.E., Kemp, H.A. and Moens, C.B. (2005) EphA4 is required for cell adhesion and rhombomere-boundary formation in the zebrafish. *Curr Biol* 15, 536-42.
- Cooke, J.E. and Moens, C.B. (2002) Boundary formation in the hindbrain: Eph only it were simple. *Trends Neurosci* 25, 260-7.
- Cordes, S.P. (2001) Molecular genetics of cranial nerve development in mouse. *Nat Rev Neurosci* 2, 611-23.
- Cordes, S.P. and Barsh, G.S. (1994) The mouse segmentation gene *kr* encodes a novel basic domain-leucine zipper transcription factor. *Cell* 79, 1025-34.
- Court, F.A., Sherman, D.L., Pratt, T., Garry, E.M., Ribchester, R.R., Cottrell, D.F., Fleetwood-Walker, S.M. and Brophy, P.J. (2004) Restricted growth of Schwann cells lacking Cajal bands slows conduction in myelinated nerves. *Nature* 431, 191-5.
- Crosby, S.D., Puetz, J.J., Simburger, K.S., Fahrner, T.J. and Milbrandt, J. (1991) The early response gene NGFI-C encodes a zinc finger transcriptional activator and is a member of the GCGGGGGCG (GSG) element-binding protein family. *Mol Cell Biol* 11, 3835-41.
- D'Amico-Martel, A. and Noden, D.M. (1983) Contributions of placodal and neural crest cells to avian cranial peripheral ganglia. *Am J Anat* 166, 445-68.
- D'Antonio, M., Droggiti, A., Feltri, M.L., Roes, J., Wrabetz, L., Mirsky, R. and Jessen, K.R. (2006) TGFbeta type II receptor signaling controls Schwann cell death and proliferation in developing nerves. *J Neurosci* 26, 8417-27.
- Darbas, A., Jaegle, M., Walbeehm, E., van den Burg, H., Driegen, S., Broos, L., Uyl, M., Visser, P., Grosveld, F. and Meijer, D. (2004) Cell autonomy of the mouse claw paw mutation. *Dev Biol* 272, 470-82.
- Davenne, M., Maconochie, M.K., Neun, R., Pattyn, A., Chambon, P., Krumlauf, R. and Rijli, F.M. (1999) Hoxa2 and Hoxb2 control dorsoventral patterns of neuronal development in the rostral hindbrain. *Neuron* 22, 677-91.
- de Waegh, S.M., Lee, V.M. and Brady, S.T. (1992) Local modulation of neurofilament phosphorylation, axonal caliber, and slow axonal transport by myelinating Schwann cells. *Cell* 68, 451-63.
- Decker, L., Desmarquet-Trin-Dinh, C., Taillebourg, E., Ghislain, J., Vallat, J.M. and Charnay, P. (2006) Peripheral myelin maintenance is a dynamic process requiring constant Krox20 expression. *J Neurosci* 26, 9771-9.
- Deflorian, G., Tiso, N., Ferretti, E., Meyer, D., Blasi, F., Bortolussi, M. and Argenton, F. (2004) Prep1.1 has essential genetic functions in hindbrain development and cranial neural crest cell differentiation. *Development* 131, 613-27.
- Devaux, J.J., Kleopa, K.A., Cooper, E.C. and Scherer, S.S. (2004) KCNQ2 is a nodal K⁺ channel. *J Neurosci* 24, 1236-44.
- Di Rocco, G., Gavalas, A., Popperl, H., Krumlauf, R., Mavilio, F. and Zappavigna, V. (2001) The recruitment of SOX/OCT complexes and the differential activity of HOXA1 and HOXB1 modulate the Hoxb1 auto-regulatory enhancer function. *J Biol Chem* 276, 20506-15.
- Di Rocco, G., Mavilio, F. and Zappavigna, V. (1997) Functional dissection of a transcriptionally active, target-specific Hox-Pbx complex. *Embo J* 16, 3644-54.

- Dibner, C., Elias, S., Ofir, R., Souopgui, J., Kolm, P.J., Sive, H., Pieler, T. and Frank, D. (2004) The Meis3 protein and retinoid signaling interact to pattern the *Xenopus* hindbrain. *Dev Biol* 271, 75-86.
- Dodd, J., Jessell, T.M. and Placzek, M. (1998) The when and where of floor plate induction. *Science* 282, 1654-7.
- Dong, Z., Brennan, A., Liu, N., Yarden, Y., Lefkowitz, G., Mirsky, R. and Jessen, K.R. (1995) Neu differentiation factor is a neuron-glia signal and regulates survival, proliferation, and maturation of rat Schwann cell precursors. *Neuron* 15, 585-96.
- Dowsing, B.J., Morrison, W.A., Nicola, N.A., Starkey, G.P., Bucci, T. and Kilpatrick, T.J. (1999) Leukemia inhibitory factor is an autocrine survival factor for Schwann cells. *J Neurochem* 73, 96-104.
- Duboule, D. and Dolle, P. (1989) The structural and functional organization of the murine HOX gene family resembles that of *Drosophila* homeotic genes. *Embo J* 8, 1497-505.
- Dugandzija-Novakovic, S., Koszowski, A.G., Levinson, S.R. and Shrager, P. (1995) Clustering of Na⁺ channels and node of Ranvier formation in remyelinating axons. *J Neurosci* 15, 492-503.
- Dupe, V., Davenne, M., Brocard, J., Dolle, P., Mark, M., Dierich, A., Chambon, P. and Rijli, F.M. (1997) In vivo functional analysis of the Hoxa-1 3' retinoic acid response element (3'RARE). *Development* 124, 399-410.
- Dupe, V. and Lumsden, A. (2001) Hindbrain patterning involves graded responses to retinoic acid signalling. *Development* 128, 2199-208.
- Dupin, E., Real, C., Glavieux-Pardanaud, C., Vaigot, P. and Le Douarin, N.M. (2003) Reversal of developmental restrictions in neural crest lineages: transition from Schwann cells to glial-melanocytic precursors in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 5229-33.
- Dupree, J.L., Coetzee, T., Blight, A., Suzuki, K. and Popko, B. (1998) Myelin galactolipids are essential for proper node of Ranvier formation in the CNS. *J Neurosci* 18, 1642-9.
- Echevarria, D., Vieira, C., Gimeno, L. and Martinez, S. (2003) Neuroepithelial secondary organizers and cell fate specification in the developing brain. *Brain Res Brain Res Rev* 43, 179-91.
- Einheber, S., Zanazzi, G., Ching, W., Scherer, S., Milner, T.A., Peles, E. and Salzer, J.L. (1997) The axonal membrane protein Caspr, a homologue of neuexin IV, is a component of the septate-like paranodal junctions that assemble during myelination. *J Cell Biol* 139, 1495-506.
- Elms, P., Siggers, P., Napper, D., Greenfield, A. and Arkell, R. (2003) Zic2 is required for neural crest formation and hindbrain patterning during mouse development. *Dev Biol* 264, 391-406.
- Emoto, Y., Wada, H., Okamoto, H., Kudo, A. and Imai, Y. (2005) Retinoic acid-metabolizing enzyme Cyp26a1 is essential for determining territories of hindbrain and spinal cord in zebrafish. *Dev Biol* 278, 415-27.
- Eshed, Y., Feinberg, K., Poliak, S., Sabanay, H., Sarig-Nadir, O., Spiegel, I., Bermingham, J.R., Jr. and Peles, E. (2005) Gliomedin mediates Schwann cell-axon interaction and the molecular assembly of the nodes of Ranvier. *Neuron* 47, 215-29.
- Eyal-Giladi, H. (1970) Differentiation potencies of the young chick blastoderm as revealed by different manipulations. II. Localized damage and hypoblast removal experiments. *J Embryol Exp Morphol* 23, 739-49.
- Fainsod, A., Steinbeisser, H. and De Robertis, E.M. (1994) On the function of BMP-4 in patterning the marginal zone of the *Xenopus*. *EMBO J* 13, 5015-25.
- Faivre-Sarrailh, C., Banerjee, S., Li, J., Hortsch, M., Laval, M. and Bhat, M.A. (2004) *Drosophila* contactin, a homolog of vertebrate contactin, is required for septate junction organization and paracellular barrier function. *Development* 131, 4931-42.

- Fannon, A.M., Sherman, D.L., Ilyina-Gragerova, G., Brophy, P.J., Friedrich, V.L., Jr. and Colman, D.R. (1995) Novel E-cadherin-mediated adhesion in peripheral nerve: Schwann cell architecture is stabilized by autotypic adherens junctions. *J Cell Biol* 129, 189-202.
- Farlie, P.G., Kerr, R., Thomas, P., Symes, T., Minichiello, J., Hearn, C.J. and Newgreen, D. (1999) A paraxial exclusion zone creates patterned cranial neural crest cell outgrowth adjacent to rhombomeres 3 and 5. *Dev Biol* 213, 70-84.
- Felix, J.T., Magarinos, M. and Diaz-Benjumea, F.J. (2007) Nab controls the activity of the zinc-finger transcription factors Squeeze and Rotund in *Drosophila* development. *Development* 134, 1845-52.
- Feltri, M.L., Graus Porta, D., Previtali, S.C., Nodari, A., Migliavacca, B., Casseti, A., Littlewood-Evans, A., Reichardt, L.F., Messing, A., Quattrini, A., Mueller, U. and Wrabetz, L. (2002) Conditional disruption of beta 1 integrin in Schwann cells impedes interactions with axons. *J Cell Biol* 156, 199-209.
- Fernandez-Valle, C., Gorman, D., Gomez, A.M. and Bunge, M.B. (1997) Actin plays a role in both changes in cell shape and gene-expression associated with Schwann cell myelination. *J Neurosci* 17, 241-50.
- Fewou, S.N., Bussow, H., Schaeren-Wiemers, N., Vanier, M.T., Macklin, W.B., Gieselmann, V. and Eckhardt, M. (2005) Reversal of non-hydroxy:alpha-hydroxy galactosylceramide ratio and unstable myelin in transgenic mice overexpressing UDP-galactose:ceramide galactosyltransferase. *J Neurochem* 94, 469-81.
- Fields, R.D. and Stevens-Graham, B. (2002) New insights into neuron-glia communication. *Science* 298, 556-62.
- Fraser, S., Keynes, R. and Lumsden, A. (1990) Segmentation in the chick embryo hindbrain is defined by cell lineage restrictions. *Nature* 344, 431-5.
- Freiman, R.N. and Herr, W. (1997) Viral mimicry: common mode of association with HCF by VP16 and the cellular protein LZIP. *Genes Dev* 11, 3122-7.
- Frohman, M.A., Martin, G.R., Cordes, S.P., Halamek, L.P. and Barsh, G.S. (1993) Altered rhombomere-specific gene expression and hyoid bone differentiation in the mouse segmentation mutant, *kreisler* (kr). *Development* 117, 925-36.
- Fu, Q., Goodrum, J.F., Hayes, C., Hostettler, J.D., Toews, A.D. and Morell, P. (1998) Control of cholesterol biosynthesis in Schwann cells. *J Neurochem* 71, 549-55.
- Fukuda, T., Kanomata, K., Nojima, J., Urakawa, I., Suzawa, T., Imada, M., Kukita, A., Kamijo, R., Yamashita, T. and Katagiri, T. (2007) FGF23 induces expression of two isoforms of NAB2, which are corepressors of Egr-1. *Biochem Biophys Res Commun* 353, 147-51.
- Gabriel, C.M., Gregson, N.A. and Hughes, R.A. (2000) Anti-PMP22 antibodies in patients with inflammatory neuropathy. *J Neuroimmunol* 104, 139-46.
- Garbay, B., Fournier, M., Sallafranque, M.L., Muller, S., Boiron, F., Heape, A., Cassagne, C. and Bonnet, J. (1988) Po, MBP, histone, and DNA levels in sciatic nerve. Postnatal accumulation studies in normal and trembler mice. *Neurochem Pathol* 8, 91-107.
- Garbay, B., Heape, A.M., Sargueil, F. and Cassagne, C. (2000) Myelin synthesis in the peripheral nervous system. *Prog Neurobiol* 61, 267-304.
- Garcia-Castro, M.I., Marcelle, C. and Bronner-Fraser, M. (2002) Ectodermal Wnt function as a neural crest inducer. *Science* 297, 848-51.
- Garcia-Dominguez, M., Gilardi-Hebenstreit, P. and Charnay, P. (2006) PIASxbeta acts as an activator of Hoxb1 and is antagonized by Krox20 during hindbrain segmentation. *Embo J* 25, 2432-42.
- Garratt, A.N., Britsch, S. and Birchmeier, C. (2000a) Neuregulin, a factor with many functions in the life of a schwann cell. *Bioessays* 22, 987-96.

- Garratt, A.N., Voiculescu, O., Topilko, P., Charnay, P. and Birchmeier, C. (2000b) A dual role of erbB2 in myelination and in expansion of the schwann cell precursor pool. *J Cell Biol* 148, 1035-46.
- Gavalas, A. (2002) ArRanging the hindbrain. *Trends Neurosci* 25, 61-4.
- Gavalas, A., Davenne, M., Lumsden, A., Chambon, P. and Rijli, F.M. (1997) Role of Hoxa-2 in axon pathfinding and rostral hindbrain patterning. *Development* 124, 3693-702.
- Gavalas, A. and Krumlauf, R. (2000) Retinoid signalling and hindbrain patterning. *Curr Opin Genet Dev* 10, 380-6.
- Gavalas, A., Studer, M., Lumsden, A., Rijli, F.M., Krumlauf, R. and Chambon, P. (1998) Hoxa1 and Hoxb1 synergize in patterning the hindbrain, cranial nerves and second pharyngeal arch. *Development* 125, 1123-36.
- Gavalas, A., Trainor, P., Ariza-McNaughton, L. and Krumlauf, R. (2001) Synergy between Hoxa1 and Hoxb1: the relationship between arch patterning and the generation of cranial neural crest. *Development* 128, 3017-27.
- Gendron-Maguire, M., Mallo, M., Zhang, M. and Gridley, T. (1993) Hoxa-2 mutant mice exhibit homeotic transformation of skeletal elements derived from cranial neural crest. *Cell* 75, 1317-31.
- Genova, J.L. and Fehon, R.G. (2003) Neuroglian, Gliotactin, and the Na⁺/K⁺ ATPase are essential for septate junction function in *Drosophila*. *J Cell Biol* 161, 979-89.
- Geren, B.B. and Schmitt, F.O. (1954) The Structure of the Schwann Cell and Its Relation to the Axon in Certain Invertebrate Nerve Fibers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 40, 863-70.
- Gerster, T. and Roeder, R.G. (1988) A herpesvirus trans-activating protein interacts with transcription factor OTF-1 and other cellular proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 6347-51.
- Ghislain, J. and Charnay, P. (2006) Control of myelination in Schwann cells: a Krox20 cis-regulatory element integrates Oct6, Brn2 and Sox10 activities. *EMBO Rep* 7, 52-8.
- Ghislain, J., Desmarquet-Trin-Dinh, C., Gilardi-Hebenstreit, P., Charnay, P. and Frain, M. (2003) Neural crest patterning: autoregulatory and crest-specific elements co-operate for Krox20 transcriptional control. *Development* 130, 941-53.
- Ghislain, J., Desmarquet-Trin-Dinh, C., Jaegle, M., Meijer, D., Charnay, P. and Frain, M. (2002) Characterisation of cis-acting sequences reveals a biphasic, axon-dependent regulation of Krox20 during Schwann cell development. *Development* 129, 155-66.
- Giese, K.P., Martini, R., Lemke, G., Soriano, P. and Schachner, M. (1992) Mouse P0 gene disruption leads to hypomyelination, abnormal expression of recognition molecules, and degeneration of myelin and axons. *Cell* 71, 565-76.
- Gilbert, S.F. (2003) *Developmental Biology* (Seventh edition). Sinauer Associates, Inc.
- Gilland, E. and Baker, R. (1993) Conservation of neuroepithelial and mesodermal segments in the embryonic vertebrate head. *Acta Anat (Basel)* 148, 110-23.
- Gillespie, C.S., Sherman, D.L., Fleetwood-Walker, S.M., Cottrell, D.F., Tait, S., Garry, E.M., Wallace, V.C., Ure, J., Griffiths, I.R., Smith, A. and Brophy, P.J. (2000) Peripheral demyelination and neuropathic pain behavior in periaxin-deficient mice. *Neuron* 26, 523-31.
- Gillian, A.L. and Svaren, J. (2004) The Ddx20/DP103 dead box protein represses transcriptional activation by Egr2/Krox-20. *J Biol Chem* 279, 9056-63.
- Gimeno, L., Brulet, P. and Martinez, S. (2003) Study of Fgf15 gene expression in developing mouse brain. *Gene Expr Patterns* 3, 473-81.

- Giudicelli, F., Gilardi-Hebenstreit, P., Mechta-Grigoriou, F., Poquet, C. and Charnay, P. (2003) Novel activities of *Mafk* underlie its dual role in hindbrain segmentation and regional specification. *Dev Biol* 253, 150-62.
- Giudicelli, F., Taillebourg, E., Charnay, P. and Gilardi-Hebenstreit, P. (2001) *Krox-20* patterns the hindbrain through both cell-autonomous and non cell-autonomous mechanisms. *Genes Dev* 15, 567-80.
- Glinka, A., Wu, W., Delius, H., Monaghan, A.P., Blumenstock, C. and Niehrs, C. (1998) *Dickkopf-1* is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction. *Nature* 391, 357-62.
- Glover, J.C., Renaud, J.S. and Rijli, F.M. (2006) Retinoic acid and hindbrain patterning. *J Neurobiol* 66, 705-25.
- Goddard, J.M., Rossel, M., Manley, N.R. and Capecchi, M.R. (1996) Mice with targeted disruption of *Hoxb-1* fail to form the motor nucleus of the VIIth nerve. *Development* 122, 3217-28.
- Godsave, S.F. and Slack, J.M. (1989) Clonal analysis of mesoderm induction in *Xenopus laevis*. *Dev Biol* 134, 486-90.
- Gomez-Skarmeta, J., de La Calle-Mustienes, E. and Modolell, J. (2001) The Wnt-activated *Xiro1* gene encodes a repressor that is essential for neural development and downregulates *Bmp4*. *Development* 128, 551-60.
- Gomez-Skarmeta, J.L., Glavic, A., de la Calle-Mustienes, E., Modolell, J. and Mayor, R. (1998) *Xiro*, a *Xenopus* homolog of the *Drosophila* Iroquois complex genes, controls development at the neural plate. *Embo J* 17, 181-90.
- Gomez-Skarmeta, J.L. and Modolell, J. (2002) Iroquois genes: genomic organization and function in vertebrate neural development. *Curr Opin Genet Dev* 12, 403-8.
- Goodman, C.S. (1996) Mechanisms and molecules that control growth cone guidance. *Annu Rev Neurosci* 19, 341-77.
- Goodman, R.H. and Smolik, S. (2000) CBP/p300 in cell growth, transformation, and development. *Genes Dev* 14, 1553-77.
- Goriely, A., Diez del Corral, R. and Storey, K.G. (1999) *c-Irx2* expression reveals an early subdivision of the neural plate in the chick embryo. *Mech Dev* 87, 203-6.
- Goutebroze, L., Carnaud, M., Denisenko, N., Boutterin, M.C. and Girault, J.A. (2003) *Syndecan-3* and *syndecan-4* are enriched in Schwann cell perinodal processes. *BMC Neurosci* 4, 29.
- Graham, A. (1997) The origin of dorsoventral patterning of the vertebrate nervous system. *Trends Genet* 13, 463-5.
- Graham, A. and Lumsden, A. (1996) Patterning the cranial neural crest. *Biochem Soc Symp* 62, 77-83.
- Gräper, L. (1913) Die Rhombomeren und ihre Nervenbeziehungen. *Arch. Mikrosk. Anat.* 83, 371-426.
- Grapin-Botton, A., Bonnin, M.A., McNaughton, L.A., Krumlauf, R. and Le Douarin, N.M. (1995) Plasticity of transposed rhombomeres: *Hox* gene induction is correlated with phenotypic modifications. *Development* 121, 2707-21.
- Grim, M., Halata, Z. and Franz, T. (1992) Schwann cells are not required for guidance of motor nerves in the hindlimb in *Splotch* mutant mouse embryos. *Anat Embryol (Berl)* 186, 311-8.
- Grinspan, J.B., Marchionni, M.A., Reeves, M., Coulaloglou, M. and Scherer, S.S. (1996) Axonal interactions regulate Schwann cell apoptosis in developing peripheral nerve: neuregulin receptors and the role of neuregulins. *J Neurosci* 16, 6107-18.
- Gritsman, K., Zhang, J., Cheng, S., Heckscher, E., Talbot, W.S. and Schier, A.F. (1999) The EGF-CFC protein one-eyed pinhead is essential for nodal signaling. *Cell* 97, 121-32.

- Grunz, H. and Tacke, L. (1989) Neural differentiation of *Xenopus laevis* ectoderm takes place after disaggregation and delayed reaggregation without inducer. *Cell Differ Dev* 28, 211-7.
- Guilbot, A., Williams, A., Ravise, N., Verny, C., Brice, A., Sherman, D.L., Brophy, P.J., LeGuern, E., Delague, V., Bareil, C., Megarbane, A. and Claustres, M. (2001) A mutation in periaxin is responsible for CMT4F, an autosomal recessive form of Charcot-Marie-Tooth disease. *Hum Mol Genet* 10, 415-21.
- Guthrie, S. and Lumsden, A. (1991) Formation and regeneration of rhombomere boundaries in the developing chick hindbrain. *Development* 112, 221-9.
- Guthrie, S. and Lumsden, A. (1992) Motor neuron pathfinding following rhombomere reversals in the chick embryo hindbrain. *Development* 114, 663-73.
- Guthrie, S., Muchamore, I., Kuroiwa, A., Marshall, H., Krumlauf, R. and Lumsden, A. (1992) Neuroectodermal autonomy of Hox-2.9 expression revealed by rhombomere transpositions. *Nature* 356, 157-9.
- Guthrie, S., Prince, V. and Lumsden, A. (1993) Selective dispersal of avian rhombomere cells in orthotopic and heterotopic grafts. *Development* 118, 527-38.
- Hagedorn, L., Suter, U. and Sommer, L. (1999) P0 and PMP22 mark a multipotent neural crest-derived cell type that displays community effects in response to TGF-beta family factors. *Development* 126, 3781-94.
- Hanneman, E., Trevarrow, B., Metcalfe, W.K., Kimmel, C.B. and Westerfield, M. (1988) Segmental pattern of development of the hindbrain and spinal cord of the zebrafish embryo. *Development* 103, 49-58.
- Hauptmann, G., Belting, H.G., Wolke, U., Lunde, K., Soll, I., Abdelilah-Seyfried, S., Prince, V. and Driever, W. (2002) *spiel ohne grenzen/pou2* is required for zebrafish hindbrain segmentation. *Development* 129, 1645-55.
- Hauptmann, G. and Gerster, T. (1995) Pou-2--a zebrafish gene active during cleavage stages and in the early hindbrain. *Mech Dev* 51, 127-38.
- He, X., Treacy, M.N., Simmons, D.M., Ingraham, H.A., Swanson, L.W. and Rosenfeld, M.G. (1989) Expression of a large family of POU-domain regulatory genes in mammalian brain development. *Nature* 340, 35-41.
- Helbling, P.M., Tran, C.T. and Brandli, A.W. (1998) Requirement for EphA receptor signaling in the segregation of *Xenopus* third and fourth arch neural crest cells. *Mech Dev* 78, 63-79.
- Hemmati-Brivanlou, A. and Melton, D.A. (1992) A truncated activin receptor inhibits mesoderm induction and formation of axial structures in *Xenopus* embryos. *Nature* 359, 609-14.
- Hemmati-Brivanlou, A. and Melton, D.A. (1994) Inhibition of activin receptor signaling promotes neuralization in *Xenopus*. *Cell* 77, 273-81.
- Hernandez, R.E., Putzke, A.P., Myers, J.P., Margaretha, L. and Moens, C.B. (2007) Cyp26 enzymes generate the retinoic acid response pattern necessary for hindbrain development. *Development* 134, 177-87.
- Heyman, I., Faissner, A. and Lumsden, A. (1995) Cell and matrix specialisations of rhombomere boundaries. *Dev Dyn* 204, 301-15.
- Heyman, I., Kent, A. and Lumsden, A. (1993) Cellular morphology and extracellular space at rhombomere boundaries in the chick embryo hindbrain. *Dev Dyn* 198, 241-53.
- Holder, N. and Hill, J. (1991) Retinoic acid modifies development of the midbrain-hindbrain border and affects cranial ganglion formation in zebrafish embryos. *Development* 113, 1159-70.
- Houart, C., Caneparo, L., Heisenberg, C., Barth, K., Take-Uchi, M. and Wilson, S. (2002) Establishment of the telencephalon during gastrulation by local antagonism of Wnt signaling. *Neuron* 35, 255-65.
- Hoyle, J., Tang, Y.P., Wietzel, E.L., Wardle, F.C. and Sive, H. (2004) *nlz* gene family is required for hindbrain patterning in the zebrafish. *Dev Dyn* 229, 835-46.

- Hunt, P., Gulisano, M., Cook, M., Sham, M.H., Faiella, A., Wilkinson, D., Boncinelli, E. and Krumlauf, R. (1991a) A distinct Hox code for the branchial region of the vertebrate head. *Nature* 353, 861-4.
- Hunt, P., Whiting, J., Muchamore, I., Marshall, H. and Krumlauf, R. (1991b) Homeobox genes and models for patterning the hindbrain and branchial arches. *Dev Suppl* 1, 187-96.
- Inoue, T., Hatayama, M., Tohmonda, T., Itohara, S., Aruga, J. and Mikoshiba, K. (2004) Mouse *Zic5* deficiency results in neural tube defects and hypoplasia of cephalic neural crest derivatives. *Dev Biol* 270, 146-62.
- Irving, C. and Mason, I. (2000) Signalling by FGF8 from the isthmus patterns anterior hindbrain and establishes the anterior limit of Hox gene expression. *Development* 127, 177-86.
- Irving, C., Nieto, M.A., DasGupta, R., Charnay, P. and Wilkinson, D.G. (1996) Progressive spatial restriction of *Sek-1* and *Krox-20* gene expression during hindbrain segmentation. *Dev Biol* 173, 26-38.
- Ishii, M., Han, J., Yen, H.Y., Sucov, H.M., Chai, Y. and Maxson, R.E., Jr. (2005) Combined deficiencies of *Msx1* and *Msx2* cause impaired patterning and survival of the cranial neural crest. *Development* 132, 4937-50.
- Itoh, M., Kudoh, T., Dedekian, M., Kim, C.H. and Chitnis, A.B. (2002) A role for *iro1* and *iro7* in the establishment of an anteroposterior compartment of the ectoderm adjacent to the midbrain-hindbrain boundary. *Development* 129, 2317-27.
- Jacquín, T.D., Borday, V., Schneider-Maunoury, S., Topilko, P., Ghilini, G., Kato, F., Charnay, P. and Champagnat, J. (1996) Reorganization of pontine rhythmogenic neuronal networks in *Krox-20* knockout mice. *Neuron* 17, 747-58.
- Jaegle, M., Ghazvini, M., Mandemakers, W., Piirsoo, M., Driegen, S., Levavasseur, F., Raghoenath, S., Grosveld, F. and Meijer, D. (2003) The POU proteins *Brn-2* and *Oct-6* share important functions in Schwann cell development. *Genes Dev* 17, 1380-91.
- Jaegle, M., Mandemakers, W., Broos, L., Zwart, R., Karis, A., Visser, P., Grosveld, F. and Meijer, D. (1996) The POU factor *Oct-6* and Schwann cell differentiation. *Science* 273, 507-10.
- Jaegle, M. and Meijer, D. (1998) Role of *Oct-6* in Schwann cell differentiation. *Microsc Res Tech* 41, 372-8.
- Jang, S.W., LeBlanc, S.E., Roopra, A., Wrabetz, L. and Svaren, J. (2006) In vivo detection of *Egr2* binding to target genes during peripheral nerve myelination. *J Neurochem* 98, 1678-87.
- Jessen, K.J.M., R. (2004) in *Myelin Biology and Disorders*. 329-359.
- Jessen, K.R., Brennan, A., Morgan, L., Mirsky, R., Kent, A., Hashimoto, Y. and Gavrilovic, J. (1994) The Schwann cell precursor and its fate: a study of cell death and differentiation during gliogenesis in rat embryonic nerves. *Neuron* 12, 509-27.
- Jessen, K.R. and Mirsky, R. (1992) Schwann cells: early lineage, regulation of proliferation and control of myelin formation. *Curr Opin Neurobiol* 2, 575-81.
- Jessen, K.R. and Mirsky, R. (1999) Schwann cells and their precursors emerge as major regulators of nerve development. *Trends Neurosci* 22, 402-10.
- Jessen, K.R. and Mirsky, R. (2005) The origin and development of glial cells in peripheral nerves. *Nat Rev Neurosci* 6, 671-82.
- Jessen, K.R., Morgan, L., Stewart, H.J. and Mirsky, R. (1990) Three markers of adult non-myelin-forming Schwann cells, 217c(Ran-1), A5E3 and GFAP: development and regulation by neuron-Schwann cell interactions. *Development* 109, 91-103.
- Jessen, K.R. and Richardson, W.D. (2001) *Glial cell development* (2nd edition) Oxford University Press.
- Johnson, E.S. (2004) Protein modification by SUMO. *Annu Rev Biochem* 73, 355-82.

- Joliot, A. and Prochiantz, A. (2004) Transduction peptides: from technology to physiology. *Nat Cell Biol* 6, 189-96.
- Joseph, N.M., Mukouyama, Y.S., Mosher, J.T., Jaegle, M., Crone, S.A., Dormand, E.L., Lee, K.F., Meijer, D., Anderson, D.J. and Morrison, S.J. (2004) Neural crest stem cells undergo multilineage differentiation in developing peripheral nerves to generate endoneurial fibroblasts in addition to Schwann cells. *Development* 131, 5599-612.
- Jungbluth, S., Bell, E. and Lumsden, A. (1999) Specification of distinct motor neuron identities by the singular activities of individual Hox genes. *Development* 126, 2751-8.
- Jurevics, H., Boulidin, T.W., Toews, A.D. and Morell, P. (1998) Regenerating sciatic nerve does not utilize circulating cholesterol. *Neurochem Res* 23, 401-6.
- Kageyama, R. and Ohtsuka, T. (1999) The Notch-Hes pathway in mammalian neural development. *Cell Res* 9, 179-88.
- Kamholz, J., Menichella, D., Jani, A., Garbern, J., Lewis, R.A., Krajewski, K.M., Lilien, J., Scherer, S.S. and Shy, M.E. (2000) Charcot-Marie-Tooth disease type 1: molecular pathogenesis to gene therapy. *Brain* 123 (Pt 2), 222-33.
- Katsuyama, Y., Okada, T., Matsumoto, J., Ohtsuka, Y., Terashima, T. and Okamura, Y. (2005) Early specification of ascidian larval motor neurons. *Dev Biol* 278, 310-22.
- Kelm, S., Pelz, A., Schauer, R., Filbin, M.T., Tang, S., de Bellard, M.E., Schnaar, R.L., Mahoney, J.A., Hartnell, A., Bradfield, P. and et al. (1994) Sialoadhesin, myelin-associated glycoprotein and CD22 define a new family of sialic acid-dependent adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily. *Curr Biol* 4, 965-72.
- Keynes, R., Cook, G., Davies, J., Lumsden, A., Norris, W. and Stern, C. (1990) Segmentation and the development of the vertebrate nervous system. *J Physiol (Paris)* 84, 27-32.
- Khalili-Shirazi, A., Atkinson, P., Gregson, N. and Hughes, R.A. (1993) Antibody responses to P0 and P2 myelin proteins in Guillain-Barre syndrome and chronic idiopathic demyelinating polyradiculoneuropathy. *J Neuroimmunol* 46, 245-51.
- Kiecker, C. and Lumsden, A. (2004) Hedgehog signaling from the ZLI regulates diencephalic regional identity. *Nat Neurosci* 7, 1242-9.
- Kiecker, C. and Lumsden, A. (2005) Compartments and their boundaries in vertebrate brain development. *Nat Rev Neurosci* 6, 553-64.
- Kim, F.A., Sing I, A., Kaneko, T., Bieman, M., Stallwood, N., Sadl, V.S. and Cordes, S.P. (2005a) The vHNF1 homeodomain protein establishes early rhombomere identity by direct regulation of Kreisler expression. *Mech Dev* 122, 1300-9.
- Kim, J.W., Kim, M.J., Kim, K.J., Yun, H.J., Chae, J.S., Hwang, S.G., Chang, T.S., Park, H.S., Lee, K.W., Han, P.L., Cho, S.G., Kim, T.W. and Choi, E.J. (2005b) Notch interferes with the scaffold function of JNK-interacting protein 1 to inhibit the JNK signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 14308-13.
- Kioussi, C., Gross, M.K. and Gruss, P. (1995) Pax3: a paired domain gene as a regulator in PNS myelination. *Neuron* 15, 553-62.
- Klingensmith, J., Ang, S.L., Bachiller, D. and Rossant, J. (1999) Neural induction and patterning in the mouse in the absence of the node and its derivatives. *Dev Biol* 216, 535-49.
- Knight, R.D., Panopoulou, G.D., Holland, P.W. and Shimeld, S.M. (2000) An amphioxus Krox gene: insights into vertebrate hindbrain evolution. *Dev Genes Evol* 210, 518-21.

- Knoepfler, P.S., Lu, Q. and Kamps, M.P. (1996) Pbx-1 Hox heterodimers bind DNA on inseparable half-sites that permit intrinsic DNA binding specificity of the Hox partner at nucleotides 3' to a TAAT motif. *Nucleic Acids Res* 24, 2288-94.
- Komiyama, A. and Suzuki, K. (1992) Age-related differences in proliferative responses of Schwann cells during Wallerian degeneration. *Brain Res* 573, 267-75.
- Koszowski, A.G., Owens, G.C. and Levinson, S.R. (1998) The effect of the mouse mutation claw paw on myelination and nodal frequency in sciatic nerves. *J Neurosci* 18, 5859-68.
- Kubu, C.J., Orimoto, K., Morrison, S.J., Weinmaster, G., Anderson, D.J. and Verdi, J.M. (2002) Developmental changes in Notch1 and numb expression mediated by local cell-cell interactions underlie progressively increasing delta sensitivity in neural crest stem cells. *Dev Biol* 244, 199-214.
- Kudoh, T., Concha, M.L., Houart, C., Dawid, I.B. and Wilson, S.W. (2004) Combinatorial Fgf and Bmp signalling patterns the gastrula ectoderm into prospective neural and epidermal domains. *Development* 131, 3581-92.
- Kudoh, T., Wilson, S.W. and Dawid, I.B. (2002) Distinct roles for Fgf, Wnt and retinoic acid in posteriorizing the neural ectoderm. *Development* 129, 4335-46.
- Kuhlbrodt, K., Herbarth, B., Sock, E., Hermans-Borgmeyer, I. and Wegner, M. (1998a) Sox10, a novel transcriptional modulator in glial cells. *J Neurosci* 18, 237-50.
- Kuhlbrodt, K., Schmidt, C., Sock, E., Pingault, V., Bondurand, N., Goossens, M. and Wegner, M. (1998b) Functional analysis of Sox10 mutations found in human Waardenburg-Hirschsprung patients. *J Biol Chem* 273, 23033-8.
- Kuhn, G., Lie, A., Wilms, S. and Muller, H.W. (1993) Coexpression of PMP22 gene with MBP and P0 during de novo myelination and nerve repair. *Glia* 8, 256-64.
- Kumbrink, J., Gerlinger, M. and Johnson, J.P. (2005) Egr-1 induces the expression of its corepressor nab2 by activation of the nab2 promoter thereby establishing a negative feedback loop. *J Biol Chem* 280, 42785-93.
- Kwok, R.P., Lundblad, J.R., Chrivia, J.C., Richards, J.P., Bachinger, H.P., Brennan, R.G., Roberts, S.G., Green, M.R. and Goodman, R.H. (1994) Nuclear protein CBP is a coactivator for the transcription factor CREB. *Nature* 370, 223-6.
- LaMonte, B.H., Wallace, K.E., Holloway, B.A., Shelly, S.S., Ascano, J., Tokito, M., Van Winkle, T., Howland, D.S. and Holzbaur, E.L. (2002) Disruption of dynein/dynactin inhibits axonal transport in motor neurons causing late-onset progressive degeneration. *Neuron* 34, 715-27.
- Larsen, C.W., Zeltser, L.M. and Lumsden, A. (2001) Boundary formation and compartment in the avian diencephalon. *J Neurosci* 21, 4699-711.
- Laslo, P., Spooner, C.J., Warmflash, A., Lancki, D.W., Lee, H.J., Sciammas, R., Gantner, B.N., Dinner, A.R. and Singh, H. (2006) Multilineage transcriptional priming and determination of alternate hematopoietic cell fates. *Cell* 126, 755-66.
- Lawson, M.A., Tsutsumi, R., Zhang, H., Talukdar, I., Butler, B.K., Santos, S.J., Mellon, P.L. and Webster, N.J. (2007) Pulse sensitivity of the luteinizing hormone beta promoter is determined by a negative feedback loop involving early growth response-1 and Ngfi-A binding protein 1 and 2. *Mol Endocrinol* 21, 1175-91.
- Le, N., Nagarajan, R., Wang, J.Y., Araki, T., Schmidt, R.E. and Milbrandt, J. (2005a) Analysis of congenital hypomyelinating Egr2Lo/Lo nerves identifies Sox2 as an inhibitor of Schwann cell differentiation and myelination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 2596-601.
- Le, N., Nagarajan, R., Wang, J.Y., Svaren, J., LaPash, C., Araki, T., Schmidt, R.E. and Milbrandt, J. (2005b) Nab proteins are essential for peripheral nervous system myelination. *Nat Neurosci* 8, 932-40.

- Le Douarin, N.M., Creuzet, S., Couly, G. and Dupin, E. (2004). Neural crest cell plasticity and its limits. *Development* 131, 4637-50.
- Lebel, M., Mo, R., Shimamura, K. and Hui, C.C. (2007) Gli2 and Gli3 play distinct roles in the dorsoventral patterning of the mouse hindbrain. *Dev Biol* 302, 345-55.
- LeBlanc, S.E., Jang, S.W., Ward, R.M., Wrabetz, L. and Svaren, J. (2006) Direct regulation of myelin protein zero expression by the Egr2 transactivator. *J Biol Chem* 281, 5453-60.
- Leblanc, S.E., Srinivasan, R., Ferri, C., Mager, G.M., Gillian-Daniel, A.L., Wrabetz, L. and Svaren, J. (2005) Regulation of cholesterol/lipid biosynthetic genes by Egr2/Krox20 during peripheral nerve myelination. *J Neurochem* 93, 737-48.
- LeBlanc, S.E., Ward, R.M. and Svaren, J. (2007) Neuropathy-associated Egr2 mutants disrupt cooperative activation of myelin protein zero by Egr2 and Sox10. *Mol Cell Biol* 27, 3521-9.
- Lecaudey, V., Anselme, I., Rosa, F. and Schneider-Maunoury, S. (2004) The zebrafish Iroquois gene iro7 positions the r4/r5 boundary and controls neurogenesis in the rostral hindbrain. *Development* 131, 3121-31.
- Lecaudey, V., Thisse, C., Thisse, B. and Schneider-Maunoury, S. (2001) Sequence and expression pattern of iro7, a novel, divergent zebrafish iroquois homeobox gene. *Mech Dev* 109, 383-8.
- Lee, M.B., Lebedeva, L.A., Suzawa, M., Wadekar, S.A., Desclozeaux, M. and Ingraham, H.A. (2005) The DEAD-box protein DP103 (Ddx20 or Gemin-3) represses orphan nuclear receptor activity via SUMO modification. *Mol Cell Biol* 25, 1879-90.
- Lekven, A.C., Thorpe, C.J., Waxman, J.S. and Moon, R.T. (2001) Zebrafish wnt8 encodes two wnt8 proteins on a bicistronic transcript and is required for mesoderm and neurectoderm patterning. *Dev Cell* 1, 103-14.
- Lemaire, P., Revelant, O., Bravo, R. and Charnay, P. (1988) Two mouse genes encoding potential transcription factors with identical DNA-binding domains are activated by growth factors in cultured cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 4691-5.
- Levi, G., Topilko, P., Schneider-Maunoury, S., Lasagna, M., Mantero, S., Cancedda, R. and Charnay, P. (1996) Defective bone formation in Krox-20 mutant mice. *Development* 122, 113-20.
- Li, J.Y. and Joyner, A.L. (2001) Otx2 and Gbx2 are required for refinement and not induction of mid-hindbrain gene expression. *Development* 128, 4979-91.
- Li, X., Lynn, B.D., Olson, C., Meier, C., Davidson, K.G., Yasumura, T., Rash, J.E. and Nagy, J.I. (2002) Connexin29 expression, immunocytochemistry and freeze-fracture replica immunogold labelling (FRIL) in sciatic nerve. *Eur J Neurosci* 16, 795-806.
- Liem, K.F., Jr., Tremml, G., Roelink, H. and Jessell, T.M. (1995) Dorsal differentiation of neural plate cells induced by BMP-mediated signals from epidermal ectoderm. *Cell* 82, 969-79.
- Liu, A., Li, J.Y., Bromleigh, C., Lao, Z., Niswander, L.A. and Joyner, A.L. (2003) FGF17b and FGF18 have different midbrain regulatory properties from FGF8b or activated FGF receptors. *Development* 130, 6175-85.
- Liu, P., Wakamiya, M., Shea, M.J., Albrecht, U., Behringer, R.R. and Bradley, A. (1999) Requirement for Wnt3 in vertebrate axis formation. *Nat Genet* 22, 361-5.
- Loeb, J.A., Khurana, T.S., Robbins, J.T., Yee, A.G. and Fischbach, G.D. (1999) Expression patterns of transmembrane and released forms of neuregulin during spinal cord and neuromuscular synapse development. *Development* 126, 781-91.
- Lu, Q. and Kamps, M.P. (1997) Heterodimerization of Hox proteins with Pbx1 and oncoprotein E2a-Pbx1 generates unique DNA-binding specificities at nucleotides predicted to contact the N-terminal arm of the Hox homeodomain--demonstration of Hox-dependent targeting of E2a-Pbx1 in vivo. *Oncogene* 14, 75-83.

- Lu, R. and Misra, V. (2000) Potential role for luman, the cellular homologue of herpes simplex virus VP16 (alpha gene trans-inducing factor), in herpesvirus latency. *J Virol* 74, 934-43.
- Lu, R., Yang, P., O'Hare, P. and Misra, V. (1997) Luman, a new member of the CREB/ATF family, binds to herpes simplex virus VP16-associated host cellular factor. *Mol Cell Biol* 17, 5117-26.
- Lu, R., Yang, P., Padmakumar, S. and Misra, V. (1998) The herpesvirus transactivator VP16 mimics a human basic domain leucine zipper protein, luman, in its interaction with HCF. *J Virol* 72, 6291-7.
- Lubetzki, C., Williams, A. and Stankoff, B. (2005) Promoting repair in multiple sclerosis: problems and prospects. *Curr Opin Neurol* 18, 237-44.
- Lucerna, M., Mechtcheriakova, D., Kadl, A., Schabbauer, G., Schafer, R., Gruber, F., Koshelnick, Y., Muller, H.D., Issbrucker, K., Clauss, M., Binder, B.R. and Hofer, E. (2003) NAB2, a corepressor of EGR-1, inhibits vascular endothelial growth factor-mediated gene induction and angiogenic responses of endothelial cells. *J Biol Chem* 278, 11433-40.
- Luciano, R.L. and Wilson, A.C. (2002) An activation domain in the C-terminal subunit of HCF-1 is important for transactivation by VP16 and LZIP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 13403-8.
- Luciano, R.L. and Wilson, A.C. (2003) HCF-1 functions as a coactivator for the zinc finger protein Krox20. *J Biol Chem* 278, 51116-24.
- Lumsden, A. and Keynes, R. (1989) Segmental patterns of neuronal development in the chick hindbrain. *Nature* 337, 424-8.
- Lumsden, A. and Krumlauf, R. (1996) Patterning the vertebrate neuraxis. *Science*, 274:1109-15.
- Maconochie, M., Nonchev, S., Morrison, A. and Krumlauf, R. (1996) Paralogous Hox genes: function and regulation. *Annu Rev Genet* 30, 529-56.
- Maden, M., Gale, E., Kostetskii, I. and Zile, M. (1996) Vitamin A-deficient quail embryos have half a hindbrain and other neural defects. *Curr Biol* 6, 417-26.
- Mahajan, S.S., Little, M.M., Vazquez, R. and Wilson, A.C. (2002) Interaction of HCF-1 with a cellular nuclear export factor. *J Biol Chem* 277, 44292-9.
- Manley, N.R. and Capecchi, M.R. (1997) Hox group 3 paralogous genes act synergistically in the formation of somitic and neural crest-derived structures. *Dev Biol* 192, 274-88.
- Manzanares, M., Bel-Vialar, S., Ariza-McNaughton, L., Ferretti, E., Marshall, H., Maconochie, M.M., Blasi, F. and Krumlauf, R. (2001) Independent regulation of initiation and maintenance phases of Hoxa3 expression in the vertebrate hindbrain involve auto- and cross-regulatory mechanisms. *Development* 128, 3595-607.
- Manzanares, M., Cordes, S., Ariza-McNaughton, L., Sadl, V., Maruthainar, K., Barsh, G. and Krumlauf, R. (1999a) Conserved and distinct roles of kreisler in regulation of the paralogous Hoxa3 and Hoxb3 genes. *Development* 126, 759-69.
- Manzanares, M., Cordes, S., Kwan, C.T., Sham, M.H., Barsh, G.S. and Krumlauf, R. (1997) Segmental regulation of Hoxb-3 by kreisler. *Nature* 387, 191-5.
- Manzanares, M., Nardelli, J., Gilardi-Hebenstreit, P., Marshall, H., Giudicelli, F., Martinez-Pastor, M.T., Krumlauf, R. and Charnay, P. (2002) Krox20 and kreisler co-operate in the transcriptional control of segmental expression of Hoxb3 in the developing hindbrain. *Embo J* 21, 365-76.
- Manzanares, M., Trainor, P.A., Nonchev, S., Ariza-McNaughton, L., Brodie, J., Gould, A., Marshall, H., Morrison, A., Kwan, C.T., Sham, M.H., Wilkinson, D.G. and Krumlauf, R. (1999b) The role of kreisler in segmentation during hindbrain development. *Dev Biol* 211, 220-37.

- Marchionni, M.A., Goodearl, A.D., Chen, M.S., Bermingham-McDonogh, O., Kirk, C., Hendricks, M., Danehy, F., Misumi, D., Sudhalter, J., Kobayashi, K. and et al. (1993) Glial growth factors are alternatively spliced erbB2 ligands expressed in the nervous system. *Nature* 362, 312-8.
- Marcus, J., Dupree, J.L. and Popko, B. (2002) Myelin-associated glycoprotein and myelin galactolipids stabilize developing axo-glial interactions. *J Cell Biol* 156, 567-77.
- Marigo, V. and Tabin, C.J. (1996) Regulation of patched by sonic hedgehog in the developing neural tube. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 9346-51.
- Marin, F. and Charnay, P. (2000) Hindbrain patterning: FGFs regulate Krox20 and mafB/kr expression in the otic/preotic region. *Development* 127, 4925-35.
- Mark, M., Lufkin, T., Dolle, P., Dierich, A., LeMeur, M. and Chambon, P. (1993) Roles of Hox genes: what we have learnt from gain of function and loss of function mutations in the mouse. *C R Acad Sci III* 316, 995-1008.
- Maro, G.S., Vermeren, M., Voiculescu, O., Melton, L., Cohen, J., Charnay, P. and Topilko, P. (2004) Neural crest boundary cap cells constitute a source of neuronal and glial cells of the PNS. *Nat Neurosci* 7, 930-8.
- Maroulakou, I.G., Papas, T.S. and Green, J.E. (1994) Differential expression of ets-1 and ets-2 proto-oncogenes during murine embryogenesis. *Oncogene* 9, 1551-65.
- Martinez, S., Geijo, E., Sanchez-Vives, M.V., Puellas, L. and Gallego, R. (1992) Reduced junctional permeability at interrhombomeric boundaries. *Development* 116, 1069-76.
- Martinez, S., Marin, F., Nieto, M.A. and Puellas, L. (1995) Induction of ectopic engrailed expression and fate change in avian rhombomeres: intersegmental boundaries as barriers. *Mech Dev* 51, 289-303.
- Martini, R. (1994) Expression and functional roles of neural cell surface molecules and extracellular matrix components during development and regeneration of peripheral nerves. *J Neurocytol* 23, 1-28.
- Martini, R. and Schachner, M. (1986) Immunoelectron microscopic localization of neural cell adhesion molecules (L1, N-CAM, and MAG) and their shared carbohydrate epitope and myelin basic protein in developing sciatic nerve. *J Cell Biol* 103, 2439-48.
- Mathis, L., Kulesa, P.M. and Fraser, S.E. (2001) FGF receptor signalling is required to maintain neural progenitors during Hensen's node progression. *Nat Cell Biol* 3, 559-66.
- Mathis, L., Sieur, J., Voiculescu, O., Charnay, P. and Nicolas, J.F. (1999) Successive patterns of clonal cell dispersion in relation to neuromeric subdivision in the mouse neuroepithelium. *Development* 126, 4095-106.
- Matsumoto, K., Nishihara, S., Kamimura, M., Shiraishi, T., Ootoguro, T., Uehara, M., Maeda, Y., Ogura, K., Lumsden, A. and Ogura, T. (2004) The prepattern transcription factor *Irx2*, a target of the FGF8/MAP kinase cascade, is involved in cerebellum formation. *Nat Neurosci* 7, 605-12.
- Maurel, P. and Salzer, J.L. (2000) Axonal regulation of Schwann cell proliferation and survival and the initial events of myelination requires PI 3-kinase activity. *J Neurosci* 20, 4635-45.
- Maves, L., Jackman, W. and Kimmel, C.B. (2002) FGF3 and FGF8 mediate a rhombomere 4 signaling activity in the zebrafish hindbrain. *Development* 129, 3825-37.
- Maves, L. and Kimmel, C.B. (2005) Dynamic and sequential patterning of the zebrafish posterior hindbrain by retinoic acid. *Dev Biol* 285, 593-605.
- Mayor, R., Morgan, R. and Sargent, M.G. (1995) Induction of the prospective neural crest of *Xenopus*. *Development* 121, 767-77.
- Mazet, F. and Shimeld, S.M. (2002) The evolution of chordate neural segmentation. *Dev Biol* 251, 258-70.

- McKay, I.J., Lewis, J. and Lumsden, A. (1997) Organization and development of facial motor neurons in the kreisler mutant mouse. *Eur J Neurosci* 9, 1499-506.
- McKay, I.J., Muchamore, I., Krumlauf, R., Maden, M., Lumsden, A. and Lewis, J. (1994) The kreisler mouse: a hindbrain segmentation mutant that lacks two rhombomeres. *Development* 120, 2199-211.
- McKinnon, R.D., Smith, C., Behar, T., Smith, T. and Dubois-Dalcq, M. (1993) Distinct effects of bFGF and PDGF on oligodendrocyte progenitor cells. *Glia* 7, 245-54.
- McNulty, C.L., Peres, J.N., Bardine, N., van den Akker, W.M. and Durston, A.J. (2005) Knockdown of the complete Hox paralogous group 1 leads to dramatic hindbrain and neural crest defects. *Development* 132, 2861-71.
- Mechta-Grigoriou, F., Garel, S. and Charnay, P. (2000) Nab proteins mediate a negative feedback loop controlling Krox-20 activity in the developing hindbrain. *Development* 127, 119-28.
- Mechta-Grigoriou, F., Giudicelli, F., Pujades, C., Charnay, P. and Yaniv, M. (2003) c-jun regulation and function in the developing hindbrain. *Dev Biol* 258, 419-31.
- Meier, C., Parmantier, E., Brennan, A., Mirsky, R. and Jessen, K.R. (1999) Developing Schwann cells acquire the ability to survive without axons by establishing an autocrine circuit involving insulin-like growth factor, neurotrophin-3, and platelet-derived growth factor-BB. *J Neurosci* 19, 3847-59.
- Melendez-Vasquez, C.V., Einheber, S. and Salzer, J.L. (2004) Rho kinase regulates schwann cell myelination and formation of associated axonal domains. *J Neurosci* 24, 3953-63.
- Mellitzer, G., Xu, Q. and Wilkinson, D.G. (1999) Eph receptors and ephrins restrict cell intermingling and communication. *Nature* 400, 77-81.
- Menegoz, M., Gaspar, P., Le Bert, M., Galvez, T., Burgaya, F., Palfrey, C., Ezan, P., Arnos, F. and Girault, J.A. (1997) Paranodin, a glycoprotein of neuronal paranodal membranes. *Neuron* 19, 319-31.
- Mercader, N., Leonardo, E., Piedra, M.E., Martinez, A.C., Ros, M.A. and Torres, M. (2000) Opposing RA and FGF signals control proximodistal vertebrate limb development through regulation of Meis genes. *Development* 127, 3961-70.
- Meredith, A. and Johnson, J.E. (2000) Negative autoregulation of Mash1 expression in CNS development. *Dev Biol* 222, 336-46.
- Meulemans, D. and Bronner-Fraser, M. (2004) Gene-regulatory interactions in neural crest evolution and development. *Dev Cell* 7, 291-9.
- Meyer Zu Horste, G. and Nave, K.A. (2006) Animal models of inherited neuropathies. *Curr Opin Neurol* 19, 464-73.
- Michailov, G.V., Sereda, M.W., Brinkmann, B.G., Fischer, T.M., Haug, B., Birchmeier, C., Role, L., Lai, C., Schwab, M.H. and Nave, K.A. (2004) Axonal neuregulin-1 regulates myelin sheath thickness. *Science* 304, 700-3.
- Millet, S., Campbell, K., Epstein, D.J., Losos, K., Harris, E. and Joyner, A.L. (1999) A role for Gbx2 in repression of Otx2 and positioning the mid/hindbrain organizer. *Nature* 401, 161-4.
- Missler, M. and Sudhof, T.C. (1998) Neurexins: three genes and 1001 products. *Trends Genet* 14, 20-6.
- Moens, C.B., Cordes, S.P., Giorgianni, M.W., Barsh, G.S. and Kimmel, C.B. (1998) Equivalence in the genetic control of hindbrain segmentation in fish and mouse. *Development* 125, 381-91.
- Moens, C.B. and Prince, V.E. (2002) Constructing the hindbrain: insights from the zebrafish. *Dev Dyn.* 224, 1-17.
- Moens, C.B., Yan, Y.L., Appel, B., Force, A.G. and Kimmel, C.B. (1996) valentino: a zebrafish gene required for normal hindbrain segmentation. *Development* 122, 3981-90.

- Mollard, R., Viville, S., Ward, S.J., Decimo, D., Chambon, P. and Dolle, P. (2000) Tissue-specific expression of retinoic acid receptor isoform transcripts in the mouse embryo. *Mech Dev* 94, 223-32.
- Monuki, E.S., Kuhn, R., Weinmaster, G., Trapp, B.D. and Lemke, G. (1990) Expression and activity of the POU transcription factor SCIP. *Science* 249, 1300-3.
- Monuki, E.S., Weinmaster, G., Kuhn, R. and Lemke, G. (1989) SCIP: a glial POU domain gene regulated by cyclic AMP. *Neuron* 3, 783-93.
- Morris, J.K., Lin, W., Hauser, C., Marchuk, Y., Getman, D. and Lee, K.F. (1999) Rescue of the cardiac defect in ErbB2 mutant mice reveals essential roles of ErbB2 in peripheral nervous system development. *Neuron* 23, 273-83.
- Morrison, S.J., Perez, S.E., Qiao, Z., Verdi, J.M., Hicks, C., Weinmaster, G. and Anderson, D.J. (2000) Transient Notch activation initiates an irreversible switch from neurogenesis to gliogenesis by neural crest stem cells. *Cell* 101, 499-510.
- Morrissey, T.K., Levi, A.D., Nuijens, A., Sliwkowski, M.X. and Bunge, R.P. (1995) Axon-induced mitogenesis of human Schwann cells involves heregulin and p185erbB2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 1431-5.
- Munchberg, S.R. and Steinbeisser, H. (1999) The *Xenopus* Ets transcription factor XER81 is a target of the FGF signaling pathway. *Mech Dev* 80, 53-65.
- Murakami, Y., Pasqualetti, M., Takio, Y., Hirano, S., Rijli, F.M. and Kuratani, S. (2004) Segmental development of reticulospinal and branchiomotor neurons in lamprey: insights into the evolution of the vertebrate hindbrain. *Development* 131, 983-95.
- 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, 2847-57.
- Musso, M., Balestra, P., Bellone, E., Cassandrini, D., Di Maria, E., Doria, L.L., Grandis, M., Mancardi, G.L., Schenone, A., Levi, G., Ajmar, F. and Mandich, P. (2001) The D355V mutation decreases EGR2 binding to an element within the Cx32 promoter. *Neurobiol Dis* 8, 700-6.
- Musso, M., Balestra, P., Taroni, F., Bellone, E. and Mandich, P. (2003) Different consequences of EGR2 mutants on the transactivation of human Cx32 promoter. *Neurobiol Dis* 12, 89-95.
- Nagarajan, R., Le, N., Mahoney, H., Araki, T. and Milbrandt, J. (2002) Deciphering peripheral nerve myelination by using Schwann cell expression profiling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 8998-9003.
- Nagarajan, R., Svaren, J., Le, N., Araki, T., Watson, M. and Milbrandt, J. (2001) EGR2 mutations in inherited neuropathies dominant-negatively inhibit myelin gene expression. *Neuron* 30, 355-68.
- Nakamura, H., Katahira, T., Matsunaga, E. and Sato, T. (2005) Isthmus organizer for midbrain and hindbrain development. *Brain Res Brain Res Rev* 49, 120-6.
- Nave, K.A. and Salzer, J.L. (2006) Axonal regulation of myelination by neuregulin 1. *Curr Opin Neurobiol* 16, 492-500.
- Niederlander, C. and Lumsden, A. (1996) Late emigrating neural crest cells migrate specifically to the exit points of cranial branchiomotor nerves. *Development* 122, 2367-74.
- Niederreither, K., Vermot, J., Schuhbaur, B., Chambon, P. and Dolle, P. (2000) Retinoic acid synthesis and hindbrain patterning in the mouse embryo. *Development* 127, 75-85.
- Niss, K. and Leutz, A. (1998) Expression of the homeobox gene GBX2 during chicken development. *Mech Dev* 76, 151-5.

- Nittenberg, R., Patel, K., Joshi, Y., Krumlauf, R., Wilkinson, D.G., Brickell, P.M., Tickle, C. and Clarke, J.D. (1997) Cell movements, neuronal organisation and gene expression in hindbrains lacking morphological boundaries. *Development* 124, 2297-306.
- Noden, D.M. (1983) The role of the neural crest in patterning of avian cranial skeletal, connective, and muscle tissues. *Dev Biol* 96, 144-65.
- Noden, D.M. (1988) Interactions and fates of avian craniofacial mesenchyme. *Development* 103 Suppl, 121-40.
- Nonchev, S., Maconochie, M., Gould, A., Morrison, A. and Krumlauf, R. (1997) Cross-regulatory interactions between Hox genes and the control of segmental expression in the vertebrate central nervous system. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 62, 313-23.
- Nonchev, S., Vesque, C., Maconochie, M., Seitanidou, T., Ariza-McNaughton, L., Frain, M., Marshall, H., Sham, M.H., Krumlauf, R. and Charnay, P. (1996) Segmental expression of Hoxa-2 in the hindbrain is directly regulated by Krox-20. *Development* 122, 543-54.
- Nordstrom, U., Jessell, T.M. and Edlund, T. (2002) Progressive induction of caudal neural character by graded Wnt signaling. *Nat Neurosci* 5, 525-32.
- Notterpek, L., Snipes, G.J. and Shooter, E.M. (1999) Temporal expression pattern of peripheral myelin protein 22 during in vivo and in vitro myelination. *Glia* 25, 358-69.
- Ogryzko, V.V., Schiltz, R.L., Russanova, V., Howard, B.H. and Nakatani, Y. (1996) The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell* 87, 953-9.
- Oguievetskaia, K., Cifuentes-Diaz, C., Girault, J.A., Goutebroze, L. (2005) Cellular contacts in myelinated fibers of the peripheral nervous system. *Med Sci* 21, 162-9.
- Olsson, Y. (1990) Microenvironment of the peripheral nervous system under normal and pathological conditions. *Crit Rev Neurobiol* 5, 265-311.
- Ou, Q., Mouillet, J.F., Yan, X., Dorn, C., Crawford, P.A. and Sadovsky, Y. (2001) The DEAD box protein DP103 is a regulator of steroidogenic factor-1. *Mol Endocrinol* 15, 69-79.
- Oxtoby, E. and Jowett, T. (1993) Cloning of the zebrafish krox-20 gene (krx-20) and its expression during hindbrain development. *Nucleic Acids Res* 21, 1087-95.
- Papalopulu, N., Lovell-Badge, R. and Krumlauf, R. (1991) The expression of murine Hox-2 genes is dependent on the differentiation pathway and displays a collinear sensitivity to retinoic acid in F9 cells and *Xenopus* embryos. *Nucleic Acids Res* 19, 5497-506.
- Pareyson, D. (2004) Differential diagnosis of Charcot-Marie-Tooth disease and related neuropathies. *Neurol Sci* 25, 72-82.
- Pareyson, D., Taroni, F., Botti, S., Morbin, M., Baratta, S., Lauria, G., Ciano, C. and Sghirlanzoni, A. (2000) Cranial nerve involvement in CMT disease type 1 due to early growth response 2 gene mutation. *Neurology* 54, 1696-8.
- Parkinson, D.B., Bhaskaran, A., Droggiti, A., Dickinson, S., D'Antonio, M., Mirsky, R. and Jessen, K.R. (2004) Krox-20 inhibits Jun-NH2-terminal kinase/c-Jun to control Schwann cell proliferation and death. *J Cell Biol* 164, 385-94.
- Parkinson, D.B., Dickinson, S., Bhaskaran, A., Kinsella, M.T., Brophy, P.J., Sherman, D.L., Sharghi-Namini, S., Duran Alonso, M.B., Mirsky, R. and Jessen, K.R. (2003) Regulation of the myelin gene periaxin provides evidence for Krox-20-independent myelin-related signalling in Schwann cells. *Mol Cell Neurosci* 23, 13-27.
- Parkinson, D.B., Dong, Z., Bunting, H., Whitfield, J., Meier, C., Marie, H., Mirsky, R. and Jessen, K.R. (2001) Transforming growth factor beta (TGFbeta) mediates Schwann cell death in vitro and in vivo: examination of c-

Jun activation, interactions with survival signals, and the relationship of TGFbeta-mediated death to Schwann cell differentiation. *J Neurosci* 21, 8572-85.

Parmantier, E., Lynn, B., Lawson, D., Turmaine, M., Namini, S.S., Chakrabarti, L., McMahon, A.P., Jessen, K.R. and Mirsky, R. (1999) Schwann cell-derived Desert hedgehog controls the development of peripheral nerve sheaths. *Neuron* 23, 713-24.

Patwardhan, S., Gashler, A., Siegel, M.G., Chang, L.C., Joseph, L.J., Shows, T.B., Le Beau, M.M. and Sukhatme, V.P. (1991) EGR3, a novel member of the Egr family of genes encoding immediate-early transcription factors. *Oncogene* 6, 917-28.

Pearson, J.C., Lemons, D., McGinnis, W. (2005) Modulating Hox gene functions during animal body patterning. *Nat Rev Genet.* 6, 893-904.

Peles, E. and Salzer, J.L. (2000) Molecular domains of myelinated axons. *Curr Opin Neurobiol* 10, 558-65.

Pellegrino, R.G., Politis, M.J., Ritchie, J.M. and Spencer, P.S. (1986) Events in degenerating cat peripheral nerve: induction of Schwann cell S phase and its relation to nerve fibre degeneration. *J Neurocytol* 15, 17-28.

Penzel, R., Oswald, R., Chen, Y., Tacke, L. and Grunz, H. (1997) Characterization and early embryonic expression of a neural specific transcription factor xSOX3 in *Xenopus laevis*. *Int J Dev Biol* 41, 667-77.

Pera, E.M., Wessely, O., Li, S.Y. and De Robertis, E.M. (2001) Neural and head induction by insulin-like growth factor signals. *Dev Cell* 1, 655-65.

Perea-Gomez, A., Rhinn, M. and Ang, S.L. (2001) Role of the anterior visceral endoderm in restricting posterior signals in the mouse embryo. *Int J Dev Biol* 45, 311-20.

Piccolo, S., Agius, E., Leyns, L., Bhattacharyya, S., Grunz, H., Bouwmeester, T. and De Robertis, E.M. (1999) The head inducer Cerberus is a multifunctional antagonist of Nodal, BMP and Wnt signals. *Nature* 397, 707-10.

Placzek, M., Tessier-Lavigne, M., Yamada, T., Jessell, T. and Dodd, J. (1990) Mesodermal control of neural cell identity: floor plate induction by the notochord. *Science* 250, 985-8.

Poliak, S., Gollan, L., Martinez, R., Custer, A., Einheber, S., Salzer, J.L., Trimmer, J.S., Shrager, P. and Peles, E. (1999) Caspr2, a new member of the neuixin superfamily, is localized at the juxtaparanodes of myelinated axons and associates with K⁺ channels. *Neuron* 24, 1037-47.

Poliak, S., Matlis, S., Ullmer, C., Scherer, S.S. and Peles, E. (2002) Distinct claudins and associated PDZ proteins form different autotypic tight junctions in myelinating Schwann cells. *J Cell Biol* 159, 361-72.

Poliak, S. and Peles, E. (2003) The local differentiation of myelinated axons at nodes of Ranvier. *Nat Rev Neurosci* 4, 968-80.

Poliak, S., Salomon, D., Elhanany, H., Sabanay, H., Kiernan, B., Pevny, L., Stewart, C.L., Xu, X., Chiu, S.Y., Shrager, P., Furley, A.J. and Peles, E. (2003) Juxtaparanodal clustering of Shaker-like K⁺ channels in myelinated axons depends on Caspr2 and TAG-1. *J Cell Biol* 162, 1149-60.

Popko, B., Puckett, C., Lai, E., Shine, H.D., Readhead, C., Takahashi, N., Hunt, S.W., 3rd, Sidman, R.L. and Hood, L. (1987) Myelin deficient mice: expression of myelin basic protein and generation of mice with varying levels of myelin. *Cell* 48, 713-21.

Popperl, H., Rikhof, H., Chang, H., Haffter, P., Kimmel, C.B. and Moens, C.B. (2000) *lazarus* is a novel pbx gene that globally mediates hox gene function in zebrafish. *Mol Cell* 6, 255-67.

Power, S.C. and Cereghini, S. (1996) Positive regulation of the vHNF1 promoter by the orphan receptors COUP-TF1/Ear3 and COUP-TFII/Arp1. *Mol Cell Biol* 16, 778-91.

Prince, V. (2002) The Hox Paradox: More complex(es) than imagined. *Dev Biol.* 249, 1-15.

- Prince, V. and Lumsden, A. (1994) *Hoxa-2* expression in normal and transposed rhombomeres: independent regulation in the neural tube and neural crest. *Development* 120, 911-23.
- Prince, V.E., Moens, C.B., Kimmel, C.B. and Ho, R.K. (1998) Zebrafish *hox* genes: expression in the hindbrain region of wild-type and mutants of the segmentation gene, *valentino*. *Development* 125, 393-406.
- Purves, D., Augustine, G.J., Fitzpatrick, D., Katz, L.C., LaMantia, A.S., McNamara, J.O., Williams, S.M. (2001), *Neuroscience* (Second Edition). Sinauer Associates Inc.
- Qin, P., Haberbush, J.M., Soprano, K.J. and Soprano, D.R. (2004) Retinoic acid regulates the expression of PBX1, PBX2, and PBX3 in P19 cells both transcriptionally and post-translationally. *J Cell Biochem* 92, 147-63.
- Qu, Z., Wolfrum, L.A., Svaren, J., Ehrengruber, M.U., Davidson, N. and Milbrandt, J. (1998) The transcriptional corepressor NAB2 inhibits NGF-induced differentiation of PC12 cells. *J Cell Biol* 142, 1075-82.
- Quattrini, A., Feltri, M.L., Previtali, S., Fasolini, M., Messing, A. and Wrabetz, L. (1999) Peripheral nerve dysmyelination due to P0 glycoprotein overexpression is dose-dependent. *Ann N Y Acad Sci* 883, 294-301.
- Raible, F. and Brand, M. (2001) Tight transcriptional control of the ETS domain factors *Erm* and *Pea3* by Fgf signaling during early zebrafish development. *Mech Dev* 107, 105-17.
- Ratcliffe, C.F., Westenbroek, R.E., Curtis, R. and Catterall, W.A. (2001) Sodium channel β 1 and β 3 subunits associate with neurofascin through their extracellular immunoglobulin-like domain. *J Cell Biol* 154, 427-34.
- Reid, E., Kloos, M., Ashley-Koch, A., Hughes, L., Bevan, S., Svenson, I.K., Graham, F.L., Gaskell, P.C., Dearlove, A., Pericak-Vance, M.A., Rubinstein, D.C. and Marchuk, D.A. (2002) A kinesin heavy chain (*KIF5A*) mutation in hereditary spastic paraplegia (*SPG10*). *Am J Hum Genet* 71, 1189-94.
- Reijntjes, S., Blentic, A., Gale, E. and Maden, M. (2005) The control of morphogen signalling: regulation of the synthesis and catabolism of retinoic acid in the developing embryo. *Dev Biol* 285, 224-37.
- Reim, G. and Brand, M. (2002) *Spiel-ohne-grenzen/pou2* mediates regional competence to respond to Fgf8 during zebrafish early neural development. *Development* 129, 917-33.
- Reynolds, M.L., Fitzgerald, M. and Benowitz, L.I. (1991) GAP-43 expression in developing cutaneous and muscle nerves in the rat hindlimb. *Neuroscience* 41, 201-11.
- Rhinn, M., Lun, K., Amores, A., Yan, Y.L., Postlethwait, J.H. and Brand, M. (2003) Cloning, expression and relationship of zebrafish *gbx1* and *gbx2* genes to Fgf signaling. *Mech Dev* 120, 919-36.
- Ribes, V., Fraulob, V., Petkovich, M. and Dolle, P. (2007) The oxidizing enzyme CYP26a1 tightly regulates the availability of retinoic acid in the gastrulating mouse embryo to ensure proper head development and vasculogenesis. *Dev Dyn* 236, 644-53.
- Riethmacher, D., Sonnenberg-Riethmacher, E., Brinkmann, V., Yamaai, T., Lewin, G.R. and Birchmeier, C. (1997) Severe neuropathies in mice with targeted mutations in the ErbB3 receptor. *Nature* 389, 725-30.
- Rijli, F.M., Mark, M., Lakkaraju, S., Dierich, A., Dolle, P. and Chambon, P. (1993) A homeotic transformation is generated in the rostral branchial region of the head by disruption of *Hoxa-2*, which acts as a selector gene. *Cell* 75, 1333-49.
- Riley, B.B., Chiang, M.Y., Storch, E.M., Heck, R., Buckles, G.R. and Lekven, A.C. (2004) Rhombomere boundaries are Wnt signaling centers that regulate metameric patterning in the zebrafish hindbrain. *Dev Dyn* 231, 278-91.
- Rios, J.C., Melendez-Vasquez, C.V., Einheber, S., Lustig, M., Grumet, M., Hemperly, J., Peles, E. and Salzer, J.L. (2000) Contactin-associated protein (Caspr) and contactin form a complex that is targeted to the paranodal junctions during myelination. *J Neurosci* 20, 8354-64.

- Robinson, V., Smith, A., Flenniken, A.M. and Wilkinson, D.G. (1997) Roles of Eph receptors and ephrins in neural crest pathfinding. *Cell Tissue Res* 290, 265-74.
- Rosenbluth, J. (1976) Intramembranous particle distribution at the node of Ranvier and adjacent axolemma in myelinated axons of the frog brain. *J Neurocytol* 5, 731-45.
- Ross, A.C. (1993) Cellular metabolism and activation of retinoids: roles of cellular retinoid-binding proteins. *Faseb J* 7, 317-27.
- Rossel, M. and Capecchi, M.R. (1999) Mice mutant for both *Hoxa1* and *Hoxb1* show extensive remodeling of the hindbrain and defects in craniofacial development. *Development* 126, 5027-40.
- Roy, N.M. and Sagerstrom, C.G. (2004) An early Fgf signal required for gene expression in the zebrafish hindbrain primordium. *Brain Res Dev Brain Res* 148, 27-42.
- Ruiz i Altaba, A. (1999) Gli proteins and Hedgehog signaling: development and cancer. *Trends Genet* 15, 418-25.
- Russo, M.W., Matheny, C. and Milbrandt, J. (1993) Transcriptional activity of the zinc finger protein NGFI-A is influenced by its interaction with a cellular factor. *Mol Cell Biol* 13, 6858-65.
- Russo, M.W., Severson, B.R. and Milbrandt, J. (1995) Identification of NAB1, a repressor of NGFI-A- and Krox20-mediated transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 6873-7.
- Sadoul, R., Fahrig, T., Bartsch, U. and Schachner, M. (1990) Binding properties of liposomes containing the myelin-associated glycoprotein MAG to neural cell cultures. *J Neurosci Res* 25, 1-13.
- Safford, M., Collins, S., Lutz, M.A., Allen, A., Huang, C.T., Kowalski, J., Blackford, A., Horton, M.R., Drake, C., Schwartz, R.H. and Powell, J.D. (2005) Egr-2 and Egr-3 are negative regulators of T cell activation. *Nat Immunol* 6, 472-80.
- Saito, F., Moore, S.A., Barresi, R., Henry, M.D., Messing, A., Ross-Barta, S.E., Cohn, R.D., Williamson, R.A., Sluka, K.A., Sherman, D.L., Brophy, P.J., Schmelzer, J.D., Low, P.A., Wrabetz, L., Feltri, M.L. and Campbell, K.P. (2003) Unique role of dystroglycan in peripheral nerve myelination, nodal structure, and sodium channel stabilization. *Neuron* 38, 747-58.
- Sakai, D., Suzuki, T., Osumi, N. and Wakamatsu, Y. (2006) Cooperative action of Sox9, Snail2 and PKA signaling in early neural crest development. *Development* 133, 1323-33.
- Sakai, Y., Meno, C., Fujii, H., Nishino, J., Shiratori, H., Saijoh, Y., Rossant, J. and Hamada, H. (2001) The retinoic acid-inactivating enzyme CYP26 is essential for establishing an uneven distribution of retinoic acid along the antero-posterior axis within the mouse embryo. *Genes Dev* 15, 213-25.
- Salzer, J.L. (2003) Polarized domains of myelinated axons. *Neuron*. 40, 297-318.
- Salzer, J.L., Williams, A.K., Glaser, L. and Bunge, R.P. (1980) Studies of Schwann cell proliferation. II. Characterization of the stimulation and specificity of the response to a neurite membrane fraction. *J Cell Biol* 84, 753-66.
- Sasai, Y., Lu, B., Steinbeisser, H. and De Robertis, E.M. (1995) Regulation of neural induction by the Chd and Bmp-4 antagonistic patterning signals in *Xenopus*. *Nature* 376, 333-6.
- Satake, M., Yoshimura, T., Ohnishi, A. and Kobayashi, T. (1997) Connexin32 gene expression in rat sciatic nerves and cultured Schwann cells. *Dev Neurosci* 19, 189-95.
- Scherer, S.S., Deschenes, S.M., Xu, Y.T., Grinspan, J.B., Fischbeck, K.H. and Paul, D.L. (1995) Connexin32 is a myelin-related protein in the PNS and CNS. *J Neurosci* 15, 8281-94.
- Scherer, S.S., Salzer, J.L. (2001) Glial cell development. Oxford University Press.

- Scherer, S.S., Wang, D.Y., Kuhn, R., Lemke, G., Wrabetz, L. and Kamholz, J. (1994) Axons regulate Schwann cell expression of the POU transcription factor SCIP. *J Neurosci* 14, 1930-42.
- Schilling, T.F., Prince, V. and Ingham, P.W. (2001) Plasticity in zebrafish hox expression in the hindbrain and cranial neural crest. *Dev Biol* 231, 201-16.
- Schmid, R.S., McGrath, B., Berechid, B.E., Boyles, B., Marchionni, M., Sestan, N. and Anton, E.S. (2003) Neuregulin 1-erbB2 signaling is required for the establishment of radial glia and their transformation into astrocytes in cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 4251-6.
- Schneider-Maunoury, S., Gilardi-Hebenstreit, P. and Charnay, P. (1998) How to build a vertebrate hindbrain. Lessons from genetics. *C R Acad Sci III* 321, 819-34.
- Schneider-Maunoury, S., Seitanidou, T., Charnay, P. and Lumsden, A. (1997) Segmental and neuronal architecture of the hindbrain of Krox-20 mouse mutants. *Development* 124, 1215-26.
- Schneider-Maunoury, S., Topilko, P., Seitandou, T., Levi, G., Cohen-Tannoudji, M., Pournin, S., Babinet, C. and Charnay, P. (1993) Disruption of Krox-20 results in alteration of rhombomeres 3 and 5 in the developing hindbrain. *Cell* 75, 1199-214.
- Sechrist, J., Serbedzija, G.N., Scherson, T., Fraser, S.E. and Bronner-Fraser, M. (1993) Segmental migration of the hindbrain neural crest does not arise from its segmental generation. *Development* 118, 691-703.
- Sepp, K.J., Schulte, J. and Auld, V.J. (2001) Peripheral glia direct axon guidance across the CNS/PNS transition zone. *Dev Biol* 238, 47-63.
- Serbedzija, G.N., Bronner-Fraser, M. and Fraser, S.E. (1992) Vital dye analysis of cranial neural crest cell migration in the mouse embryo. *Development* 116, 297-307.
- Serpente, P., Tumpel, S., Ghyselinck, N.B., Niederreither, K., Wiedemann, L.M., Dolle, P., Chambon, P., Krumlauf, R. and Gould, A.P. (2005) Direct crossregulation between retinoic acid receptor {beta} and Hox genes during hindbrain segmentation. *Development* 132, 503-13.
- Sevetson, B.R., Svaren, J. and Milbrandt, J. (2000) A novel activation function for NAB proteins in EGR-dependent transcription of the luteinizing hormone beta gene. *J Biol Chem* 275, 9749-57.
- Sham, M.H., Vesque, C., Nonchev, S., Marshall, H., Frain, M., Gupta, R.D., Whiting, J., Wilkinson, D., Charnay, P. and Krumlauf, R. (1993) The zinc finger gene Krox20 regulates HoxB2 (Hox2.8) during hindbrain segmentation. *Cell* 72, 183-96.
- Shao, H., Kono, D.H., Chen, L.Y., Rubin, E.M. and Kaye, J. (1997) Induction of the early growth response (Egr) family of transcription factors during thymic selection. *J Exp Med* 185, 731-44.
- Sharghi-Namini, S., Turmaine, M., Meier, C., Sahni, V., Umehara, F., Jessen, K.R. and Mirsky, R. (2006) The structural and functional integrity of peripheral nerves depends on the glial-derived signal desert hedgehog. *J Neurosci* 26, 6364-76.
- Sherbet, G.V. and Lakshmi, M.S. (1967) Loss of neural inductive capacity of the chick primary organizer by treatment with histone and its restoration by follicle-stimulating hormone. *Nature* 215, 1089-90.
- Sherman, D.L. and Brophy, P.J. (2005) Mechanisms of axon ensheathment and myelin growth. *Nat Rev Neurosci* 6, 683-90.
- Sherman, D.L., Fabrizi, C., Gillespie, C.S. and Brophy, P.J. (2001) Specific disruption of a schwann cell dystrophin-related protein complex in a demyelinating neuropathy. *Neuron* 30, 677-87.
- Sherman, D.L., Tait, S., Melrose, S., Johnson, R., Zonta, B., Court, F.A., Macklin, W.B., Meek, S., Smith, A.J., Cottrell, D.F. and Brophy, P.J. (2005) Neurofascins are required to establish axonal domains for saltatory conduction. *Neuron* 48, 737-42.

- Sherman, L., Stocker, K.M., Morrison, R. and Ciment, G. (1993) Basic fibroblast growth factor (bFGF) acts intracellularly to cause the transdifferentiation of avian neural crest-derived Schwann cell precursors into melanocytes. *Development* 118, 1313-26.
- Shih, J. and Fraser, S.E. (1996) Characterizing the zebrafish organizer: microsurgical analysis at the early-shield stage. *Development* 122, 1313-22.
- Shimamura, K. and Rubenstein, J.L. (1997) Inductive interactions direct early regionalization of the mouse forebrain. *Development* 124, 2709-18.
- Shimizu, T., Yamanaka, Y., Ryu, S.L., Hashimoto, H., Yabe, T., Hirata, T., Bae, Y.K., Hibi, M. and Hirano, T. (2000) Cooperative roles of Bozozok/Dharma and Nodal-related proteins in the formation of the dorsal organizer in zebrafish. *Mech Dev* 91, 293-303.
- Shuai, K. (2000) Modulation of STAT signaling by STAT-interacting proteins. *Oncogene* 19, 2638-44.
- Shy, M.E. (2004) Charcot-Marie-Tooth disease: an update. *Curr Opin Neurol* 17, 579-85.
- Silverman, E.S., Du, J., Williams, A.J., Wadgaonkar, R., Drazen, J.M. and Collins, T. (1998) cAMP-response-element-binding-protein-binding protein (CBP) and p300 are transcriptional co-activators of early growth response factor-1 (Egr-1). *Biochem J* 336 (Pt 1), 183-9.
- Simon, H., Hornbruch, A. and Lumsden, A. (1995) Independent assignment of antero-posterior and dorso-ventral positional values in the developing chick hindbrain. *Curr Biol* 5, 205-14.
- Sirbu, I.O., Gresh, L., Barra, J. and Duester, G. (2005) Shifting boundaries of retinoic acid activity control hindbrain segmental gene expression. *Development* 132, 2611-22.
- Smith, A. and Graham, A. (2001) Restricting Bmp-4 mediated apoptosis in hindbrain neural crest. *Dev Dyn* 220, 276-83.
- Smith, A., Robinson, V., Patel, K. and Wilkinson, D.G. (1997) The EphA4 and EphB1 receptor tyrosine kinases and ephrin-B2 ligand regulate targeted migration of branchial neural crest cells. *Curr Biol* 7, 561-70.
- Spencer, T., Domeniconi, M., Cao, Z. and Filbin, M.T. (2003) New roles for old proteins in adult CNS axonal regeneration. *Curr Opin Neurobiol* 13, 133-9.
- Srinivasan, R., Mager, G.M., Ward, R.M., Mayer, J. and Svaren, J. (2006) NAB2 represses transcription by interacting with the CHD4 subunit of the nucleosome remodeling and deacetylase (NuRD) complex. *J Biol Chem* 281, 15129-37.
- Stern, C.D. (2001) Initial patterning of the central nervous system: how many organizers? *Nat Rev Neurosci* 2, 92-8.
- Stewart, H.J., Bradke, F., Tabernero, A., Morrell, D., Jessen, K.R. and Mirsky, R. (1996) Regulation of rat Schwann cell P0 expression and DNA synthesis by insulin-like growth factors in vitro. *Eur J Neurosci* 8, 553-64.
- Stewart, H.J., Brennan, A., Rahman, M., Zoidl, G., Mitchell, P.J., Jessen, K.R. and Mirsky, R. (2001) Developmental regulation and overexpression of the transcription factor AP-2, a potential regulator of the timing of Schwann cell generation. *Eur J Neurosci* 14, 363-72.
- Storey, K.G., Goriely, A., Sargent, C.M., Brown, J.M., Burns, H.D., Abud, H.M. and Heath, J.K. (1998) Early posterior neural tissue is induced by FGF in the chick embryo. *Development* 125, 473-84.
- Streit, A., Berliner, A.J., Papanayotou, C., Sirulnik, A. and Stern, C.D. (2000) Initiation of neural induction by FGF signalling before gastrulation. *Nature* 406, 74-8.
- Studer, M., Gavalas, A., Marshall, H., Ariza-McNaughton, L., Rijli, F.M., Chambon, P. and Krumlauf, R. (1998) Genetic interactions between Hoxa1 and Hoxb1 reveal new roles in regulation of early hindbrain patterning. *Development* 125, 1025-36.

- Studer, M., Lumsden, A., Ariza-McNaughton, L., Bradley, A. and Krumlauf, R. (1996) Altered segmental identity and abnormal migration of motor neurons in mice lacking Hoxb-1. *Nature* 384, 630-4.
- Sukhatme, V.P., Cao, X.M., Chang, L.C., Tsai-Morris, C.H., Stamenkovich, D., Ferreira, P.C., Cohen, D.R., Edwards, S.A., Shows, T.B., Curran, T. and et al. (1988) A zinc finger-encoding gene coregulated with c-fos during growth and differentiation, and after cellular depolarization. *Cell* 53, 37-43.
- Sun, Z. and Hopkins, N. (2001) vhnf1, the MODY5 and familial GCKD-associated gene, regulates regional specification of the zebrafish gut, pronephros, and hindbrain. *Genes Dev* 15, 3217-29.
- Suter, U., Moskow, J.J., Welcher, A.A., Snipes, G.J., Kosaras, B., Sidman, R.L., Buchberg, A.M. and Shooter, E.M. (1992) 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 U S A* 89, 4382-6.
- Suzuki, N., Rohdewohld, H., Neuman, T., Gruss, P. and Scholer, H.R. (1990) Oct-6: a POU transcription factor expressed in embryonal stem cells and in the developing brain. *Embo J* 9, 3723-32.
- Svaren, J., Sevetson, B.R., Apel, E.D., Zimonjic, D.B., Popescu, N.C. and Milbrandt, J. (1996) NAB2, a corepressor of NGFI-A (Egr-1) and Krox20, is induced by proliferative and differentiative stimuli. *Mol Cell Biol* 16, 3545-53.
- Svaren, J., Sevetson, B.R., Golda, T., Stanton, J.J., Swirnov, A.H. and Milbrandt, J. (1998) Novel mutants of NAB corepressors enhance activation by Egr transactivators. *Embo J* 17, 6010-9.
- Swirnov, A.H., Apel, E.D., Svaren, J., Sevetson, B.R., Zimonjic, D.B., Popescu, N.C. and Milbrandt, J. (1998) Nab1, a corepressor of NGFI-A (Egr-1), contains an active transcriptional repression domain. *Mol Cell Biol* 18, 512-24.
- Syroid, D.E., Maycox, P.J., Soilu-Hanninen, M., Petratos, S., Bucci, T., Burrola, P., Murray, S., Cheema, S., Lee, K.F., Lemke, G. and Kilpatrick, T.J. (2000) Induction of postnatal schwann cell death by the low-affinity neurotrophin receptor in vitro and after axotomy. *J Neurosci* 20, 5741-7.
- Tait, S., Gunn-Moore, F., Collinson, J.M., Huang, J., Lubetzki, C., Pedraza, L., Sherman, D.L., Colman, D.R. and Brophy, P.J. (2000) An oligodendrocyte cell adhesion molecule at the site of assembly of the paranodal axo-glial junction. *J Cell Biol* 150, 657-66.
- Tam, P.P. and Steiner, K.A. (1999) Anterior patterning by synergistic activity of the early gastrula organizer and the anterior germ layer tissues of the mouse embryo. *Development* 126, 5171-9.
- Tao-Cheng, J.H. and Rosenbluth, J. (1983) Axolemmal differentiation in myelinated fibers of rat peripheral nerves. *Brain Res* 285, 251-63.
- Taveggia, C., Pizzagalli, A., Fagiani, E., Messing, A., Feltri, M.L. and Wrabetz, L. (2004) Characterization of a Schwann cell enhancer in the myelin basic protein gene. *J Neurochem* 91, 813-24.
- Taveggia, C., Zanazzi, G., Petrylak, A., Yano, H., Rosenbluth, J., Einheber, S., Xu, X., Esper, R.M., Loeb, J.A., Shrager, P., Chao, M.V., Falls, D.L., Role, L. and Salzer, J.L. (2005) Neuregulin-1 type III determines the ensheathment fate of axons. *Neuron* 47, 681-94.
- Tendeng, C. and Houart, C. (2006) Cloning and embryonic expression of five distinct sfrp genes in the zebrafish *Danio rerio*. *Gene Expr Patterns* 6, 761-71.
- Tepass, U., Tanentzapf, G., Ward, R. and Fehon, R. (2001) Epithelial cell polarity and cell junctions in *Drosophila*. *Annu Rev Genet* 35, 747-84.
- Tetzlaff, W. (1982) Tight junction contact events and temporary gap junctions in the sciatic nerve fibres of the chicken during Wallerian degeneration and subsequent regeneration. *J Neurocytol* 11, 839-58.

- Theil, T., Frain, M., Gilardi-Hebenstreit, P., Flenniken, A., Charnay, P. and Wilkinson, D.G. (1998) Segmental expression of the EphA4 (Sek-1) receptor tyrosine kinase in the hindbrain is under direct transcriptional control of Krox-20. *Development* 125, 443-52.
- Thiery, J.P., Duband, J.L. and Tucker, G.C. (1985) Cell migration in the vertebrate embryo: role of cell adhesion and tissue environment in pattern formation. *Annu Rev Cell Biol* 1, 91-113.
- Thisse, B. and Thisse, C. (2005) Functions and regulations of fibroblast growth factor signaling during embryonic development. *Dev Biol* 287, 390-402.
- Thomas, P. and Beddington, R. (1996) Anterior primitive endoderm may be responsible for patterning the anterior neural plate in the mouse embryo. *Curr Biol* 6, 1487-96.
- Timmerman, V., De Jonghe, P., Ceuterick, C., De Vriendt, E., Lofgren, A., Nelis, E., Warner, L.E., Lupski, J.R., Martin, J.J. and Van Broeckhoven, C. (1999) Novel missense mutation in the early growth response 2 gene associated with Dejerine-Sottas syndrome phenotype. *Neurology* 52, 1827-32.
- Tolwani, R.J., Cosgaya, J.M., Varma, S., Jacob, R., Kuo, L.E. and Shooter, E.M. (2004) BDNF overexpression produces a long-term increase in myelin formation in the peripheral nervous system. *J Neurosci Res* 77, 662-9.
- Topilko, P., Levi, G., Merlo, G., Mantero, S., Desmarquet, C., Mancardi, G. and Charnay, P. (1997) Differential regulation of the zinc finger genes Krox-20 and Krox-24 (Egr-1) suggests antagonistic roles in Schwann cells. *J Neurosci Res* 50, 702-12.
- Topilko, P., Schneider-Maunoury, S., Levi, G., Baron-Van Evercooren, A., Chennoufi, A.B., Seitanidou, T., Babinet, C. and Charnay, P. (1994) Krox-20 controls myelination in the peripheral nervous system. *Nature* 371, 796-9.
- Trachtenberg, J.T. and Thompson, W.J. (1996) Schwann cell apoptosis at developing neuromuscular junctions is regulated by glial growth factor. *Nature* 379, 174-7.
- Trainor, P. and Krumlauf, R. (2000a) Plasticity in mouse neural crest cells reveals a new patterning role for cranial mesoderm. *Nat Cell Biol* 2, 96-102.
- Trainor, P.A. (2005) Specification of neural crest cell formation and migration in mouse embryos. *Semin Cell Dev Biol* 16, 683-93.
- Trainor, P.A. and Krumlauf, R. (2000b) Patterning the cranial neural crest: hindbrain segmentation and Hox gene plasticity. *Nat Rev Neurosci* 1, 116-24.
- Trainor, P.A., Sobieszczuk, D., Wilkinson, D. and Krumlauf, R. (2002) Signalling between the hindbrain and paraxial tissues dictates neural crest migration pathways. *Development* 129, 433-42.
- Traka, M., Dupree, J.L., Popko, B. and Karagogeos, D. (2002) The neuronal adhesion protein TAG-1 is expressed by Schwann cells and oligodendrocytes and is localized to the juxtaparanodal region of myelinated fibers. *J Neurosci* 22, 3016-24.
- Trapp, B.D., Andrews, S.B., Wong, A., O'Connell, M. and Griffin, J.W. (1989) Co-localization of the myelin-associated glycoprotein and the microfilament components, F-actin and spectrin, in Schwann cells of myelinated nerve fibres. *J Neurocytol* 18, 47-60.
- Tribulo, C., Aybar, M.J., Nguyen, V.H., Mullins, M.C. and Mayor, R. (2003) Regulation of Msx genes by a Bmp gradient is essential for neural crest specification. *Development* 130, 6441-52.
- Uehara, M., Yashiro, K., Mamiya, S., Nishino, J., Chambon, P., Dolle, P. and Sakai, Y. (2007) CYP26A1 and CYP26C1 cooperatively regulate anterior-posterior patterning of the developing brain and the production of migratory cranial neural crest cells in the mouse. *Dev Biol* 302, 399-411.
- Vaage, S. (1969) The segmentation of the primitive neural tube in chick embryos (*Gallus domesticus*). *Adv. Anat. Embryol. Cell. Biol.* 41.

- Vabnick, I., Novakovic, S.D., Levinson, S.R., Schachner, M. and Shrager, P. (1996) The clustering of axonal sodium channels during development of the peripheral nervous system. *J Neurosci* 16, 4914-22.
- Vabnick, I., Trimmer, J.S., Schwarz, T.L., Levinson, S.R., Risal, D. and Shrager, P. (1999) Dynamic potassium channel distributions during axonal development prevent aberrant firing patterns. *J Neurosci* 19, 747-58.
- Valentijn, L.J., Baas, F., Wolterman, R.A., Hoogendijk, J.E., van den Bosch, N.H., Zorn, I., Gabreels-Festen, A.W., de Visser, M. and Bolhuis, P.A. (1992) Identical point mutations of PMP-22 in Trembler-J mouse and Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Nat Genet* 2, 288-91.
- Vallat, J.M. (2003) Dominantly inherited peripheral neuropathies. *J Neuropathol Exp Neurol* 62, 699-714.
- Vallat, J.M., Grid, D., Magdelaine, C., Sturtz, F. and Tazir, M. (2004) Autosomal recessive forms of Charcot-Marie-Tooth disease. *Curr Neurol Neurosci Rep* 4, 413-9.
- Veitch, E., Begbie, J., Schilling, T.F., Smith, M.M. and Graham, A. (1999) Pharyngeal arch patterning in the absence of neural crest. *Curr Biol* 9, 1481-4.
- Venken, K., Di Maria, E., Bellone, E., Balestra, P., Cassandrini, D., Mandich, P., De Jonghe, P., Timmerman, V. and Svaren, J. (2002) Search for mutations in the EGR2 corepressor proteins, NAB1 and NAB2, in human peripheral neuropathies. *Neurogenetics* 4, 37-41.
- Vermeren, M., Maro, G.S., Bron, R., McGonnell, I.M., Charnay, P., Topilko, P. and Cohen, J. (2003) Integrity of developing spinal motor columns is regulated by neural crest derivatives at motor exit points. *Neuron* 37, 403-15.
- Vesque, C. and Charnay, P. (1992) Mapping functional regions of the segment-specific transcription factor Krox-20. *Nucleic Acids Res* 20, 2485-92.
- Vieira, C., Garda, A.L., Shimamura, K. and Martinez, S. (2005) Thalamic development induced by Shh in the chick embryo. *Dev Biol* 284, 351-63.
- Vlachakis, N., Choe, S.K. and Sagerstrom, C.G. (2001) Meis3 synergizes with Pbx4 and Hoxb1b in promoting hindbrain fates in the zebrafish. *Development* 128, 1299-312.
- Voiculescu, O., Charnay, P. and Schneider-Maunoury, S. (2000) Expression pattern of a Krox-20/Cre knock-in allele in the developing hindbrain, bones, and peripheral nervous system. *Genesis* 26, 123-6.
- Voiculescu, O., Taillebourg, E., Pujades, C., Kress, C., Buart, S., Charnay, P. and Schneider-Maunoury, S. (2001) Hindbrain patterning: Krox20 couples segmentation and specification of regional identity. *Development* 128, 4967-78.
- Waehneltd, T.V. (1990) Phylogeny of myelin proteins. *Ann N Y Acad Sci* 605, 15-28.
- Wakamatsu, Y., Maynard, T.M. and Weston, J.A. (2000) Fate determination of neural crest cells by NOTCH-mediated lateral inhibition and asymmetrical cell division during gangliogenesis. *Development* 127, 2811-21.
- Walshe, J., Maroon, H., McGonnell, I.M., Dickson, C. and Mason, I. (2002) Establishment of hindbrain segmental identity requires signaling by FGF3 and FGF8. *Curr Biol* 12, 1117-23.
- Wang, C., Dostanic, S., Servant, N. and Chalifour, L.E. (2005) Egr-1 negatively regulates expression of the sodium-calcium exchanger-1 in cardiomyocytes in vitro and in vivo. *Cardiovasc Res* 65, 187-94.
- Wang, C.C. (2004/2005) Development of the Rhombencephalon: Molecular Evolution and Genetic Regulation. *Neuroembryol and Aging* 3, 78-91.
- Wang, H., Kunkel, D.D., Martin, T.M., Schwartzkroin, P.A. and Tempel, B.L. (1993) Heteromultimeric K⁺ channels in terminal and juxtaparanodal regions of neurons. *Nature* 365, 75-9.

- Warner, L.E., Mancias, P., Butler, I.J., McDonald, C.M., Keppen, L., Koob, K.G. and Lupski, J.R. (1998) Mutations in the early growth response 2 (EGR2) gene are associated with hereditary myelinopathies. *Nat Genet* 18, 382-4.
- Warner, L.E., Svaren, J., Milbrandt, J. and Lupski, J.R. (1999) Functional consequences of mutations in the early growth response 2 gene (EGR2) correlate with severity of human myelinopathies. *Hum Mol Genet* 8, 1245-51.
- Waskiewicz, A.J., Rikhof, H.A., Hernandez, R.E. and Moens, C.B. (2001) Zebrafish Meis functions to stabilize Pbx proteins and regulate hindbrain patterning. *Development* 128, 4139-51.
- Waskiewicz, A.J., Rikhof, H.A. and Moens, C.B. (2002) Eliminating zebrafish pbx proteins reveals a hindbrain ground state. *Dev Cell* 3, 723-33.
- Wassarman, K.M., Lewandoski, M., Campbell, K., Joyner, A.L., Rubenstein, J.L., Martinez, S. and Martin, G.R. (1997) Specification of the anterior hindbrain and establishment of a normal mid/hindbrain organizer is dependent on Gbx2 gene function. *Development* 124, 2923-34.
- Wegner, M., Drolet, D.W. and Rosenfeld, M.G. (1993) POU-domain proteins: structure and function of developmental regulators. *Curr Opin Cell Biol* 5, 488-98.
- Weiner, J.A. and Chun, J. (1999) Schwann cell survival mediated by the signaling phospholipid lysophosphatidic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 5233-8.
- Weinstein, D.E., Burrola, P.G. and Lemke, G. (1995) Premature Schwann cell differentiation and hypermyelination in mice expressing a targeted antagonist of the POU transcription factor SCIP. *Mol Cell Neurosci* 6, 212-29.
- Weston, A.D., Blumberg, B. and Underhill, T.M. (2003) Active repression by unliganded retinoid receptors in development: less is sometimes more. *J Cell Biol* 161, 223-8.
- White, J.C., Shankar, V.N., Highland, M., Epstein, M.L., DeLuca, H.F. and Clagett-Dame, M. (1998) Defects in embryonic hindbrain development and fetal resorption resulting from vitamin A deficiency in the rat are prevented by feeding pharmacological levels of all-trans-retinoic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 13459-64.
- White, P.M., Morrison, Sean J., Orimoto, Kenji, Kubu, Chris J., Verdi, Joseph M., Anderson, David J. (2001) Neural Crest Stem Cells Undergo Cell-Intrinsic Developmental Changes in Sensitivity to Instructive Differentiation Signals. *Neuron* 29, 57-71.
- Wiellette, E.L. and Sive, H. (2003) *vhnf1* and Fgf signals synergize to specify rhombomere identity in the zebrafish hindbrain. *Development* 130, 3821-9.
- Wiggins, R.C., Benjamins, J.A. and Morell, P. (1975) Appearance of myelin proteins in rat sciatic nerve during development. *Brain Res* 89, 99-106.
- Wilkinson, D.G., Bhatt, S., Chavrier, P., Bravo, R. and Charnay, P. (1989a) Segment-specific expression of a zinc-finger gene in the developing nervous system of the mouse. *Nature* 337, 461-4.
- Wilkinson, D.G., Bhatt, S., Cook, M., Boncinelli, E. and Krumlauf, R. (1989b) Segmental expression of Hox-2 homoeobox-containing genes in the developing mouse hindbrain. *Nature* 341, 405-9.
- Williams, A.C. and Brophy, P.J. (2002) The function of the Periaxin gene during nerve repair in a model of CMT4F. *J Anat* 200, 323-30.
- Wilson, L. and Maden, M. (2005) The mechanisms of dorsoventral patterning in the vertebrate neural tube. *Dev Biol* 282, 1-13.
- Wilson, P.A. and Hemmati-Brivanlou, A. (1995) Induction of epidermis and inhibition of neural fate by Bmp-4. *Nature* 376, 331-3.

- Wilson, S.I. and Edlund, T. (2001) Neural induction: toward a unifying mechanism. *Nat Neurosci* 4 Suppl, 1161-8.
- Wilson, S.I., Graziano, E., Harland, R., Jessell, T.M. and Edlund, T. (2000) An early requirement for FGF signalling in the acquisition of neural cell fate in the chick embryo. *Curr Biol* 10, 421-9.
- Wilson, S.I., Rydstrom, A., Trimborn, T., Willert, K., Nusse, R., Jessell, T.M. and Edlund, T. (2001) The status of Wnt signalling regulates neural and epidermal fates in the chick embryo. *Nature* 411, 325-30.
- Wilson, S.W. and Rubenstein, J.L. (2000) Induction and dorsoventral patterning of the telencephalon. *Neuron* 28, 641-51.
- Winseck, A.K., Caldero, J., Ciutat, D., Prevette, D., Scott, S.A., Wang, G., Esquerda, J.E. and Oppenheim, R.W. (2002) In vivo analysis of Schwann cell programmed cell death in the embryonic chick: regulation by axons and glial growth factor. *J Neurosci* 22, 4509-21.
- Wizenmann, A. and Lumsden, A. (1997) Segregation of rhombomeres by differential chemoaffinity. *Mol Cell Neurosci* 9, 448-59.
- Woldeyesus, M.T., Britsch, S., Riethmacher, D., Xu, L., Sonnenberg-Riethmacher, E., Abou-Rebyeh, F., Harvey, R., Caroni, P. and Birchmeier, C. (1999) Peripheral nervous system defects in *erbB2* mutants following genetic rescue of heart development. *Genes Dev* 13, 2538-48.
- Wolpowitz, D., Mason, T.B., Dietrich, P., Mendelsohn, M., Talmage, D.A. and Role, L.W. (2000) Cysteine-rich domain isoforms of the neuregulin-1 gene are required for maintenance of peripheral synapses. *Neuron* 25, 79-91.
- Woodhoo, A., Dean, C.H., Droggiti, A., Mirsky, R. and Jessen, K.R. (2004) The trunk neural crest and its early glial derivatives: a study of survival responses, developmental schedules and autocrine mechanisms. *Mol Cell Neurosci* 25, 30-41.
- Wrabetz, L., Feltri, M.L., Quattrini, A., Imperiale, D., Previtali, S., D'Antonio, M., Martini, R., Yin, X., Trapp, B.D., Zhou, L., Chiu, S.Y. and Messing, A. (2000) P(0) glycoprotein overexpression causes congenital hypomyelination of peripheral nerves. *J Cell Biol* 148, 1021-34.
- Wu, R., Jurek, M., Sundarababu, S. and Weinstein, D.E. (2001) The POU gene *Brn-5* is induced by neuregulin and is restricted to myelinating Schwann cells. *Mol Cell Neurosci* 17, 683-95.
- Wurst, W. and Bally-Cuif, L. (2001) Neural plate patterning: upstream and downstream of the isthmus organizer. *Nat Rev Neurosci* 2, 99-108.
- Wysocka, J. and Herr, W. (2003) The herpes simplex virus VP16-induced complex: the makings of a regulatory switch. *Trends Biochem Sci* 28, 294-304.
- Wysocka, J., Myers, M.P., Laherty, C.D., Eisenman, R.N. and Herr, W. (2003) Human Sin3 deacetylase and trithorax-related Set1/Ash2 histone H3-K4 methyltransferase are tethered together selectively by the cell-proliferation factor HCF-1. *Genes Dev* 17, 896-911.
- Xia, C.H., Roberts, E.A., Her, L.S., Liu, X., Williams, D.S., Cleveland, D.W. and Goldstein, L.S. (2003) Abnormal neurofilament transport caused by targeted disruption of neuronal kinesin heavy chain KIF5A. *J Cell Biol* 161, 55-66.
- Xu, Q., Alldus, G., Holder, N. and Wilkinson, D.G. (1995) Expression of truncated *Sek-1* receptor tyrosine kinase disrupts the segmental restriction of gene expression in the *Xenopus* and zebrafish hindbrain. *Development* 121, 4005-16.
- Xu, Y., Swerlick, R.A., Sepp, N., Bosse, D., Ades, E.W. and Lawley, T.J. (1994) Characterization of expression and modulation of cell adhesion molecules on an immortalized human dermal microvascular endothelial cell line (HMEC-1). *J Invest Dermatol* 102, 833-7.

- Yamamoto, Y., Mizuno, R., Nishimura, T., Ogawa, Y., Yoshikawa, H., Fujimura, H., Adachi, E., Kishimoto, T., Yanagihara, T. and Sakoda, S. (1994) Cloning and expression of myelin-associated oligodendrocytic basic protein. A novel basic protein constituting the central nervous system myelin. *J Biol Chem* 269, 31725-30.
- Yan, X., Mouillet, J.F., Ou, Q. and Sadovsky, Y. (2003) A novel domain within the DEAD-box protein DP103 is essential for transcriptional repression and helicase activity. *Mol Cell Biol* 23, 414-23.
- Yang, D., Bierman, J., Tarumi, Y.S., Zhong, Y.P., Rangwala, R., Proctor, T.M., Miyagoe-Suzuki, Y., Takeda, S., Miner, J.H., Sherman, L.S., Gold, B.G. and Patton, B.L. (2005) Coordinate control of axon defasciculation and myelination by laminin-2 and -8. *J Cell Biol* 168, 655-66.
- Yin, X., Crawford, T.O., Griffin, J.W., Tu, P., Lee, V.M., Li, C., Roder, J. and Trapp, B.D. (1998) Myelin-associated glycoprotein is a myelin signal that modulates the caliber of myelinated axons. *J Neurosci* 18, 1953-62.
- Yoshida, M. and Colman, D.R. (1996) Parallel evolution and coexpression of the proteolipid proteins and protein zero in vertebrate myelin. *Neuron* 16, 1115-26.
- Yu, F.H. and Catterall, W.A. (2003) Overview of the voltage-gated sodium channel family. *Genome Biol* 4, 207.
- Yu, W.M., Feltri, M.L., Wrabetz, L., Strickland, S. and Chen, Z.L. (2005) Schwann cell-specific ablation of laminin gamma1 causes apoptosis and prevents proliferation. *J Neurosci* 25, 4463-72.
- Zeltser, L.M. (2005) Shh-dependent formation of the ZLI is opposed by signals from the dorsal diencephalon. *Development* 132, 2023-33.
- Zerucha, T. and Prince, V.E. (2001) Cloning and developmental expression of a zebrafish meis2 homeobox gene. *Mech Dev* 102, 247-50.
- Zhang, M., Kim, H.J., Marshall, H., Gendron-Maguire, M., Lucas, D.A., Baron, A., Gudas, L.J., Gridley, T., Krumlauf, R. and Grippio, J.F. (1994) Ectopic Hoxa-1 induces rhombomere transformation in mouse hindbrain. *Development* 120, 2431-42.
- Zhao, C., Takita, J., Tanaka, Y., Setou, M., Nakagawa, T., Takeda, S., Yang, H.W., Terada, S., Nakata, T., Takei, Y., Saito, M., Tsuji, S., Hayashi, Y. and Hirokawa, N. (2001) Charcot-Marie-Tooth disease type 2A caused by mutation in a microtubule motor KIF1Bbeta. *Cell* 105, 587-97.
- Zimmer, M., Palmer, A., Kohler, J. and Klein, R. (2003) EphB-ephrinB bi-directional endocytosis terminates adhesion allowing contact mediated repulsion. *Nat Cell Biol* 5, 869-78.
- Zorick, T.S., Syroid, D.E., Arroyo, E., Scherer, S.S. and Lemke, G. (1996) The transcription factors SCIP and Krox-20 mark distinct stages and cell fates in Schwann cell differentiation. *Mol Cell Neurosci* 8, 129-45.
- Zorick, T.S., Syroid, D.E., Brown, A., Gridley, T. and Lemke, G. (1999) Krox-20 controls SCIP expression, cell cycle exit and susceptibility to apoptosis in developing myelinating Schwann cells. *Development* 126, 1397-406.
- Zwart, R., Broos, L., Grosveld, G. and Meijer, D. (1996) The restricted expression pattern of the POU factor Oct-6 during early development of the mouse nervous system. *Mech Dev* 54, 185-94.