

## Trois gènes et quatre neuropathies périphériques myéliniques : premières corrélations génotype/phénotype

Danielle Pham-Dinh  
Françoise Blanquet-  
Grossard  
Catherine Ressot  
Roberto Bruzzone  
André Dautigny

Des anomalies des gènes codant pour PMP22, Cx32 et P0 sont responsables de la grande majorité des neuropathies périphériques myéliniques, formant un continuum neuropathologique : hypomyélinisation congénitale grave, syndrome de Déjerine-Sottas, forme précoce et sévère, maladie de Charcot-Marie-Tooth de type 1 ou liée à l'X, deux formes moins sévères, neuropathie héréditaire avec paralysies à la pression (HNPP) qui est la moins grave. La protéine P0 est une protéine d'adhérence cellulaire, impliquée dans la compaction de la myéline ; PMP22 est une protéine intégrale membranaire, présente aussi dans la myéline compacte, à la fonction encore inconnue ; la connexine Cx32 entre dans la constitution des jonctions communicantes qui permettent la diffusion radiale des molécules métaboliques et de signalisation au travers des couches de la myéline.

### ADRESSES

D. Pham-Dinh : *chargée de recherche à l'Inserm.*  
F. Blanquet-Grossard : *doctorante, boursière MRT.*  
A. Dautigny : *directeur de recherche au Cnrs.* Laboratoire de neurogénétique moléculaire, Ura 1488 Cnrs, Institut des Neurosciences, Université de Paris VI, bâtiment B, 3<sup>e</sup> étage, boîte courrier n° 12, 9, quai Saint-Bernard, 75252 Paris Cedex 05, France.  
C. Ressot : *doctorante, boursière ELA.*  
R. Bruzzone : *chargé de recherche à l'Institut Pasteur.* Unité de neurovirologie et régénération du système nerveux, Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, 75724 Paris Cedex 15, France.

### TIRÉS À PART

D. Pham-Dinh.

**D**es anomalies affectant trois gènes, PMP22, P0 et Cx32, sont responsables de la plupart des neuropathies périphériques myéliniques. Elles sont transmises selon le mode dominant et sont connues sous les noms de maladie de Charcot-Marie-Tooth de type 1 (CMT1) (*m/s* n° 8, vol. 7, p. 868), de maladie de Charcot-Marie-Tooth liée au chromosome X (CMTX), de syndrome de Déjerine-Sottas (DSS), de neuropathie tomaculaire familiale (HNPP, *hereditary*

*neuropathy with liability to pressure palsies*) et enfin de l'hypomyélinisation congénitale (HC). Le gène PMP22 (*peripheral myelin protein*), responsable de la CMT1A et de la HNPP, code pour une protéine intégrale de la membrane de 22 kDa (PMP22) dont la fonction reste mal comprise (*m/s* n° 5, vol. 10, p. 590). Le gène P0 (ou MPZ, pour *myelin protein zero*), impliqué dans la CMT1B et le DSS, code pour une protéine d'adhérence, la protéine zéro de la myéline (P0), qui serait responsable de l'accolement

des faces extracellulaires des membranes de la myéline compacte (*m/s n° 10, vol. 9, p. 1273*). Le gène *Cx32* (ou *GJB1*, pour *gap junction B1*), responsable de la CMTX, code pour la connexine 32 (Cx32), membre de la famille des protéines composant les canaux intercellulaires des jonctions communicantes (*m/s n° 2, vol. 10, p. 222*). Des études récentes sur la structure et la biologie de ces trois protéines associées à l'homéostasie de la myéline du système nerveux périphérique ont permis de dévoiler certains des mécanismes conduisant à plusieurs types de neuropathies démyélinisantes, cliniquement et histologiquement différentes.

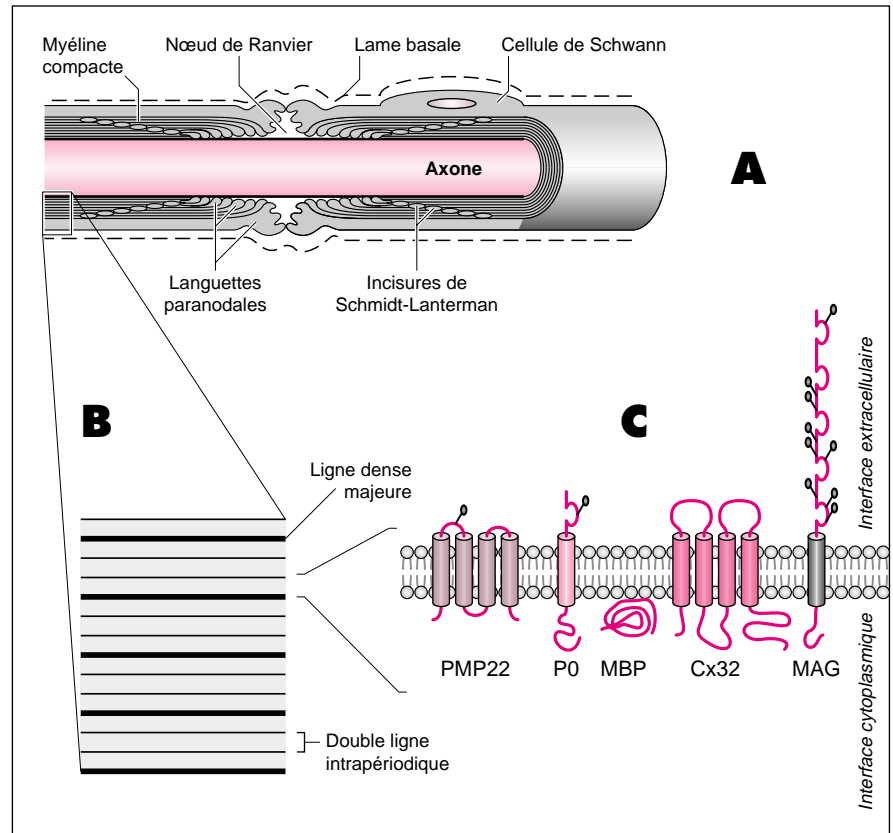
### La myéline périphérique

Chez la majorité des vertébrés, de nombreux axones du système nerveux central et périphérique sont entourés d'une gaine isolante constituée par l'enroulement en spirale d'une membrane particulière, la myéline. Dans le système nerveux périphérique, une cellule gliale, la cellule de Schwann myélinisante, forme un seul segment de gaine de myéline (*figure 1A*). Les segments de myéline, ou internodes, sont séparés par des régions où l'axone est exposé, appelées nœuds de Ranvier. Grâce à cette isolation par segments et à la concentration élevée de canaux sodiques dans cette région de l'axolemme, le potentiel d'action produit au nœud de Ranvier peut se propager en sautant par bonds de nœud en nœud : c'est la conduction saltatoire. Cette conduction est en général très rapide, de l'ordre de 50 mètres par seconde. Plus le diamètre de l'axone est large, plus il comporte de couches de myéline, et plus la conduction nerveuse est rapide et se propage fidèlement sur une longue distance. Un potentiel d'action peut ainsi se propager de la moelle épinière au bout de notre pied (une distance de plus d'un mètre chez l'adulte) en moins de 25 millisecondes.

Au microscope électronique, la gaine de myéline compacte apparaît formée par l'alternance de « lignes denses majeures » correspondant à l'accolement des faces cytoplasmiques de la membrane plasmique,

et de « doubles lignes intrapériodiques » correspondant à l'adhérence des faces externes de deux couches adjacentes (*figure 1B*). La myéline comprend des régions contenant encore du cytoplasme, comme les boucles paranodales et les incisures de Schmidt-Lanterman (*figures 1A et*

*3B*). La myéline contient 70 % de lipides et 30 % de protéines, rapport inverse de celui rencontré dans les autres membranes plasmiques; cette richesse en lipides participe à sa fonction d'isolant. Les protéines de structure majeures de la myéline périphérique compacte sont la protéine P0,



**Figure 1. Ultrastructure de la myéline et topologie des principales protéines myéliniques.** **A.** Dans le système nerveux périphérique, la gaine de myéline est constituée par l'extension de la membrane plasmique de la cellule de Schwann myélinisante s'enroulant en spirale autour de l'axone pour former un internode comprenant jusqu'à 50 couches de membrane compactée. Les internodes peuvent atteindre 2 mm de large et ils sont séparés par des régions non myélinisées où l'axone est exposé, le nœud de Ranvier. Certaines régions de la gaine, les languettes paranodales, les incisures de Schmidt-Lanterman et la languette externe, contiennent encore du cytoplasme. **B.** En microscopie électronique, la gaine de myéline compacte est vue comme une alternance de lignes claires et sombres. La « double ligne intrapériodique » correspond à l'apposition des faces extracellulaires de la membrane, et la « ligne dense majeure » est formée par l'accolement des faces cytoplasmiques de la membrane. **C.** Topologie par rapport à la membrane des principales protéines de la myéline périphérique. P0, MBP (myelin basic protein), et PMP22 sont localisées dans la myéline compacte. Les protéines MAG et Cx32 sont présentes dans les régions non compactes, languettes paranodales, incisures de Schmidt-Lanterman [1]. Les protéines Cx32, et PMP22 font partie d'une famille de protéines à quatre domaines transmembranaires, comme PLP/DM20, rMAL, plasmolipine, CD9, dont on vient de démontrer l'expression dans la myéline périphérique [2].

les MBP (*myelin basic proteins*) et PMP22; dans les régions non compactes, on trouve des protéines mineures comme la MAG (*myelin associated glycoprotein*) et la Cx32 [1, 2] (figure 1C).

## **Historique des neuropathies myéliniques. Quelques dates**

Après la description par Virchow, Friedreich et d'autres de cas semblables, Charcot et Marie, à l'hôpital de la Salpêtrière, décrivent en 1886 une affection familiale comportant une atrophie musculaire touchant d'abord les muscles du pied ou de la jambe et, plus tardivement, des mains puis des avant-bras. Ils lui donnent le nom d'« atrophie musculaire progressive » et ils pensaient que cette affection était due à une atteinte de la moelle épinière. La même année, à Londres, Tooth présente une thèse sur une affection semblable qu'il pensait être due à une atteinte des nerfs périphériques. On sait maintenant que les affections désignées collectivement sous le nom de neuropathies héréditaires sensitivo-motrices de type 1 (NHSM1) ou de maladie de Charcot-Marie-Tooth de type 1 (CMT1) sont dues à une atteinte de la myéline et de la cellule de Schwann myélinisante, par opposition aux formes axonales, appelées NHSM2 ou CMT2 selon la classification de Dyck [3]. En 1888, Herringham, étudia une grande famille dans laquelle les femmes présentaient peu ou pas de symptômes, contrairement à leur père ou à leurs fils atteints. C'est encore aujourd'hui la définition de la CMT liée à l'X (CMTX). En 1893, Déjerine et Sottas identifièrent une maladie plus grave et d'apparition plus précoce qu'ils distinguèrent de la CMT en raison d'une hypertrophie des nerfs périphériques. Ils l'appelèrent pour cette raison « névrite interstitielle hypertrophique et progressive de l'enfance ». Cependant, certains auteurs considéraient déjà que cette affection, désignée sous le nom éponyme de syndrome de Déjerine-Sottas (DSS), était seulement une forme sévère de CMT, désignée plus tard sous le nom de CMT3. Cela illustre les difficultés à classer ces différentes maladies

comme une même entité ou au contraire à les distinguer les unes des autres [3, 4].

## **Diagnostic et classification des neuropathies périphériques myéliniques**

Une étape importante dans le diagnostic des neuropathies démyélinisantes, maladies relativement fréquentes (1 sur 2500) [3-6], a tout d'abord été franchie à la fin des années 1950, grâce à la mesure électrophysiologique de la vitesse de conduction nerveuse (VCN) dans les nerfs périphériques moteurs et sensitifs. L'électromyographie (enregistrement de l'activité électrique des nerfs et des muscles) permet en effet de distinguer la forme « myélinique » CMT1 (70 % des cas de CMT), présentant une diminution de la vitesse de conduction nerveuse en dessous de 40-42 m/s, et la forme « axonale » CMT2 (30 % des cas), présentant une vitesse de conduction nerveuse pratiquement normale [6].

L'examen clinique du malade, son histoire familiale, la mesure de la vitesse de conduction nerveuse, la biopsie de nerf, permettent au clinicien d'évaluer la gravité et la nature (myélinique ou non) de la neuropathie [3-6]. L'atteinte de la myéline peut être le résultat d'une absence de formation (dysmyélinisation), d'une dégénérescence (démyélinisation), ou d'une combinaison des deux processus. La CMT1 débute généralement pendant l'enfance ou l'adolescence et son évolution est lente. La sévérité clinique est variable, allant de la simple gêne à la marche à la nécessité, rare, d'utiliser une chaise roulante; certains sujets atteints restent asymptomatiques toute leur vie. La déformation des pieds (pieds creux) est un signe caractéristique retrouvé chez la plupart des malades CMT1. On observe une faiblesse et une atrophie musculaires, associées à des troubles sensitifs, touchant d'abord les extrémités distales des membres inférieurs puis des membres supérieurs. A ces signes constants, s'ajoutent parfois des troubles visuels ou respiratoires. Le DSS est une forme beaucoup plus sévère de la CMT, débutant pendant

la petite enfance, parfois dès la naissance. La paralysie des membres inférieurs et la diminution de la sensibilité cutanée sont rapidement compliquées par la paralysie des membres supérieurs, pouvant aboutir à une dépendance totale; on observe généralement une hypertrophie des nerfs périphériques. La CMTX se caractérise par une progression de la maladie plus rapide et plus précoce chez les hommes que chez les femmes de la même famille, certaines d'entre elles étant asymptomatiques.

Au niveau électrophysiologique, la vitesse de conduction nerveuse qui est supérieure à 40 m/s chez le sujet normal, est comprise entre 10 et 40 m/s chez le sujet CMT1, est inférieure à 10-12 m/s chez les sujets DSS, et varie de 25 à 40 m/s chez les hommes CMTX, les femmes ayant des vitesses supérieures à 40 m/s. Au niveau histologique, la biopsie de nerf montre un amincissement des gaines de myéline accompagné de la formation de « bulbes d'oignon », structures résultant de la prolifération anormale des cellules de Schwann restant immatures. Une perte axonale secondaire progressive est généralement observée, témoin de la perturbation des interactions cellule de Schwann/axone. L'hypomyélinisation congénitale (HC) est une affection extrêmement sévère, parfois létale pendant la période néonatale ou les premières années de la vie par insuffisance respiratoire chronique due à l'atteinte grave du nerf phrénique. Les malades qui survivent présentent une invalidité très importante, avec un retard considérable de la marche, quand celle-ci est acquise. Les vitesses de conduction nerveuse sensitivo-motrices sont très abaissées, de l'ordre de 5 m/s, voire indécétables. Les caractéristiques de cette maladie sont celles d'une dysmyélinisation; les axones sont entourés d'une gaine de myéline extrêmement fine ou par le prolongement cytoplasmique non compacté de la cellule de Schwann et il n'y a pratiquement pas de bulbes d'oignon. La neuropathie héréditaire avec paralysie nerveuse à la pression ou HNPP, se caractérise par des épisodes de paralysie transitoires et récurrents dus à la présence d'une gaine de myéline anormalement fragile dont

l'altération locale bloque la transmission de l'influx nerveux entraînant une paralysie des muscles correspondants. Les processus de réparation de la myéline permettront la récupération de cette paralysie dans des délais variables, de quelques minutes à plusieurs semaines. Les vitesses de conduction nerveuse sensitivo-motrice sont parfois normales chez les patients, et chez les porteurs asymptomatiques qui sont très fréquents dans les familles HNPP, mais les latences distales sont constamment allongées. On observe un chevauchement entre les tableaux cliniques de la CMT1A et de l'HNPP dans certaines familles. La myéline anormale rencontrée dans l'HNPP est localement très abondante sur certaines fibres nerveuses, lui donnant un aspect en chapelet de saucisses (en latin, *tomacula*) d'où le nom de neuropathie tomaculaire qui lui est parfois donné.

### Du gène à la protéine

Des études de liaison génétique réalisées sur de grandes familles ont permis d'identifier en une quinzaine d'années les gènes impliqués dans 90 % des neuropathies myéliniques [4, 5]. La transmission se fait le plus fréquemment selon le mode dominant, autosomique ou lié au chromosome X. Au début des années 1980, on a mis en évidence une liaison entre un gène responsable de la CMT1B et le locus du groupe sanguin *Duffy*, puis du gène *FcγRIIA* (qui code pour un récepteur de la partie Fc des immunoglobulines), sur le chromosome 1. Cependant, en 1982, d'autres études montrèrent que, dans la plupart des familles CMT1, la maladie n'était pas liée à ce locus. Deux locus furent identifiés : en 1985, celui lié au chromosome X, le *CMTX*, et en 1989, celui lié au chromosome 17, le *CMT1A* représentant la forme la plus fréquente (70 % des cas de CMT1) [4, 5]. En 1991, la duplication d'une partie du bras court du chromosome 17 fut mise en évidence dans la plupart des cas de *CMT1A* (*m/s n° 8, vol. 7, p. 868*) [7]. Le gène codant pour la protéine de la myéline périphérique *PMP22* [8], fut isolé et localisé dans cette duplication, le rendant candidat pour la CMT1A [9]. En 1993, on a découvert

dans l'HNPP la délétion réciproque de la région dupliquée dans la *CMT1A*, contenant le gène *PMP22* [10] (*m/s n° 5, vol. 10, p. 590*). En 1992, dans la *CMTX*, plusieurs études familiales avaient montré une association avec le locus *Xq13.1* contenant le gène codant pour la *Cx32* [11]. En 1993, comme d'autres équipes, nous avons cloné et localisé sur le chromosome 1q21.3-q23, le gène *P0* humain codant pour la protéine majoritaire de la myéline périphérique, ce qui en faisait un meilleur gène candidat pour la *CMT1B* que *FcγRIIA* [12, 13].

### La protéine *PMP22*

C'est une glycoprotéine comportant quatre domaines transmembranaires (*figure 1C*) qui constitue 2 % à 5 % des protéines de la myéline périphérique ; on la trouve également en faibles quantités dans d'autres tissus. Cette molécule a une analogie structurale avec une protéine impliquée dans l'arrêt de la prolifération cellulaire [14]. La première mutation, *Gly150Asp*, a été identifiée chez la souris *Trembler* dont le phénotype, chez l'animal hétérozygote, ressemble à celui de la *CMT1A*. La souris homozygote, viable, pratiquement dépourvue de myéline périphérique, est plus sévèrement affectée et donc plus proche du DSS. Chez le mutant allélique *Trembler-J*, la mutation *Leu16Pro* conduit à un phénotype sévère, proche du DSS chez la souris hétérozygote, létal chez l'homozygote, alors que la même mutation est responsable de signes cliniques peu sévères dans une famille *CMT1A* [5]. Cet exemple illustre les limites des modèles animaux dans l'analyse des maladies génétiques humaines.

La duplication d'une région de 1,5 Mb contenant le gène *PMP22*, est responsable de 70 % des cas de *CMT1A* (*m/s n° 8, vol. 7, p. 868*) ; les mutations ponctuelles du gène *PMP22* sont très rares [4, 5, 15]. Le mécanisme génétique probablement en cause est expliqué dans la *figure 2*, l'existence d'un point chaud de recombinaison dans les séquences homologues (*CMT1A*-rep) flanquant la région remaniée a été démontrée [16-18].

Différents modèles animaux, transgéniques et *knock-out*, reproduisent

assez fidèlement les différents phénotypes observés dans les neuropathies humaines. Ainsi, chez la souris dont le gène *PMP22* a été délété [19], on observe les caractéristiques phénotypiques et morphologiques de l'HNPP, *tomacula* et hypermyélinisation, alors que les souris et les rats transgéniques surexprimant le gène *PMP22* [20, 21] présentent des phénotypes mimant la *CMT1A* et le DSS. Par quel mécanisme ces anomalies de dosage génique (1 ou 3 copies de gène au lieu de 2) conduisent-elles à différents troubles de la myéline périphérique ? Tout d'abord, des études d'immunocytochimie quantitative, réalisées sur des biopsies nerveuses de plusieurs patients, indiquent que l'excès ou le déficit de l'expression de *PMP22* est bien corrélé au nombre de copies du gène [22], suggérant, respectivement, un rôle direct du dosage génique dans la pathogénie de la *CMT1A* ou de l'HNPP. La fonction de *PMP22* ainsi que les mécanismes responsables des effets délétères des anomalies de dosage de cette protéine sur la myélinogénèse sont encore hypothétiques et controversés [23]. Certains auteurs supposent que *PMP22* jouerait un rôle bifonctionnel : (1) dans le développement, en réglant la différenciation ou l'apoptose des cellules de Schwann [5, 19, 20] ; (2) structural, dans le maintien de la stabilité de la myéline. Par ailleurs, l'expressivité variable de la maladie observée chez les patients *CMT1A* porteurs de la duplication (homozygotes ou hétérozygotes) [24, 25], ou de la délétion [26], comme la variabilité phénotypique observée dans la lignée de rats surexprimant *PMP22* [21], suggèrent fortement l'existence de facteurs environnementaux, épigénétiques ou stochastiques [6, 21] contribuant à la modulation de la pénétrance et de l'expression de cette maladie monogénique.

On peut faire un parallèle [5, 19, 20, 23, 26, 27] entre les anomalies affectant le gène *PMP22* et celles touchant le gène *PLP* codant pour les protéolipides majeurs de la myéline du système nerveux central (*PLP* et *DM20*). En effet, comme pour *PMP22* dans le système nerveux périphérique, des mutations ponctuelles, délétions ou duplications du gène *PLP* sont responsables de maladies



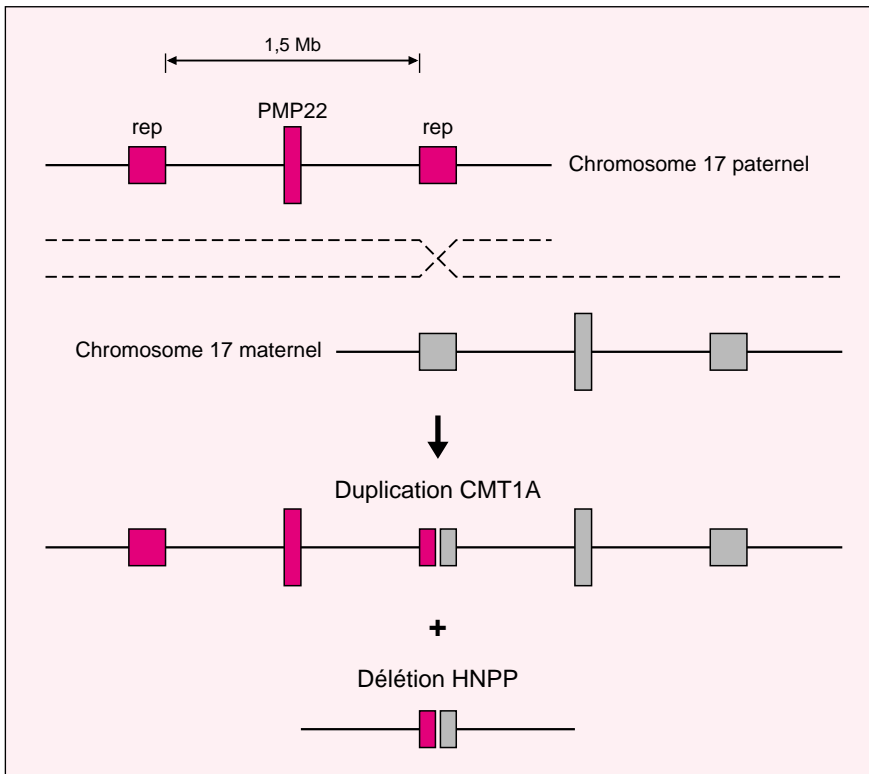


Figure 2. **Représentation schématique des mécanismes génétiques à l'origine des recombinaisons dans la région contenant le gène PMP22.** Un crossing-over inégal peut se produire à la suite d'un mauvais alignement des séquences répétées (rep) espacées de 1,5 Mb de part et d'autre du gène PMP22 sur le chromosome 17p11.2 [6]. Cet événement de recombinaison se produit généralement pendant la méiose (le plus souvent la méiose mâle). L'échange inégal se produit entre des séquences répétées, rep, qui flanquent le monomère de duplication CMT1A de 1,5 Mb (taille la plus fréquente), ce qui conduit à un chromosome contenant la duplication de cette région (phénotype CMT1A), et à un chromosome comportant la délétion réciproque (phénotype HNPP). Étant donné la rareté de l'événement de recombinaison, on ne trouve jamais les deux types de maladie dans la même famille.

de la myéline du système nerveux central, allant de la dysmyélinisation létale chez le jeune enfant, à une démyélinisation modérée, d'apparition tardive et peu symptomatique [27, 28] (*m/s n° 4, vol. 10, p. 487*). Le fait que des anomalies du dosage génique produisent des effets comparables à ceux provoqués par des mutations ponctuelles, est un phénomène inattendu dont les mécanismes moléculaires ne sont pas encore compris. Cet effet de dosage génique évoque la possibilité d'une oligomérisation de PMP22, comme de PLP et de DM20, ou d'interactions avec d'autres protéines et donc la nécessité du respect de la stœchiométrie de leur synthèse (*m/s n° 12, vol. 12, p. 1439*).

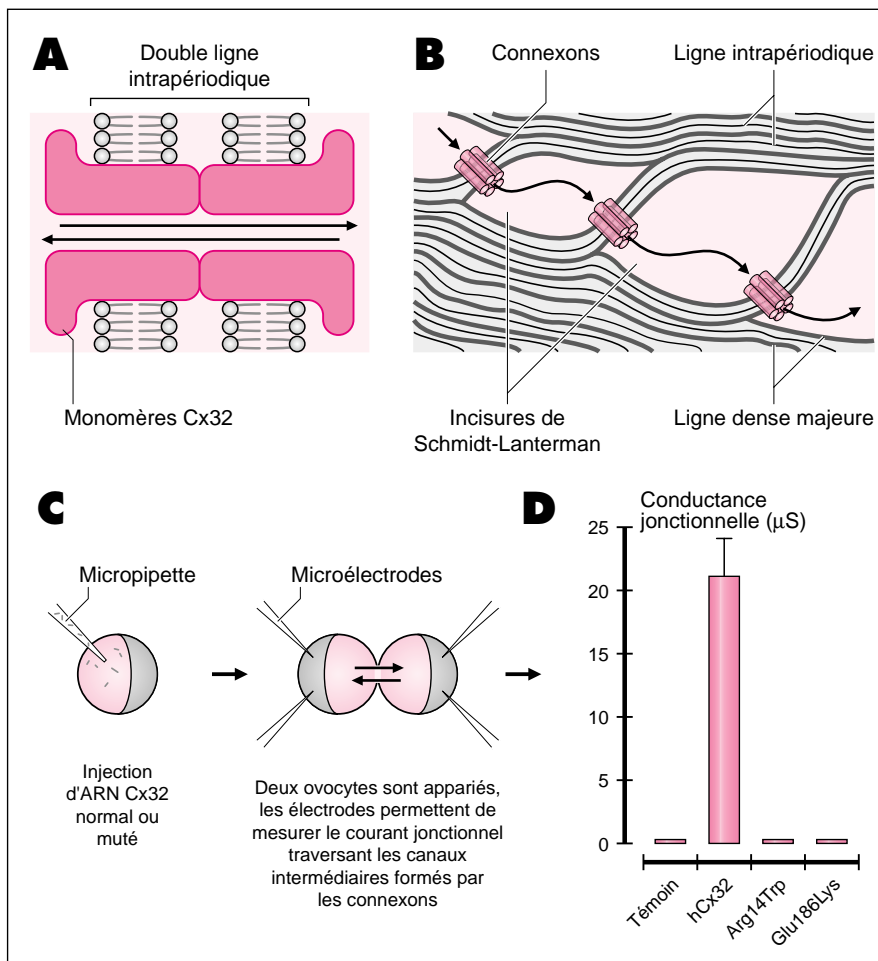
*m/s n° 10, vol. 13, octobre 97*

## La protéine Cx32

Cette connexine de 32 kDa, est localisée dans les régions de la gaine de myéline périphérique contenant du cytoplasme, comme les incisures de Schmidt-Lanterman et les boucles paranodales [29, 30]. La Cx32 n'est pas spécifique de la myéline périphérique, on la trouve aussi dans le foie, le rein, le pancréas, la glande mammaire [31, 32], ainsi que dans les oligodendrocytes [30], cellules productrices de myéline dans le système nerveux central. Les connexines s'assemblent sous forme d'oligomères de six sous-unités, appelés connexons, qui s'apparient avec la structure homologue localisée dans la membrane d'une cellule voisine

pour constituer un canal intercellulaire faisant communiquer le cytoplasme de ces deux cellules (*m/s n° 2, vol. 10, p. 218*) (figure 3A). L'ensemble de ces canaux constitue une plaque de jonctions communicantes, ou jonction *gap*, permettant le passage de molécules de moins de ~1 kDa (seconds messagers, ions et métabolites), selon l'identité de la connexine synthétisée. Cependant, la localisation de Cx32 dans les cellules de Schwann n'est pas compatible avec la formation de canaux intercellulaires orthodoxes. Sa présence dans les régions où la myéline est moins compactée (régions paranodales et incisures de Schmidt-Lanterman) suggère, en revanche, la formation de canaux « intracellulaires » entre les différentes couches de myéline, permettant ainsi de raccourcir le chemin à parcourir pour le transfert d'ions et de nutriments à partir du corps cellulaire de la cellule de Schwann à travers l'épaisseur et autour de la gaine de myéline [33]. La voie radiale (transversale) à travers la gaine de myéline la plus large (4 µm d'épaisseur chez les mammifères), est 1000 fois plus courte que le chemin progressant le long de la spirale de myéline (4 mm de long) (figure 3B).

En 1993, Bergoffen *et al.* [29] ont identifié des mutations du gène *Cx32* chez plusieurs patients CMTX (*m/s n° 2, vol. 10, p. 222*). Depuis cette date, plus de 70 mutations différentes touchant indifféremment toutes les régions de la molécule, ont été rapportées [15, 33-35]. Certaines mutations non-sens, localisées près de l'extrémité amino-terminale de la protéine, correspondent à un allèle nul et donc à une absence totale de Cx32 chez les sujets masculins atteints, ceux-ci étant hémizygotes; chez les femmes atteintes, l'inactivation au hasard de l'un des chromosomes X, fait qu'une expression de type hétérozygote, correspondant à un mosaïcisme cellulaire concernant l'expression de Cx32, devrait être observée: chaque chromosome X portant un allèle différent, des cellules de Schwann « normales » et « mutées » devraient coexister au sein des nerfs périphériques. Paradoxalement, chez les sujets atteints, l'effet délétère des mutations de la Cx32 est observé uniquement dans la myéline



**Figure 3. Étude fonctionnelle des canaux intercellulaires.** **A.** Les connexines s'assemblent par groupes de six molécules pour former des structures creuses, appelées connexons. L'alignement bout à bout d'un connexon d'une cellule avec celui de la cellule voisine forme un canal jonctionnel et le regroupement de plusieurs canaux constitue une jonction communicante (gap junction). **B.** La Cx32 pourrait former des canaux non orthodoxes, « intracellulaires », entre les différentes couches de myéline, dans les régions où celle-ci n'est pas compactée, comme ici dans les incisures de Schmidt-Lanterman, permettant ainsi de raccourcir le chemin à parcourir pour le transfert d'ions et de nutriments à partir du corps cellulaire de la cellule de Schwann à travers l'épaisseur de la gaine de myéline [33]. **C.** Représentation schématique des différentes étapes permettant l'étude fonctionnelle des connexines dans le système des ovocytes de xénope appariés [37, 38]. La région codante d'un ADNc de connexine est sous-clonée dans le vecteur d'expression SP64T, l'ARN synthétique est ensuite produit in vitro, purifié puis injecté dans le pôle végétal d'un ovocyte défolluculé de stade V-VI. Après enlèvement de la membrane vitelline, deux ovocytes sont appariés manuellement au niveau des pôles végétaux. Les propriétés fonctionnelles des canaux intercellulaires peuvent être analysées grâce à un double potentiel imposé qui permet de quantifier la conductance jonctionnelle. **D.** Les conductances jonctionnelles ont été mesurées dans des paires d'ovocytes exprimant des mutations CMTX de Cx32. La protéine Cx32 de type normal (hCx32) forme des canaux intercellulaires qui développent une conductance équivalente, dans cette série d'expériences, à environ 200 000 canaux fonctionnels. En revanche, deux mutations testées, Arg142Trp et Glu186Lys, n'induisent pas de conductance jonctionnelle mesurable, comme les paires d'ovocytes témoins injectés avec de l'eau. Adapté d'après [39].

périphérique, alors que chez la souris dépourvue de Cx32, les anomalies sont observées essentiellement au niveau du foie où l'absence de Cx32 perturbe la transmission du signal du nerf sympathique à travers le lobe hépatique entraînant une diminution de la mobilisation du glucose [36]. Ces mêmes souris développent par la suite des altérations de la myéline périphérique, telles que des bulbes d'oignon détectables chez des animaux âgés de 9-12 mois, mais qui ne sont pas associés à des manifestations cliniques (U. Suter, ETH-Zurich, communication personnelle).

Quelles sont les conséquences fonctionnelles des mutations de Cx32 détectées chez les patients CMTX? Les effets fonctionnels de ces mutations peuvent être analysés en utilisant des paires d'ovocytes de xénope comme système d'expression (figure 3C) [37, 38]. Nous avons montré que deux mutations ponctuelles, Arg142Trp et Glu186Lys, provoquent la perte complète de leur fonction (figure 3D). En outre, la mutation Arg142Trp possède un effet dominant négatif, puisqu'elle inhibe de façon sélective la capacité fonctionnelle d'une autre connexine [39]. Cette perte fonctionnelle et la présence d'effets dominants négatifs ont été confirmées pour d'autres mutations, en utilisant un système d'expression de cellules de mammifères [40]. En revanche, une protéine tronquée par une mutation stop provoquant la délétion du domaine carboxy-terminal à partir de l'acide aminé en position 220, permet la formation de canaux intercellulaires fonctionnels [40, 41]. Sur la base de ces données, nous pouvons faire l'hypothèse que les mutations localisées dans les régions qui jouent un rôle essentiel dans l'assemblage du canal et la formation du pore (domaines transmembranaires, deuxième boucle extracellulaire) pourraient être associées à une perte totale de fonction. En revanche, nous supposons que certaines mutations, localisées dans les domaines qui jouent un rôle prépondérant dans les mécanismes de régulation dynamique de la perméabilité des canaux cytoplasmiques (régions cytoplasmiques, première boucle extracellulaire), n'empêcheraient pas la forma-

tion de canaux actifs. En effet, nous avons récemment identifié trois autres mutations dans ces domaines, qui maintiennent une activité fonctionnelle, et leur analyse physiologique est en cours [42]. Il est possible que ces mutations soient associées à des modifications sélectives de la perméabilité ou de la sensibilité à différentes voies de régulation, tels que le potentiel, le pH, le calcium ou d'autres messagers intracellulaires, ce qui aurait pour conséquence un déficit fonctionnel. Ces résultats traduisent les différences que l'on peut observer entre un système d'expression *in vitro*, isolé du contexte physiologique et temporel, et la myélinogenèse. Actuellement, nous ne connaissons pas la séquence moléculaire des étapes qui, à partir

des mutations du gène *Cx32*, conduisent à la dégénérescence progressive de la gaine myélinique périphérique. Nous pouvons faire l'hypothèse que les mutations de la *Cx32* conduiraient à la formation de connexons anormaux entraînant la rupture du trafic intracellulaire de messagers à travers la voie radiale traversant la gaine de myéline, perturbant ainsi les échanges métaboliques entre le corps cellulaire, les régions compactes de la myéline et la région péri-axonale de la cellule de Schwann.

### La protéine P0

Elle représente plus de 50 % des protéines de la myéline périphérique. C'est une protéine transmembranaire de 30 kDa composée d'un domaine

extracellulaire (P0-ex) de type immunoglobuline (*Ig-like*), glycosylé, suivi d'un domaine transmembranaire et d'une région intracellulaire contenant un grand nombre de résidus basiques. Des études *in vitro* ont montré que le domaine extracellulaire de P0 glycosylé peut être impliqué dans des interactions homotypiques responsables des fonctions d'adhérence [43] des faces externes de la membrane qui forment la double ligne intrapériodique.

Il n'existe pas de mutants naturels du gène *P0* chez la souris. L'inactivation du gène a montré que la souris hétérozygote *P0*<sup>+/-</sup> présente des troubles modérés, comparables à la CMT1B, alors que la souris homozygote *P0*<sup>-/-</sup> constitue un modèle du syndrome plus sévère du DSS (Tableau I) [44].

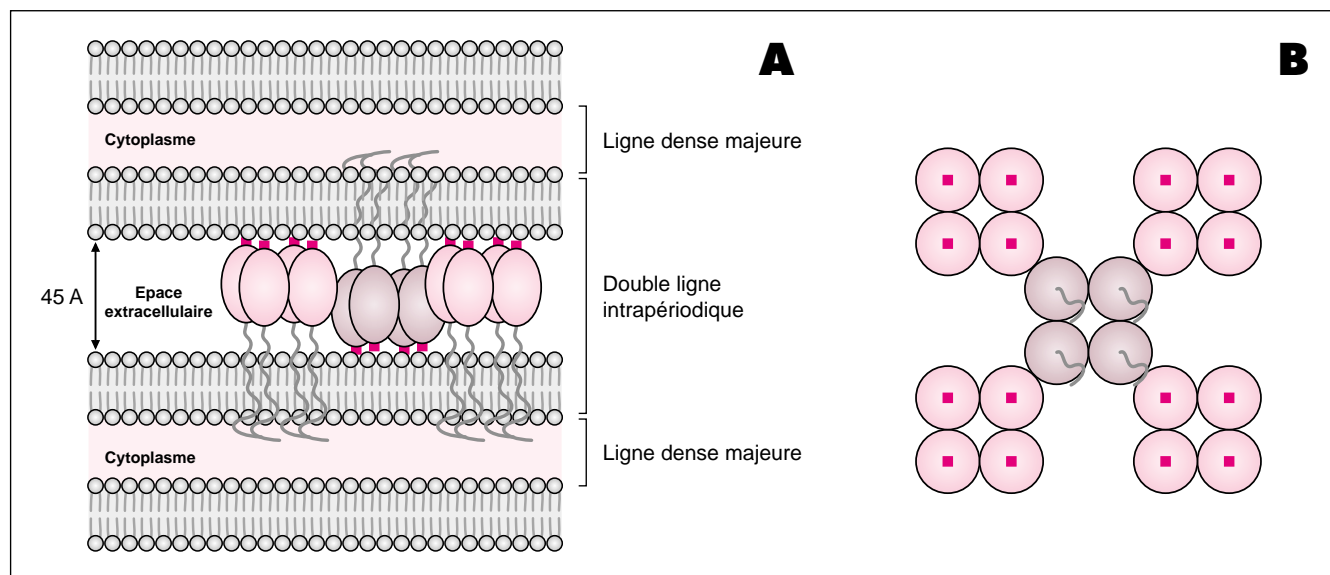


Figure 4. **Schéma de la topologie de P0-ex dans la double ligne intrapériodique. A: vue en coupe transversale. B: vue de dessus.** Que nous apprennent la modélisation et la cristallisation sur la topologie et les interactions des molécules de P0 dans la myéline? Chaque monomère présente un domaine extracellulaire (P0-ex), symbolisé ici par un « ballon » ovale, maintenu dans la bicouche lipidique par ses domaines transmembranaire et intracellulaire. Les monomères de P0-ex s'assemblent sous forme de tétramères (chacun d'eux peut être imaginé comme une poignée de ballons attachés dans la membrane par leur ficelle). Une deuxième interaction s'établit entre tétramères « plantés » de part et d'autre des faces extracellulaires se faisant face (en trans). Ces interdigitations et interactions sont responsables de l'adhérence des couches externes de la myéline. Cependant, la région extracellulaire juxtamembranaire du domaine P0-ex est composée de résidus « désordonnés » formant une structure flexible qui ne permettrait pas de maintenir à distance fixe les faces externes des membranes de la myéline; pour remplir cette fonction, une troisième interaction s'établirait entre les lipides de la membrane opposée et le résidu hydrophobe tryptophane 28 pointant vers l'extérieur de l'extrémité amino-terminale de P0-ex (symbolisé par un carré rouge). Grâce à ces trois interactions, les molécules de P0-ex formeraient une sorte de velcro maintenant fermement, mais avec une certaine souplesse, les faces extracellulaires des membranes de myéline à la distance de 45 Angströms observée en microscopie électronique. Ce modèle schématique ne prend pas en compte les interactions possibles de P0 avec d'autres protéines de la myéline, comme PMP22 et Cx32, qui, lorsqu'elles sont mutées, conduisent à des phénotypes cliniques divers mais comparables de neuropathies périphériques. (Adapté d'après [52 et 55].)

Une quarantaine de mutations ponctuelles dominantes du gène *P0* ont été rapportées à ce jour chez des patients présentant différentes formes de neuropathies myéliniques [15, 45-52]. Sur ces mutations, 22 sont localisées en 16 positions diffé-

rentes du domaine P0-ex, soulignant l'importance fonctionnelle de ce domaine. Certaines mutations de P0 conduisent à la CMT1B, d'autres au DSS ou à l'HC (Tableau I). Le recensement de ces mutations [15, 48, 52] et l'étude clinique des malades mon-

trient que la variabilité des phénotypes est fonction de la nature et de la position de ces mutations par rapport à la structure tertiaire et quaternaire de la protéine (figure 4), récemment établie par cristallisation du domaine Ig [53]. Par exemple, la substitution par une cystéine de la sérine 34, de l'arginine 69, ou du tryptophane 72, exposés vers l'extérieur de la molécule selon les données cristallographiques, entraîne un DSS ou une forme grave et précoce de CMT1B. Dans ce type de substitution, la formation d'un pont disulfure ectopique aboutirait à la formation de tétramères anormaux. En revanche, lorsque la sérine 34 est délétée ou remplacée par une phénylalanine, ou quand l'arginine 69 est remplacée par une sérine ou une histidine, la perturbation de l'assemblage des tétramères serait moins importante et conduirait à un phénotype CMT1B moins sévère. Par ailleurs, alors que des expériences d'expression du gène *P0* dans des cellules eucaryotes suggèrent que la glycosylation jouerait un rôle essentiel dans la fonction d'adhérence de P0-ex [43], la mutation Asn93Ser, au site unique de glycosylation, conduit à une forme tardive et cliniquement modérée de CMT1B [50].

Une autre approche permettant d'établir une corrélation génotype/phénotype, consiste à analyser l'impact des mutations *in situ*, sur la structure de la myéline. Cette étude, réalisée sur la biopsie de nerf de patients CMT1B ou DSS [54], a montré que certaines mutations provoquent une non-compaction de la myéline dans la plupart des fibres encore myélinisées, alors que d'autres mutations entraînent, dans le même internode, un amincissement et une hypermyélinisation locale (*tomacula*), la myéline résiduelle étant elle-même compacte. En dehors d'un effet pathogène général commun à toutes les mutations P0 (démyélinisation, bulbes d'oignon, perte axonale secondaire), ces résultats montrent que chaque mutation P0 présente un impact particulier sur la structure de la myéline.

En conclusion, ce travail de caractérisation des défauts génétiques responsables des neuropathies myéliniques pose maintenant le problème de leur classement. Certaines neuropathies,

Tableau I			
COMPARAISON ENTRE LES PHÉNOTYPES DES NEUROPATHIES MYÉLINIQUES HUMAINES ET LES MODÈLES ANIMAUX CORRESPONDANTS			
Vitesse de conduction nerveuse en m/s	0 à 12	12 à 38	< 38-40
<b>Neuropathies périphériques myéliniques</b>			
Maladie	DSS	CMT1A	HNPP
Génotype <i>PMP22</i>	<i>PMP22</i> <sup>+/+</sup> <i>PMP22</i> <sup>+/mutation</sup>	<i>PMP22</i> <sup>+/+</sup> <i>PMP22</i> <sup>+/mutation</sup>	<i>PMP22</i> <sup>+/-</sup> <i>PMP22</i> <sup>+/mutation</sup> nulle
Maladie		CMTX	CMTX
génotype <i>Cx32</i>		<i>Cx32</i> <sup>Y/mutation</sup> <i>Cx32</i> <sup>+/mutation</sup>	<i>Cx32</i> <sup>+/mutation</sup>
Maladie	HC et DSS	CMT1B	
génotype <i>P0</i>	<i>P0</i> <sup>+/mutation</sup>	<i>P0</i> <sup>+/mutation</sup>	
<b>Modèles animaux</b>			
Phénotype	sévère, type DSS	moyen type CMT1	modéré à normal type HNPP
génotype <i>PMP22</i>	<i>PM22</i> <sup>Trembler/Trembler</sup> <i>PMP22</i> <sup>+/Trembler-J</sup> KO <i>PMP22</i> <sup>-/-</sup> Tg <i>PMP22</i>	<i>PMP22</i> <sup>+/Trembler</sup>	KO <i>PMP22</i> <sup>+/-</sup>
génotype <i>Cx32</i>		KO <i>Cx32</i> <sup>-/-</sup>	KO <i>Cx32</i> <sup>-/-</sup>
génotype <i>P0</i>	KO <i>P0</i> <sup>-/-</sup>	KO <i>P0</i> <sup>+/-</sup>	KO <i>P0</i> <sup>+/-</sup>

Des mutations ponctuelles, la délétion ou la duplication de gènes exprimés dans la cellule de Schwann, conduisent à des neuropathies myéliniques de sévérité clinique très variable. Ces anomalies définissent un continuum neuropathologique qui va de l'absence congénitale totale de myéline (hypomyélinisation congénitale, HC), passe par une forme précoce et sévère, le syndrome de Déjerine-Sottas (DSS), puis par la forme plus modérée de maladie de Charcot-Marie-Tooth de type 1 (CMT1) A ou B, ou de CMTX, débutant tardivement chez le jeune adulte, une forme moins délétère et cliniquement différente étant la paralysie tomaculaire récidivante (HNPP). Il existe un chevauchement entre les phénotypes, et il n'y a pas de corrélation directe entre la vitesse de conduction nerveuse dont la «pénétrance» est totale et la sévérité du phénotype clinique dont la variabilité est grande, y compris parmi les membres atteints d'une même famille [6, 24, 25]. Le gène *Cx32* étant localisé sur l'X, les hommes, hémizygotés (*Cx32*<sup>Y/mutation</sup>), sont plus sévèrement atteints que les femmes hétérozygotes (*Cx32*<sup>+/mutation</sup>). La vitesse de conduction nerveuse est plus basse chez les hommes (31 ± 6 m/s) que chez les femmes (45 ± 9 m/s) où elle est dite «intermédiaire» [5].

La duplication du gène *PMP22* à l'état hétérozygote (trois copies du gène) est symbolisée par *PMP22*<sup>+/+</sup>, à l'état homozygote (quatre copies) par *PMP22*<sup>+/+</sup>. L'hétérozygotie, chez les souris knock-out (KO), est symbolisée par *KO*<sup>-/-</sup>, l'homozygotie par *KO*<sup>-/-</sup>. Les souris ou les rats transgéniques sont symbolisés par Tg et chez ces animaux le nombre de copies varie selon la lignée; l'effet du transgène se manifeste dès l'état hétérozygote en fonction de son taux d'expression dans la cellule de Schwann. Mutation nulle, signifie soit une mutation stop, soit un décalage de cadre de lecture, aboutissant à l'absence de protéine ou à une protéine non fonctionnelle, par opposition aux mutations faux-sens (mutation), qui ne modifient qu'un acide aminé. Adapté d'après [27].



autrefois regroupées sur la base de critères cliniques et neuropathologiques similaires, se sont révélées être génétiquement hétérogènes. D'autres, cliniquement très différentes, ont pour origine des mutations alléliques du même gène. Un grand nombre de neuropathies ne sont pas encore définies au niveau moléculaire. Il existe d'autres locus, en particulier des locus récessifs, associés à la CMT1 ou à la CMTX dont les gènes n'ont pas encore été identifiés [56]. Différents modèles animaux suggèrent que des facteurs de transcription, Krox-20 (*m/s n° 1, vol. 11, p. 142*) ou SCIP, pourraient être impliqués dans des affections démyélinisantes [2, 20]. De nouvelles protéines ont aussi été découvertes dans la myéline, comme rMAL (*rat myelin and lymphocyte protein*), CD9, et la plasmolipine [2], ou dans les régions paranodales, comme la E-cadhérine, des canaux sodiques et potassiques, des composants du cytosquelette comme l'actine F, la spectrine, l'ankyrine et des caténines [1]. Finalement, les neuropathies démyélinisantes pourraient être dues à l'altération de mécanismes agissant à différentes étapes: prolifération, différenciation et viabilité de la cellule de Schwann, interactions cellule de Schwann/axone, formation et maintien de la myéline [1, 2] ■

#### Remerciements

Les auteurs remercient D. Rodriguez et G. Pitiot pour la revue critique de ce manuscrit. A. Dautigny remercie le CNRS, le GREG et le MRE (contrat Biomed et ACCV), R. Bruzzone remercie l'Institut Pasteur et l'AFM, pour leur soutien financier.

#### RÉFÉRENCES

1. Trapp BD, Haney C, Yin X. Molecular pathogenesis of peripheral neuropathy. *Rev Neurol* 1996; 152: 314-9.
2. Mirsky R, Jessen KR. Schwann cell development and differentiation, and myelination. *Curr Opin Neurobiol* 1996; 6: 89-96.
3. Dyck PJ, Chance PF, Lebo RV, Carney JA. Hereditary motor and sensory neuropathies. In: Dyck PJ, Thomas PK, Griffin JW, Low PA, Podszus JF eds. *Peripheral neuropathy*, 3d ed. Philadelphia: WB Saunders, 1993: 1094-136.
4. Harding AE. From the syndrome of Charcot, Marie and Tooth to disorders of peripheral myelin proteins. *Brain* 1995; 118: 809-18.
5. Suter U, Snipes GJ. Biology and genetics of hereditary motor and sensory neuropathies. *Annu Rev Neurosci* 1995; 18: 45-75.
6. England JD, Garcia CA. Electrophysiological studies in the different genotypes of Charcot-Marie-Tooth disease. *Curr Opin Neurol* 1996; 9: 338-42.
7. Hoogendijk JE, Hensels GW, Zorn I, Valentijn L, Janssen EAM, de Visser M, Barker DJ, Ongerboer BW, Baas F, Bolhuis PA. The duplication in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A spans at least 1100 kb on chromosome 17p11.2. *Hum Genet* 1991; 88: 215-8.
8. Welcher AA, Suter U, De Leon M, Snipes GJ, Shooter EM. A myelin protein is encoded by the homologue of a growth arrest-specific gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 86: 5380-4.
9. Patel PI, Roa BB, Welcher AA, Schoener-Scott R, Trask BJ, Pentao L, Snipes GH, Garcia CA, Francke U, Shooter EM, Lupski JR, Suter U. The gene for the peripheral myelin protein PMP22 is a candidate for Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Nature Genet* 1992; 1: 159-65.
10. Chance PF, Alderson MK, Leppig KA, Lensch MW, Matsunami N, Smith B, Swanson PD, Odelberg SJ, Distchech CM, Bird TD. DNA deletion associated with hereditary neuropathy with liability to pressure palsies. *Cell* 1993; 72: 143-51.
11. Corcos IA, Lafrenière RG, Begy CR, Loch-Carusio R, Willard HF, Glover TW. Refined localization of human connexin 32 gene locus, *GJB1*, to Xq13.1. *Genomics* 1992; 13: 479-80.
12. Pham-Dinh D, Fourbil Y, Blanquet F, Mattéi MG, Roedel N, Latour P, Chazot G, Vandenberghe A, Dautigny A. The major peripheral myelin protein zero gene: structure and localization in the cluster of Fcg receptor genes on human chromosome 1q21.3-q23. *Hum Mol Genet* 1993; 2: 2051-4.
13. Hayasaka D, Himoro M, Sato W, Takada G, Uyemura K, Shimizu N, Bird TD, Conneally PM, Chance PF. Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 1B is associated with mutations of *P0* gene. *Nature Genet* 1993; 5: 31-4.
14. Manfioletti G, Ruaro ME, Del Sal G, Philipson L, Schneider C. A growth arrest-specific (*gas*) gene codes for a membrane protein. *Mol Cell Biol* 1990; 10: 2924-30.
15. Nelis E, Van Broeckhoven C, et al. Estimation of the mutation frequencies in Charcot-Marie-Tooth disease type 1 and hereditary neuropathy with liability to pressure palsies: a European collaborative study. *Eur J Hum Genet* 1996; 4: 25-33.
16. Reiter LT, Murakami T, Koeuth T, Pentao L, Muzny DM, Gibbs RA, Lupski JR. A recombination hotspot responsible for two inherited peripheral neuropathies is located near a *mariner* transposon-like element. *Nature Genet* 1996; 12: 288-97.
17. Kiyosawa H, Chance PF. Primate origin of the CMT1A-REP repeat: mapping crossover breakpoints in CMT1A and HNPP. *Hum Mol Genet* 1995; 4: 2327-34.
18. Lopes J, Le Guern E, Gouider R, Tardieu S, Abbas N, Birouk N, Gugenheim M, Bouche P, Agid Y, Brice A, the French CMT collaborative research group. Recombination hot spot in a 3.2-kb region of the Charcot-Marie-Tooth type 1A repeat sequences: new tools for molecular diagnosis of hereditary neuropathy with liability to pressure palsies and of Charcot-Marie-Tooth type 1A. *Am J Hum Genet* 1996; 58: 1223-30.
19. Aldkofer K, Martini R, Aguzzi A, Zielsek J, Toyka KV, Suter U. Hypermyelination and demyelinating peripheral neuropathy in *Pmp22*-deficient mice. *Nature Genet* 1995; 11: 274-80.
20. Magyar JP, Martini R, Ruelicke T, Aguzzi A, Adlkofer K, Dembic Z, Zielsek J, Toyka KV, Suter U. Impaired differentiation of Schwann cells in transgenic mice with increased *PMP22* gene dosage. *J Neurosci* 1996; 16: 5351-60.
21. Sereda M, Griffiths I, Püldhofer A, Stewart H, Rossner JP, Schneider A, Hund E, Meinck HM, Suter U, Nave KA. A transgenic rat model of Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuron* 1996; 16: 1049-60.
22. Vallat JM, Sindou P, Preux PM, Tarabaud F, Milor AM, Couratier P, Le Guern E, Brice A. Ultrastructural PMP22 expression in inherited demyelinating neuropathies. *Ann Neurol* 1996; 39: 813-7.
23. Suter U, Snipes GJ. Peripheral myelin protein 22: facts and hypotheses. *J Neurosci Res* 1995; 40: 145-51.
24. Garcia CA, Malamut RE, England JD, Parry GS, Liu P, Lupski JR. Clinical variability in two pairs of identical twins with the Charcot-Marie-Tooth disease type 1A duplication. *Neurology* 1995; 45: 2090-3.
25. Le Guern E, Gouider R, Mabin D, Tardieu S, Birouk N, Parent P, Bouche P, Brice A. Patients homozygous for the 17p11.2 duplication in Charcot-Marie-Tooth type 1A disease. *Ann Neurol* 1997; 41: 104-8.
26. Pareyson D, Taroni F. Deletion of the *PMP22* gene and hereditary neuropathy with liability to pressure palsies. *Curr Opin Neurol* 1996; 9: 348-54.
27. Scherer SS, Chance PF. Myelin genes, getting the dosage right. *Nature Genet* 1995; 11: 226-8.
28. Pham-Dinh D, Nussbaum JL, Popot JL, Boespflug-Tanguy O, Landrieu P, Dautigny A. Mutations du gène codant pour les protéolipides de la myéline (PLP et DM20) et dysmyélinisations liées au chromosome X. *Med Sci* 1992; 8: 664-72.
29. Bergoffen J, Scherer S, Wang S, Oranzi Scott M, Bone LJ, Paul DL, Chen K, Lensch MW, Chance PF, Fischbeck KH. Connexin mutations in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Science* 1993; 262: 2039-42.
30. Scherer SS, Deschênes SM, Xu YT, Grinspan JB, Fischbeck KH, Paul DL. Connexin32 is a myelin-related protein in the PNS and CNS. *J Neurosci* 1995; 15: 8281-94.
31. Bruzzone R, White TW, Paul DL. Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling. *Eur J Biochem* 1996; 238: 1-27.

32. Meda P. Connexines, canaux jonctionnels et communications cellulaires. *Med Sci* 1996; 12: 909-20.
33. Paul DL. New functions for gap junctions. *Curr Opin Cell Biol* 1995; 7: 665-72.
34. Bone LJ, Dahl N, Lensch MW, Chance PF, Kelly T, Le Guern E, Magi S, Parry G, Shapiro H, Wang S, Fischbeck KH. New connexin 32 mutations associated with X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Neurology* 1995; 45: 1863-6.
35. Ressot C, Latour P, Blanquet-Grossard F, Sturtz F, Duthel S, Battin J, Corbillon E, Ollagnon E, Serville F, Vandenberghe A, Dautigny A, Pham-Dinh D. X-Linked dominant Charcot-Marie-Tooth neuropathy (CMTX): new mutations in the connexin 32 gene. *Hum Genet* 1996; 98: 172-5.
36. Nelles E, Bützler C, Jung D, Temme A, Gabriel HD, Dahl U, Traub O, Stümpel F, Jungermann K, Zielazek J, Toyka KV, Dermietzel R, Willecke K. Defective propagation of signals generated by sympathetic nerve stimulation in the liver of connexin 32-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 9565-70.
37. Dahl G. The *Xenopus* oocyte cell-cell channel assay for functional analysis of gap junction proteins. In: Stevenson BR, Gallin WJ, Paul DL, eds. *Cell-cell interactions: a practical approach*. New York: Oxford University Press, 1992: 143-65.
38. Bruzzone R, Haefliger JA, Gimlich RL, Paul DL. Connexin 40, a component of gap junctions in vascular endothelium, is restricted in its ability to interact with other connexins. *Mol Biol Cell* 1993; 4: 7-20.
39. Bruzzone R, White TW, Scherer SS, Fischbeck KH, Paul DL. Null mutations of connexin 32 in patients with X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuron* 1994; 13: 1253-60.
40. Omori Y, Mesnil M, Yamasaki H. Connexin 32 mutations from X-linked Charcot-Marie-Tooth disease patients: functional defects and dominant negative effects. *Mol Biol Cell* 1996; 7: 907-16.
41. Rabadan-Diehl C, Dahl G, Werner R. A connexin 32 mutation associated with Charcot-Marie-Tooth disease does not affect channel formation in oocytes. *FEBS Lett* 1994; 351: 90-4.
42. Ressot C, Gomès D, Dautigny A, Pham-Dinh D, Bruzzone R. Functional analysis of connexin 32 mutations associated with X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Mol Biol Cell* 1996; 7: 461a (abstract).
43. Filbin MT, Tenekoon GI. The role of complex carbohydrates in adhesion of the myelin protein P0. *Neuron* 1991; 7: 845-55.
44. Zielased J, Martini R, Toyka KV. Functional abnormalities in P0-deficient mice resemble human hereditary neuropathies linked to P0 gene mutations. *Muscle Nerve* 1996; 19: 946-52.
45. Kulkens T, Bolhuis PA, Wolterman RA, Kemp S, te Nijenhuis S, Valentijn LJ, Hensels GW, Jennekens FGI, de Visser M, Hoogendijk JE, Baas F. Deletion of the serine 34 codon from the major peripheral myelin P0 gene in Charcot-Marie-Tooth disease type 1B. *Nature Genet* 1993; 5: 35-9.
46. Hayasaka D, Himoro M, Sawaiishi Y, Nanao K, Takahashi T, Takada G, Nicholson GA, Ouvrier RA, Tachi N. *De novo* mutation of the myelin protein P0 gene in Déjerine-Sottas disease (hereditary motor and sensory neuropathy type III). *Nature Genet* 1993; 5: 266-8.
47. Nelis E, Timmerman V, De Jonghe P, Vandenberghe A, Pham-Dinh D, Dautigny A, Martin JJ, Van Broeckhoven C. Rapid screening of myelin genes in CMT1 patients by SSCP analysis: identification of new mutations and polymorphisms in the P0 gene. *Hum Genet* 1994; 94: 653-7.
48. Latour P, Blanquet-Grossard F, Nelis E, Bonnebouche C, Chapon F, Diraison P, Ollagnon E, Dautigny A, Pham-Dinh D, Chazot G, Boucherat M, Van Broeckhoven C, Vandenberghe A. Mutations in the myelin protein zero gene associated with Charcot-Marie-Tooth disease type 1B. *Hum Mut* 1995; 6: 50-4.
49. Blanquet-Grossard F, Pham-Dinh D, Dautigny A, Latour P, Bonnebouche C, Corbillon E, Chazot G, Vandenberghe A. Charcot-Marie-Tooth type 1B neuropathy: third mutation of serine 63 codon in the major peripheral myelin glycoprotein P0 gene. *Clin Genet* 1995; 48: 281-3.
50. Blanquet-Grossard F, Pham-Dinh D, Dautigny A, Latour P, Bonnebouche C, Diraison P, Chapon F, Chazot G, Vandenberghe A. Charcot-Marie-Tooth type 1B neuropathy: a mutation at the single glycosylation site in the major peripheral myelin glycoprotein P0. *Hum Mut* 1996; 8: 185-6.
51. Rouger H, Le Guern E, Gouider R, Tardieu S, Birouk N, Gugenheim M, Bouche P, Agid Y, Brice A. High frequency of mutations in codon 98 of the peripheral myelin protein P0 gene in 20 french CMT1 patients. *Am J Hum Genet* 1996; 58: 638-41.
52. Warner LE, Hiltz MJ, Appel SH, Killian JM, Kolodny EH, Karpati G, Carpenter S, Watters GV, Wheeler C, Witt D, Bodell A, Nellis E, Van Broekhoven C, Lupski JR. Clinical phenotypes of different MPZ (P0) mutations may include Charcot-Marie-Tooth type 1B, Déjerine-Sottas, and congenital hypomyelination. *Neuron* 1996; 17: 451-60.
53. Shapiro L, Doyle JP, Hensley P, Colman DR, Hendrickson WA. Crystal structure of the extracellular domain from P0, the major structural protein of peripheral nerve myelin. *Neuron* 1996; 17: 435-49.
54. Gabreëls-Festen AAWM, Hoogendijk JE, Meijerink PHS, Gabreëls FJM, Bolhuis PA, van Beersum S, Kulkens T, Nelis E, Jennekens FGI, de Visser M, van Engelen BGM, Van Broeckhoven C, Mariman ECM. Two divergent types of nerve pathology in patients with different P0 mutation in Charcot-Marie-Tooth disease. *Neurology* 1996; 47: 761-5.
55. Lemke G. Unwrapping myelination. *Nature* 1996; 383: 395-6.
56. De Jonghe P, Timmerman V, Nelis E, Martin JJ, Van Broeckhoven C. Charcot-Marie-Tooth disease and related peripheral neuropathies. *J Peripher Nerv Syst* 1997 (sous presse).

## Summary

### Three genes, four demyelinating peripheral neuropathies: first genotype/phenotype correlations

In most vertebrates, axons are usually ensheathed by myelin, a multi-lamellar structure that ensures the fidelity of nerve transmission and increases considerably nerve conduction velocity along the fibers. In the peripheral nervous system (PNS), myelin is formed by the extension of the plasma membrane of Schwann cells that wrap in spiral as many as 50 layers of double membrane structures around the axon. The myelin sheaths consist mostly of compact myelin that expresses a distinct set of structural proteins, namely myelin protein zero (P0), which is the most abundant component, peripheral myelin protein 22 (PMP22) and mye-

lin basic protein. PNS compact myelin is interrupted by regions filled with cytoplasm, the incisures of Schmidt-Lanterman. These and the paranodal regions of Schwann cells express a distinct set of proteins that include myelin-associated glycoprotein and connexin 32 (Cx32). It has now been demonstrated that genetic abnormalities in the genes encoding PMP22, P0 and Cx32, are responsible for the vast majority of demyelinating peripheral neuropathies, known as Charcot-Marie-Tooth disease type 1, X-linked Charcot-Marie-Tooth, Déjerine-Sottas syndrome, hereditary neuropathy with liability to pressure palsies and

congenital hypomyelination. PMP22 is an integral membrane protein whose function is still poorly understood. P0 is a cell adhesion protein that contributes a sort of adhesive tape that holds together the extracellular leaflets of compact myelin. Cx32 is a channel-forming protein that is thought to provide the basis for a radial diffusional pathway of signaling molecules and metabolites across the myelin layers. Recent studies on the molecular structure and cell biology of these three pivotal proteins for myelin homeostasis have begun to shed light on some of the pathophysiological mechanisms that are specific to each syndrome.