

THÈSE DE NEURO-IMMUNOLOGIE

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ TOULOUSE III

Présentée et soutenue par

Julie MIRALVÈS

Le 19 Octobre 2007

EXPLORATION

DES RÔLES IMMUNO-MODULATEURS DE MECP2 ET DE SON TRANSFERT INTERCELLULAIRE

Directeur de Thèse : D^r Etienne JOLY

JURY

P^r Roland LIBLAU

Président

D^r Alain JOLIOT

Rapporteur

D^r Laurent VILLARD

Rapporteur

D^r Thierry BIENVENU

Examineur

D^r Daniel GONZALES-DUNIA

Membre Invité

Je voudrais d'abord adresser toute ma reconnaissance à mon directeur de thèse, le Dr Etienne Joly. Merci de m'avoir accueillie dans ton équipe à une époque tempétueuse pour moi, merci de m'avoir enseigné la pratique des sciences et la rigueur de la démarche expérimentale, de m'avoir transmis ta capacité d'enthousiasme et ta force, merci de m'avoir offert cette grande liberté de travail et de m'avoir accordé ta confiance. J'ai énormément appris de toi et je garderai longtemps le souvenir de ton enseignement et de ton humanité.

Merci à Denis, merci d'avoir répondu à toutes ces questions inopinées que j'ai pu te poser, merci de tes conseils avisés, de ton soutien et de ta grande générosité. Nous avons partagé pendant quelques temps un calme bureau et les émissions de France Inter de début d'après-midi, désormais le Moov' est de rigueur... alors tiens-bon.

Merci encore à toute mon équipe.

Merci Anne, pour ta joie et ton humour, ton écoute, tes conseils et tout le réconfort que tu as su m'apporter, merci pour toutes nos conversations et nos confidences chuchotées.

Merci Lara, pour ta bonne humeur, ta douceur et ta persévérance, je suis heureuse et fière de te transmettre aujourd'hui ce que j'ai appris et de te voir reprendre ce sujet avec tant d'enthousiasme.

Merci Sandrine, pour nos longues discussions et nos échanges, l'apprentissage du zen et tes blagues décalées mais jamais inintéressantes ; l'amitié que tu m'offres aujourd'hui sera longue, je l'espère...

Merci Eddy, merci pour ton aide et ton soutien sans faille, merci pour tous tes encouragements, ta gentillesse, ta générosité et ton amour débordant des autres et de la vie.

Merci Christine, merci pour ton sourire, ta sérénité et tes conseils rassurants, merci de savoir nous transmettre en quelques mots un peu de quiétude et de confiance.

Vous avez tous été d'un grand soutien pour moi ; votre chaleur, votre amitié et votre tendresse ont particulièrement compté ; merci pour les discussions, les fou-rires, le réconfort et tous ces moments partagés, je garde un souvenir heureux de ces années passées avec vous.

Merci encore à celles qui n'ont été que de passage mais avec qui j'ai passé de réels bons moments au coin d'une paillasse, d'une hotte vrombissante ou au détour d'un verre, merci Audrey, Anne-Laure, Elodie, Sophie et Florence.

Je tiens également à remercier Cathy, qui fut la première à m'accueillir et à m'encadrer lors de mon arrivée à Toulouse. Merci de m'avoir transmis ton savoir avec autant de naturel et de bonté, merci de ton amitié, de ta gentillesse et de l'immense soutien que tu as pu m'accorder.

Merci à tous ceux avec qui j'ai travaillé au cours de ces années et qui pour certains ont été bien plus que de simples collègues. Merci à Fatima et Valérie, pour votre gentillesse, votre dévouement et ces heures passées auprès de ce trieur si capricieux qui furent aussi de longues heures d'échange. Merci à Florence qui m'a appris l'immunohistochimie et ses aléas.

Je tiens à remercier également le Dr Brian Hendrich qui m'a accueillie au sein de son laboratoire pendant quelques mois, merci aussi à Isabel et Ruth, qui m'ont particulièrement aidée et encadrée lors de mon séjour à Edinburgh et qui ont su m'en transmettre les charmes malgré la grisaille et le froid estival de cette contrée.

Merci à tous ceux que j'ai pu rencontrer au cours de ces années de laboratoire, merci à Sophie, Aurélie, qui resteront longtemps encore de précieuses amies, merci Ingrid, Claire, Dania. Merci aux filles de l'équipe Cuvillier et à tous les membres de l'équipe Lutz. Merci à tous ces chercheurs qui m'ont transmis leur savoir et leurs conseils, Jean-Charles, Gilbert, Joost, Daniel, Abdel ou Amine. Et merci encore à tous ceux que j'ai sans doute oublié de citer mais qui ont peuplé et enrichi ma vie, étudiants, techniciens, chercheurs...

Enfin, merci à tous ceux qui partagent ma vie et qui m'accompagnent avec tant d'amour et de tendresse. Merci à ma famille, à mes amis, vous mériteriez des lignes, des chapitres, des livres entiers, il y a tant d'histoire, de rencontres, d'émotions partagées à raconter, mais vous connaissez tous ma pudeur à dire mes sentiments alors merci de me laisser simplement vous serrer dans mes bras.

On a conscience avant, on prend conscience après.

Oscar Wilde

RÉSUMÉ	1
ABSTRACT	2
LISTE DES ABRÉVIATIONS	3
LISTE DES ILLUSTRATIONS	4
INTRODUCTION	5
LE SYNDROME DE RETT	8
I. CARACTÉRISTIQUES CLINIQUES	8
1. <i>Définition</i>	8
2. <i>Symptômes et classification</i>	8
II. ORIGINE GÉNÉTIQUE ET MOLÉCULAIRE	9
1. <i>Mutations au sein du gène MECP2</i>	9
2. <i>Autres Mutations</i>	10
III. CORRÉLATION GÉNOTYPE-PHÉNOTYPE	10
1. <i>Type de Mutation</i>	10
2. <i>Profil d'Inactivation du Chromosome X</i>	11
IV. MODÈLES MURINS	12
1. <i>Délétion du gène Mecp2</i>	12
2. <i>Délétion conditionnelle de Mecp2</i>	13
3. <i>Mutation de Mecp2</i>	13
4. <i>Restauration de la fonctionnalité de Mecp2 dans les souris déficientes</i>	14
V. LE SYNDROME DE RETT AU REGARD DES MODÈLES MURINS	15
1. <i>Implication de MeCP2 dans la différenciation et la maturation neuronale</i>	15
2. <i>Implication de MeCP2 dans la plasticité, la mémorisation et le comportement</i>	16
METHYL CpG BINDING PROTEIN 2	18
I. CARACTÉRISTIQUES BIOCHIMIQUES ET STRUCTURALES	18
1. <i>Identification de MeCP2 et de ses isoformes</i>	18
2. <i>Domaines fonctionnels</i>	19
II. PROFIL ET RÉGULATION DE L' EXPRESSION DE MECP2 DANS LE SYSTÈME NERVEUX CENTRAL	19
III. FONCTIONS BIOLOGIQUES	21
1. <i>Répression de la transcription</i>	21
1.1. <i>Dé-acétylation des Histones</i>	21
1.2. <i>Méthylation des Histones</i>	21
1.3. <i>Modulation Directe de la Machinerie Transcriptionnelle :</i>	22
2. <i>Modification structurale des histones et de l'architecture chromatinienne</i>	22
3. <i>Épissage alternatif</i>	23
4. <i>Maintien du profil de méthylation des gènes au cours de la réplication</i>	24
IV. GÈNES CIBLES	24
1. <i>Identification de gènes cibles par approche globale</i>	24
2. <i>Gènes soumis à l'empreinte génétique parentale</i>	25
3. <i>Gène du Brain-derived neurotrophic factor</i>	26
4. <i>Les gènes de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien</i>	27
V. IMPLICATIONS PHYSIOPATHOLOGIQUES	28
1. <i>Pathologies neurologiques liées au défaut de MeCP2</i>	28
2. <i>Pathologies neurologiques liées à une surexpression de MECP2</i>	28
VI. CONCLUSION	29

LE COMPLEXE MAJEUR D'HISTOCOMPATIBILITÉ DE CLASSE I	30
I. DÉFINITION ET CARACTÉRISTIQUES GÉNÉRALES	30
1. <i>Les molécules de CMH de classe I</i>	30
1.1. Caractéristiques biochimiques et structurales	30
1.2. Apprêtement et présentation des antigènes par les molécules de CMH de classe I	31
2. <i>Les gènes du CMH de classe I</i>	31
2.1. Organisation génomique du complexe majeur d'histocompatibilité	31
2.2. Régulation transcriptionnelle des gènes du CMH de classe I	32
Le promoteur cœur des gènes de CMH de classe I	33
Éléments et facteurs impliqués dans le contrôle de l'expression des gènes du CMH I	33
Contrôle de l'expression des gènes de CMH de classe I par remodelage de la chromatine	34
II. LE CMH DE CLASSE I ET LE SYSTÈME IMMUNITAIRE	34
1. <i>Rôle des molécules de CMH de classe I dans la différenciation et la sélection thymique</i>	35
2. <i>Rôle des molécules de CMH de classe I dans l'initiation et la modulation des réponses immunitaires cellulaires</i>	36
2.1. Initiation des réponses T cytotoxiques	36
2.2. Modulation des réponses cytolytiques par les cellules NK	37
III. LE CMH DE CLASSE I ET LE SYSTÈME NERVEUX	38
1. <i>Le CMH de classe I dans le développement et la plasticité du SNC</i>	38
2. <i>Le CMH de classe I et la fonctionnalité synaptique</i>	40
3. <i>Le CMH de classe I et l'organe voméro-nasal</i>	40
IV. CONCLUSION	41

RÉSULTATS 42

PARTIE I – EXPLORATION DES RÔLES IMMUNO-MODULATEURS DE MeCP2	43
CONTEXTE ET HYPOTHÈSE DE TRAVAIL	44
MANUSCRIT I – <i>High levels of MeCP2 depress MHC class I molecules expression in neuronal cells</i>	44
MANUSCRIT I – SYNTHÈSE DES RÉSULTATS	46
1. <i>La surexpression transitoire de MeCP2 réduit le niveau d'expression basal des molécules de CMH de classe I.</i>	46
2. <i>La surexpression transitoire de MeCP2 bloque l'induction des molécules de CMH de classe I par l'IFN-γ.</i>	46
3. <i>Des formes mutées de MeCP2, responsables de syndromes de Rett, conservent un effet répresseur sur les molécules de CMH de classe I.</i>	46
4. <i>L'expression du CMH de classe I est peu modifiée dans les cerveaux adultes de souris MeCP2-KO et inchangée dans les neurones issus de nouveau-nés.</i>	47
EXPLORATION DU SYSTÈME IMMUNITAIRE DES SOURIS MeCP2-KO	48
CONTEXTE	49
OBSERVATIONS	50
1. <i>Les souris déficientes en Mecip2 montrent une diminution importante de la taille de leurs organes lymphoïdes.</i>	50
2. <i>La population thymique double positive (CD4⁺CD8⁺) des souris déficientes en Mecip2 disparaît en corrélation avec l'aggravation de la pathologie.</i>	50
3. <i>La délétion de Mecip2 s'accompagne d'altérations de l'architecture splénique.</i>	51
4. <i>Le phénotype immun lié au déficit de Mecip2 est récessif.</i>	51
POURSUITE DES TRAVAUX	51
DISCUSSION	52

PARTIE II – EXPLORATION DU TRANSFERT INTERCELLULAIRE DE MECP2	58
CONTEXTE ET OBJECTIF	59
MANUSCRIT II – <i>The Rett Syndrome Transcription Factor MeCP2 transfers efficiently between adjacent Neuronal Cells</i>	61
MANUSCRIT II – SYNTHÈSE DES RÉSULTATS	62
1. <i>Les formes humaines et murines de MeCP2 ont la capacité d'être transférées entre cellules adjacentes.</i>	62
2. <i>Le transfert intercellulaire de MeCP2 est spécifique de l'espèce et du type cellulaire des partenaires en interaction.</i>	62
3. <i>Le transfert intercellulaire de MeCP2 est une propriété neuronale.</i>	62
4. <i>Le transfert intercellulaire de MeCP2 est bloqué par le 18-βGA.</i>	63
5. <i>Les formes mutées T158M, R133C et R306C de MeCP2, impliquées dans le syndrome de Rett, conservent leur capacité de transfert.</i>	63
6. <i>Des cellules primaires issues de cultures gliales mixtes ont la capacité à internaliser la protéine MeCP2 transmise par les transfectants N2A.</i>	63
7. <i>Autres résultats, non présentés.</i>	63
DISCUSSION	64
CONCLUSION GÉNÉRALE	68
RÉFÉRENCES	71
ANNEXE	89

RÉSUMÉ

Le syndrome de Rett est une pathologie neurodéveloppementale progressive sévère, provoquée par des mutations dominantes du gène *MECP2*. La protéine MeCP2, fortement exprimée dans les neurones matures, est un répresseur transcriptionnel de la famille des *methyl-CpG-binding proteins* (MBP) caractérisées par leur capacité de liaison aux nucléotides CpG méthylés. Bien que les mécanismes moléculaires responsables du syndrome de Rett demeurent obscurs, il semble probable que cette pathologie soit due à l'expression incontrôlée de gènes normalement réprimés par MeCP2 dans les neurones. Une étape clé dans la compréhension de cette maladie sera donc d'identifier les gènes cibles de MeCP2.

Mes travaux de thèse ont consisté à évaluer l'hypothèse selon laquelle les gènes codant pour les molécules du CMH de classe I, riches en îlots CpG, pourraient être contrôlés par MeCP2 au sein du système nerveux central (SNC). En effet, ces molécules sont impliquées dans l'établissement des connexions neuronales fines au cours de la synaptogenèse et dans la plasticité cérébrale puis sont activement réprimées dans les neurones matures. Les molécules de CMH de classe I présentent donc un profil d'expression au sein du SNC complexe qui doit être finement et activement régulé.

Nous avons donc envisagé qu'en absence de MeCP2, une dérégulation des gènes du CMH pourrait non seulement altérer le statut immunologique des tissus nerveux mais également perturber l'établissement et le remodelage des connexions neuronales, et ainsi contribuer à la progression de la pathologie qui se développe chez les patientes atteintes du syndrome de Rett.

Un modèle de transfection transitoire de lignée neuronale murine nous a permis de mettre en évidence que la surexpression de MeCP2 conduit à une réduction spécifique de l'expression basale et inductible des molécules de CMH de classe I en surface cellulaire. Cependant, cette répression ne semble pas être impliquée dans la pathogenèse du syndrome de Rett. En effet, nous avons généré des formes de MeCP2 portant des mutations correspondant à celles responsables du syndrome et observé qu'elles avaient une activité de répression du CMH comparable à celle des formes sauvages.

Néanmoins, MeCP2 semblerait être dotée de fonctions immuno-modulatrices en périphérie. La caractérisation du système immunitaire des souris déficientes en *Mecp2* nous a en effet permis de relever des altérations significatives de leurs populations thymiques et de l'architecture splénique.

Enfin, mes travaux de thèse nous ont également conduit à découvrir la capacité de MeCP2 à être transmise très efficacement entre cellules adjacentes au sein des populations neuronales selon un mode espèce et tissu-spécifique. L'exploration des mécanismes moléculaires et de la relevance physiologique de ce phénomène est actuellement en cours. Au final, ces travaux pourraient déboucher sur un nouvel éclairage des mécanismes physiopathologiques impliqués dans le syndrome de Rett.

ABSTRACT

Mutations in the X-linked MECP2 gene are the cause of the Rett Syndrome (RTT), a progressive neurodevelopmental disorder leading to important neurological deficiencies, including motor, vegetative and cognitive dysfunctions. To date, despite the identification of MECP2 mutations as the central cause for RTT and the generation of several mouse models mimicking the human disease, the molecular basis for the pathogenesis of the syndrome still remains to be clearly elucidated.

MeCP2 (Methyl-CpG-binding protein 2) has been shown to harbour a transcriptional repression activity by its ability to bind methylated CpG nucleotides and to recruit co-repressor complexes. Moreover, MeCP2 is involved in RNA splicing regulation of target genes, takes part in the chromatin architecture and can also associate with Dnmt1, the maintenance DNA methyl-transferase. MeCP2 is therefore a multifunctional protein that is involved at many levels of genes' regulation.

MHC class I molecules, whose genes are particularly rich in CpG islands, are required in the brain for the establishment and maintenance of neuronal connections during development, in plastic remodelling in the hippocampus and in neuronal signalling in specific brain areas. But at the same time, overall MHC expression is also tightly repressed in the mature central nervous system (CNS), which contributes to the immune privileged status of the CNS. We thus hypothesized that MeCP2, the expression of is under strict temporal and spatial regulation in the brain, could contribute to repressing MHC expression in the brain.

We have actually found that, in transiently transfected cells, those that express very high levels of MeCP2 do indeed show a specific down-modulation of cell-surface basal and inducible expression of MHC class I molecules. But further experiments on two models related to Rett syndrome lead us to conclude that this repression is unlikely to be implicated in the pathogenesis of Rett syndrome.

Nevertheless, even if an immuno-regulatory function of MeCP2 is not immediately relevant in the CNS, it appears to be involved in the periphery for the normal development of the immune system since MeCP2^{tm1.1Bird -/y} mice present significant quantitative and qualitative defaults of their thymic populations.

Lastly, we show that, when MeCP2 is expressed by the N2A cells in culture, it transfers very rapidly and efficiently to the nucleus of adjacent cells. This transfer is apparently cell type and species specific and seems to be a neuronal property.

Our work sheds light on new immuno-modulatory properties of MeCP2 and on its intercellular transfer propensity which could likely have important implications in designing therapies for RTT patients.

BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CaMKII	Calmoduline kinase II
CDLX5	Cyclin-dependent kinase like 5
Crh	Corticotropin-releasing hormone
CTL	Cytotoxic T lymphocyte
CIITA	Class II transactivator
CPA	Cellules présentatrices d'antigène
Dlx	Distal less homeobox
Dnmt1	DNA methyl-transferase 1
DRiPs	Defective ribosomal products
ERAP1/2	Endoplasmic Reticulum-luminal aminopeptidase 1/2
GABRB3	Gamma-aminobutyric acid receptor, subunit 3
GABA	Gamma-aminobutyric acid
HDAC	Histone deacetylase
HAT	Histone acetyl-transferase
HLA	Human leukocyte antigen
IFN- γ	Interferon- γ
ISRE	IFN stimulated response element
IRF	Interferon-regulatory factor
IL-2	Interleukin 2
KIR	Killer cell Immunoglobulin-like Receptor
LTP	Long-term potentiation
LTD	Long-term depression
MeCP2	Methyl CpG Binding protein 2
MBD	Methyl-CpG binding domain
NTNG1	Netrin G1
NK	Natural Killer cell
PPM-X	Psychosis, Pyramidal signs, Macro-orchidism X-linked syndrome
RTT	Rett syndrome
RAG	Recombination activating genes
Sgk	Serum glucocorticoid-inducible kinase 1 gene
SNC	Système nerveux central
TM	Tamoxifen
TRD	Transcription repression domain
TCR	T cell receptor
TAP	Transporter associated with antigen processing
TNF- α	Tumor necrosis factor- α
TTX	Tetrodotoxine
UBE3A	Ubiquitin protein ligase E3A
USF-1/2	Upstream stimulatory factor-1/2
XCI	X-chromosome inactivation
YB-1	Y-box-binding protein 1

Illustration 1	Critères diagnostiques des formes classiques et atypiques du syndrome de Rett
Illustration 2	Résumé des mutations du gène MeCP2 à l'origine de syndromes de Rett
Illustration 3	Stratégies de génération des souris déficientes pour <i>Mecp2</i>
Illustration 4	Organisation génomique et domaines fonctionnels de MeCP2
Illustration 5	Distribution spatiale et temporelle de MeCP2 au cours des développements humains et murins
Illustration 6	Régulation de la transcription et du remodelage de la chromatine par MeCP2
Illustration 7	Modèles d'induction de changements conformationnels de l'ADN et des nucléosomes par MeCP2
Illustration 8	Organisation d'une boucle chromatinienne silencieuse au <i>locus Dlx5-Dlx6</i> par MeCP2
Illustration 9	Mécanismes moléculaires de maintien du profil de méthylation des gènes impliquant MeCP2
Illustration 10	Structure tridimensionnelle des molécules H-2K ^b
Illustration 11	Voie de présentation des antigènes par les molécules de CMH de classe I
Illustration 12	Organisation schématique du <i>locus</i> du CMH
Illustration 13	Facteurs activateurs des promoteurs des gènes du CMH de classe I et de la β 2-microglobuline
Illustration 14	Schéma général du développement thymique
Illustration 15	Réponse immunitaire à médiation cellulaire T
Illustration 16	Balance d'activation et d'inhibition des cellules <i>Natural Killer</i>

EXPLORATION
DES RÔLES IMMUNO-MODULATEURS DE MECP2
ET DE SON TRANSFERT INTERCELLULAIRE



INTRODUCTION

INTRODUCTION

Le statut immuno-privilegié du système nerveux central (SNC) est un concept élaboré par Medawar en 1948 sur la base d'observations expérimentales. Les premières données ont été obtenues suite à des expériences de greffes et l'observation d'une survie prolongée des tissus étrangers dans le SNC ; contrairement à leur implantation sous-cutanée qui conduit à un rejet rapide par le système immunitaire. De même, l'injection du bacille de Calmette et Guérin dans le parenchyme cérébral initie le recrutement de macrophages dans le SNC mais échoue à déclencher la réponse lymphocytaire pro-inflammatoire observée en périphérie.

Au fil des ans, la notion d'immuno-privilege central s'est établie sur 1) l'isolement du SNC vis-à-vis du système immunitaire par la barrière hémato-encéphalique, 2) l'absence de drainage lymphatique, 3) l'absence d'expression des molécules du complexe d'histocompatibilité (CMH) de classe I, 4) l'immuno-incompétence apparente de la microglie, macrophages résidents du SNC.

Des études récentes ont néanmoins montré que le SNC n'est pas isolé, ni passif dans ses interactions avec le système immunitaire. Les cellules immunitaires périphériques traversent la barrière hémato-encéphalique, même intacte, les neurones centraux et la glie régulent activement les réponses lymphocytaires ou macrophagiques et la microglie présente des compétences immunes en orientant les réactions lymphocytaires vers des réponses neuroprotectives.

De même, l'expression des molécules de CMH de classe I au sein du SNC n'est pas figée. En effet, il est apparu depuis quelques années, notamment grâce aux travaux du groupe de Carla Shatz, que ces molécules sont impliquées dans l'établissement et le remodelage des connexions neuronales au cours de la synaptogenèse et dans les régions plastiques du SNC puis sont activement réprimées dans les neurones adultes sains. Leur expression est induite dans les neurones matures uniquement en cas de lésions ou dans des contextes inflammatoires. Les molécules de CMH de classe I présentent donc un profil d'expression au sein du SNC complexe qui doit être précisément et activement régulé dans l'espace et dans le temps.

Ces travaux de thèse s'inscrivent dans le cadre des études menées par l'équipe du D^r Etienne Joly depuis plus de dix ans sur les mécanismes de régulation de l'expression des molécules de CMH de classe I au sein des neurones. L'hypothèse à l'origine de ce travail résulte d'une rencontre avec le D^r Brian Hendrich de l'*Institute for Stem Cell Research* (Edinburgh). Le D^r Hendrich a apporté une contribution majeure à la caractérisation et à la compréhension des rôles de MeCP2 (*Methyl CpG Binding protein 2*).

La protéine MeCP2, fortement exprimée dans les neurones matures, appartient à la famille des *methyl-CpG-binding proteins* caractérisées par leurs activités de liaison aux nucléotides CpG méthylés. La capacité de liaison à de tels sites au sein des promoteurs et de recrutement de facteurs de corépression, comme des histones déacétylases par exemple, confère à MeCP2 une action de répresseur de la transcription.

Les mutations du gène *MECP2*, localisé sur le chromosome X, sont à l'origine d'une pathologie neurodéveloppementale grave, le syndrome de Rett. Bien que les mécanismes moléculaires responsables de ce syndrome demeurent obscurs, il semble probable que cette pathologie soit due à l'expression incontrôlée de gènes normalement réprimés par MeCP2 dans les neurones, conduisant à des altérations des fonctions

cérébrales. Une étape clé dans la compréhension de cette maladie sera donc d'identifier les gènes cibles de MeCP2.

Nous avons élaboré l'hypothèse selon laquelle les gènes codant pour les molécules du CMH de classe I, riches en îlots CpG, pourraient être des gènes contrôlés par MeCP2 au sein du SNC. Nous avons en effet envisagé qu'en absence de MeCP2, une dérégulation des gènes du CMH pourrait perturber l'établissement et le remodelage des connexions synaptiques, altérer le statut immunologique des tissus nerveux et ainsi contribuer à la progression de la pathologie qui se développe chez les patientes atteintes du syndrome de Rett.

L'introduction générale de cette thèse vous présentera dans un premier temps le syndrome de Rett et ses modèles d'études murins, qui ont permis de nombreuses avancées dans la compréhension de sa pathogenèse. Je résumerai les connaissances actuelles sur MeCP2, ses caractéristiques biochimiques, ses fonctions et les premières pistes développées quant à la nature de ses gènes cibles. Enfin, j'aborderai de façon succincte le complexe majeur d'histocompatibilité en centrant mon propos sur les molécules de CMH de classe I qui furent au coeur de mes travaux. Je vous décrirai notamment quelques-uns de leurs rôles dans le système immunitaire et dans le système nerveux.

LE SYNDROME DE RETT

I. CARACTÉRISTIQUES CLINIQUES

1. Définition

Le syndrome de Rett (RTT ; OMIM 312750), décrit pour la première fois en 1966 par le D^r Andreas Rett (1), est une pathologie neurodéveloppementale progressive conduisant à un poly-handicap lourd associé à des retards mentaux sévères (2).

Le syndrome de Rett a pour principale origine des mutations du gène *methyl-CpG binding protein 2 (MECP2)* localisé sur le chromosome X (3). Il affecte une naissance de fille pour 10 000 à 15 000, avec une pénétrance de presque 100 %, et constitue ainsi la première cause génétique à l'origine de retards mentaux graves chez les femmes (4).

2. Symptômes et classification

La grande variabilité de progression et de sévérité de la maladie a conduit à définir selon un panel de critères cliniques, des formes dites classiques et des variants atypiques de RTT (5, 6) (Illustration 1). Les différents signes cliniques permettant le diagnostic du syndrome de Rett s'inscrivent dans un profil évolutif caractéristique de la maladie qui peut se décrire en quatre périodes majeures :

- une stagnation du développement à des stades précoces ;
- une phase de régression rapide ;
- une stabilisation apparente ;
- une détérioration motrice tardive.

Ainsi, les petites filles atteintes de la forme classique du syndrome naissent sans symptôme apparent et se développent normalement au cours des premiers mois de leur vie, franchissant les étapes psychomotrices attendues. Des études récentes ont néanmoins montré que de subtils troubles du comportement pouvaient apparaître au cours de cette période (7-9).

Après 6 à 18 mois, ces enfants entrent dans une phase de stagnation ; leur développement se ralentit, une hypotonie générale ainsi qu'une diminution de l'intérêt pour les jeux et leur entourage apparaît. Cette phase est alors suivie d'une régression rapide et majeure. Elle se traduit par la perte du langage, des capacités motrices ou d'apprentissage et s'accompagne d'un retard de croissance, notamment une décélération du développement cérébral aboutissant à une microcéphalie. Des études d'imagerie cérébrale et d'histologie *post-mortem* sur des cerveaux de patients atteints de RTT ont clairement montré une réduction globale de la taille du cerveau et du cervelet (10, 11), conséquence à la fois d'une réduction de taille des neurones, de leur plus forte compaction au sein des structures centrales (12, 13) et d'une réduction de l'arborisation dendritique (10, 14).

Les mouvements volontaires des mains sont remplacés par des stéréotypies ; les anomalies motrices incluent apraxie, ataxie, spasticité, tremblements et dystonie. La majorité des filles atteintes de RTT développent des épilepsies et des comportements autistiques ; des troubles respiratoires majeurs comme l'hyperventilation ou l'apnée sont également fréquents (15, 16). Après une stabilisation apparente de l'ensemble de ces traits, les enfants atteints du syndrome de Rett subissent alors des détériorations tardives, se manifestant sur plusieurs années, qui se caractérisent par une perte complète de motricité, une atrophie musculaire, de fortes scoliose et des troubles trophiques.

II. ORIGINE GÉNÉTIQUE ET MOLÉCULAIRE

Pendant de longues années, l'origine du syndrome de Rett est restée un mystère pour la communauté scientifique et source de débats (2, 17, 18) ; bien que sa nature génétique fut rapidement présumée, notamment par son diagnostic d'abord exclusif chez les filles, son analyse fut difficile à établir en raison de son apparition spontanée au sein de la population.

Des expériences d'exclusion chromosomique sur les patients atteints des rares formes familiales de RTT ont d'abord permis de réduire l'origine génétique du syndrome de Rett au *locus* Xq28 (19, 20). Des mécanismes de réarrangement génomique constituant une origine potentielle de ce syndrome, une recherche systématique de microdélétions dans ce *locus* a été menée et a exclu la possibilité de délétions de taille supérieure à 100 kb, suggérant ainsi un mécanisme dépendant d'un unique gène. Puis en 1999, grâce à un criblage systématique des mutations des gènes inclus dans cette région chez des patients atteints de formes sporadiques ou familiales de la maladie et après exclusion de gènes candidats (21, 22), l'équipe du Dr Huda Zoghbi a pu identifier les mutations du gène *methyl-CpG binding protein 2 (MECP2)* comme cause du syndrome de Rett (3). Les filles affectées par cette pathologie sont donc hétérozygotes pour les mutations de *MECP2*, lui-même soumis au mécanisme d'inactivation du chromosome X.

1. Mutations au sein du gène *MECP2*

Les mutations du gène methyl-CpG binding protein 2 (*MECP2*), plus de 2 000 répertoriées à ce jour, sont à l'origine de 96 % des cas de syndrome de Rett. Ces mutations *de novo* (23, 24) recouvrent des mutations faux-sens, non-sens, des modifications du cadre de lecture ou encore des délétions intragéniques (25). Près de 70 % de ces mutations proviennent de transitions C-T au sein de huit îlots CpG sensibles (26), alors que des délétions carboxy-terminales sont impliquées dans 10 à 15 % des cas (Illustration 2).

Le syndrome de Rett ayant été d'abord exclusivement diagnostiqué chez les filles, il fut largement présumé que les mutations de *MECP2* étaient probablement létales *in utero* pour les garçons en raison d'un mécanisme de dominance lié à l'X. Aujourd'hui, il est clair que des garçons peuvent également être porteurs de telles mutations et développer des pathologies neurologiques dont le phénotype varie en fonction du site et de la nature de la mutation (27, 28).

Certains de ces garçons développent de sévères encéphalopathies néonatales et meurent au cours de leurs deux premières années de vie. Dans ce cas, ces enfants sont porteurs des mêmes mutations que celles observées chez les filles atteintes de RTT mais développent un phénotype plus sévère (29-31).

D'autres présentent des symptômes très similaires à ceux rencontrés dans les cas classiques de RTT, symptômes qui résultent d'un mosaïsme pour des mutations somatiques de *MECP2* (32, 33) ou de mutations sur l'un des deux chromosomes X dans le cas d'un syndrome de Klinefelter (caryotype 47XXY) (34, 35).

Enfin, des mutations de *MECP2*, non décrites à ce jour chez les filles atteintes de RTT, provoqueraient chez des garçons des désordres neurologiques et/ou psychiatriques (36-38).

2. Autres Mutations

Bien que les mutations de *MECP2* soient à l'origine de la quasi-totalité des formes classiques du syndrome de Rett, elles ne sont identifiées que dans 47 à 50 % des formes atypiques (39).

Récemment des études ont montré que des mutations affectant le gène codant pour la cyclin-dépendent kinase like 5 (*CDLX5/STK9*), par ailleurs responsables d'épilepsies précoces et de retards mentaux sévères, sont impliquées dans le développement de formes atypiques du syndrome de Rett (40-44).

Par ailleurs, une translocation responsable de la rupture du gène codant pour la netrin G1 (*NTNG1*), impliquée dans le guidage axonal et le maintien de circuits neuronaux glutamatergiques, a été diagnostiquée chez une patiente présentant des signes cliniques caractéristiques de RTT et constitue une piste potentielle de l'origine des formes atypiques du syndrome de Rett sans mutation de *MECP2* (45, 46).

III. CORRÉLATION GÉNOTYPE-PHÉNOTYPE

Différentes tentatives pour réaliser une corrélation entre génotype et phénotype ont été réalisées, mais les études menées ont souvent conduit à des résultats contradictoires (47-49). Cependant, le type de mutation et la balance d'inactivation entre chromosomes X sont deux sources connues de la variabilité phénotypique rencontrée chez des patientes atteintes des mêmes mutations à l'origine de leur syndrome de Rett (26).

1. Type de Mutation

Les patientes porteuses de mutations de *MECP2* responsables d'une protéine tronquée à son extrémité C-terminale présentent des phénotypes moins sévères et moins caractéristiques d'un RTT classique que celles porteuses de mutations faux-sens ou à l'origine de protéines tronquées plus en amont (50). Cependant, cette observation n'est pas systématique puisque des mutations faux-sens ou non-sens en C-terminal peuvent tout à fait être responsables de formes classiques ou atypiques de RTT.

De plus, des études menées par Wan *et al.* ont mis en évidence que des filles porteuses de la même mutation peuvent présenter des phénotypes complètement différents, ce qui indique clairement que d'autres facteurs que le type ou la position de la mutation influencent la sévérité du syndrome (26). Il semble donc évident que le fond génétique et la balance d'inactivation entre chromosomes X influencent fortement les conséquences phénotypiques d'une mutation donnée.

2. Profil d'Inactivation du Chromosome X

Le gène *MECP2*, localisé sur le chromosome X, est soumis au mécanisme d'inactivation du chromosome X (XCI). Ce processus cellulaire normal de l'embryogenèse précoce assure dans chaque cellule mammifère femelle le passage de l'un des chromosomes X d'un état euchromatique actif vers un état hétérochromatique inactif. L'XCI aboutit donc à l'extinction transcriptionnelle des gènes sur l'un des deux chromosomes X et assure un dosage génétique équivalent entre mâles XY et femelles XX (51). Une fois établie, l'inactivation est stable et héritée de façon clonale au cours des divisions cellulaires.

Chez les patientes atteintes du syndrome de Rett, l'inactivation aléatoire dans chacune de leurs cellules de l'un ou l'autre des deux chromosomes X signifie donc que, en moyenne, 50 % de leurs cellules ont inactivé l'X porteur de la mutation et expriment donc l'allèle sauvage, alors que 50 % ont inactivé l'X porteur de l'allèle sauvage et expriment donc une protéine mutée, tronquée ou instable et sont donc effectivement déficientes pour l'expression de MeCP2. Les patientes RTT sont donc chimères pour l'expression des formes sauvages et mutées de MeCP2.

À ce jour, plusieurs observations plaident en faveur de l'hypothèse d'une influence majeure du ratio d'XCI sur la sévérité du syndrome de Rett. Par exemple, des sœurs jumelles porteuses d'une même mutation R294X ont présenté des caractéristiques cliniques très différentes. L'une des fillettes, montrant un XCI équilibré, est touchée par une forme sévère du syndrome de Rett alors que sa sœur, possédant un déséquilibre marqué du ratio d'XCI en faveur de l'expression de l'allèle maternel, n'est affectée que d'une forme légère de RTT (52). De même, dans les rares formes familiales, certaines femmes hétérozygotes pour des mutations de *MECP2* ayant un important biais d'XCI, *a priori* protecteur, ne montrent que de faibles signes cliniques de RTT ou restent même asymptomatiques. Leurs filles quant à elles, qui possèdent une balance d'XCI équilibrée, sont atteintes de formes classiques de RTT (19, 20, 53).

Cependant, dans ces études, le profil d'inactivation du chromosome X a été établi sur les lymphocytes périphériques et rien ne permet de présumer que ce profil soit parfaitement équivalent à celui rencontré dans le système nerveux central. En effet, les clones lymphocytaires T qui expriment l'allèle muté de *MECP2* présentent une réponse aux signaux mitogéniques amoindrie (54), le grand nombre de divisions cellulaires effectuées par cette population pourrait favoriser l'émergence de clones sauvages et serait donc susceptible d'induire un biais du profil d'XCI sur la population lymphocytaire globale qui ne sera pas le reflet de celui de la population neuronale. L'utilisation des populations lymphocytaires pour évaluer le profil d'XCI dans le cadre du syndrome de Rett est d'ailleurs remise en cause par différentes études. En effet, des travaux réalisés sur les cerveaux de malades indiquent que le ratio d'XCI dans le cortex cérébral ou le cervelet de patients RTT est équilibré entre chaque chromosome X quels que soient la mutation et le phénotype de ces patients (49, 55, 56). En revanche, au sein des tissus périphériques de ces mêmes sujets, la balance d'XCI est biaisée (55). Enfin, alors qu'un XCI équilibré est observé dans les structures nerveuses globales de ces patients, une variabilité intra-individuelle est observée entre structures neuro-anatomiques et s'accompagne en périphérie d'un biais d'XCI au sein des tissus non neuronaux (47).

Ainsi, bien que des ratios d'inactivation du chromosome X en faveur de l'expression de l'allèle sauvage aient été reportés chez certains patients porteurs sains ou légèrement affectés (53, 57, 58), le syndrome de Rett ne s'accompagne pas systématiquement d'un biais du ratio d'inactivation/expression entre allèles sauvages et

mutés. Ces observations suggèrent donc qu'un biais d'XCI n'est pas seul à l'origine des variations phénotypiques observées entre patients, d'autres facteurs génétiques ou épigénétiques semblent y participer.

IV. MODÈLES MURINS

L'identification de mutations de *MECP2* comme étant à l'origine du syndrome de Rett a ouvert la voie à son exploration *via* des modèles animaux. Quatre modèles de souris transgéniques ont été générés, chacun présentant des mutations ou délétions et des phénotypes différents mais tous mimant étroitement la physiopathologie du syndrome de Rett (Illustration 3).

1. Délétion du gène *Mecp2*

Les premières tentatives menées pour générer des souris porteuses d'un gène *Mecp2* invalidé ont abouti à la mort des chimères à des stades embryonnaires (59). Ces premiers résultats ont conduit les équipes dirigées respectivement par le D^r Adrian Bird et le D^r Rudolph Jaenisch à utiliser des approches de *knock-out* conditionnel grâce à la technologie *Cre-lox*. Le gène *Mecp2* est amputé de son exon 3 dans le modèle *Mecp2*^{1lox} (60) et de ses exons 3 et 4 pour le modèle *Mecp2*^{tm1-1Bird} (61).

La survie de ces souris déficientes pour l'expression de *Mecp2* indique que contrairement aux premières prévisions, le défaut d'expression de *Mecp2* n'est pas létal aux stades embryonnaires. Les souris déficientes en *Mecp2* (*i.e* mâles hémizygotés) apparaissent sains à la naissance puis développent de premiers symptômes entre 3 à 8 semaines : troubles du comportement, démarche non-coordonnée et réduction des mouvements spontanés ; leur état général s'aggrave ensuite, reflet de dysfonctionnements neurologiques progressifs, jusqu'à leur mort à environ 9 semaines.

Les femelles hétérozygotes *MeCP2*^{+/-} sont viables, fertiles et semblent normales jusqu'à l'âge adulte, bien que leur génotype corresponde à celui des filles atteintes du syndrome de Rett. Entre 3 à 6 mois, des symptômes neurologiques comparables à ceux observés dans le RTT apparaissent néanmoins chez ces souris : inertie, troubles respiratoires, rétraction des pattes arrières.

L'architecture cérébrale de ces souris est globalement normale mais s'accompagne d'une légère diminution de la taille des neurones et d'une augmentation de leur compaction dans l'hippocampe, le cortex cérébral et le cervelet (60, 62). Ces altérations corrélerent avec la pathologie humaine pour laquelle de tels défauts ont été décrits et contribuent probablement à la diminution de taille du cerveau des patients RTT (10, 12, 13).

Ces observations valident donc l'utilisation des souris *Mecp2*^{1lox} et *Mecp2*^{tm1-1Bird} comme modèles d'étude du syndrome de Rett humain, puisqu'une apparition différée de symptômes neurologiques affectant posture, démarche, système respiratoire et mouvements spontanés est observée dans les deux cas.

Plus récemment, l'équipe du D^r Patrick Tam a généré une souche de souris dont le gène *Mecp2* est également amputé de ses exons 3 et 4 (63). Les souris *Mecp2*^{tm1Tam} présentent des caractéristiques générales similaires à celles des souris *Mecp2*^{tm1-1Bird} et *Mecp2*^{1lox} avec néanmoins quelques variantes comme l'apparition des dysfonctions motrices dès 8 à 11 semaines, une diminution de l'anxiété et, décrits pour la première fois, des défauts cognitifs liés à des troubles de l'apprentissage et de la mémoire impliquant amygdale et hippocampe. Les

travaux de cette équipe ont conduit au croisement des femelles *Mecp2*^{tm1neoTam} avec des mâles *Paf* (la mutation *Patchy fur* provoque un défaut de ségrégation des chromosomes X et Y au cours de la méiose et la génération de gamètes dépourvus de chromosome sexuel) afin de générer des femelles *Mecp2*^{tm1Tam} 39 XO et des mâles *Mecp2*^{tm1Tam} 40 XY. Dans ces portées, l'allèle maternel commun X est muté ; mâles et femelles ne diffèrent donc que par l'expression des gènes du chromosome Y. Cette souche a été produite dans le but d'explorer l'influence des gènes liés à l'Y sur les manifestations phénotypiques du syndrome de Rett. En effet, chez les garçons, les mutations de *MECP2* sont à l'origine d'un large spectre de pathologies neurologiques. Mais ces mutants ont révélé que les gènes liés à l'Y n'ont pas d'effet significatif sur le phénotype associé à la perte d'expression de *Mecp2* (63).

2. Délétion conditionnelle de *Mecp2*

Les modèles de délétion conditionnelle de *Mecp2* restreinte à certains lignages mettent en évidence que les traits caractéristiques de la pathologie sont dus à l'absence de MeCP2 dans le système nerveux. En effet, la délétion de *Mecp2* par nestin-Cre, ciblant les lignages neuronaux et gliaux, résulte en un phénotype non distinguable de celui observé chez les souris pour lesquelles *Mecp2* est invalidé dans l'ensemble des tissus. L'inactivation de *Mecp2* uniquement dans les neurones post-mitotiques (système CamK-Cre93) provoque une apparition retardée des symptômes qui restent néanmoins similaires à ceux des souris déficientes dans leurs lignées germinales ou exprimant nestin-Cre (64). MeCP2 semble donc jouer un rôle essentiel dans les neurones post-mitotiques et le dysfonctionnement de ces derniers semble être suffisant pour induire la pathologie.

3. Mutation de *Mecp2*

L'équipe du Dr Huda Zoghbi a tenté de générer des souris dont le défaut de MeCP2 permettrait à la fois d'observer un phénotype similaire à celui du syndrome de Rett et d'assurer la survie des mâles mutants. Pour cela, un codon stop prématuré a été introduit à la suite du codon 308 générant une protéine MeCP2 tronquée du tiers de son extrémité C-terminale (MeCP2³⁰⁸) mais conservant sa capacité de liaison à l'hétérochromatine (65). Cette mutation génère un phénotype plus léger que celui observé pour les autres modèles de souris, sans doute en raison d'une activité résiduelle de la protéine tronquée. Les mâles *Mecp2*^{308/y} ne présentent aucun symptômes jusqu'à 5 à 6 semaines, âge auquel ils développent des symptômes associés à des dysfonctions motrices progressives, de l'épilepsie, des modifications des comportements sociaux (66) et des défauts de mémorisation et apprentissage (67). Ces mâles meurent à environ un an. Les femelles hétérozygotes *Mecp2*^{308/+} développent des troubles moteurs à partir de 35 semaines mais présentent des phénotypes très légers. Les mâles hémizygotés *Mecp2*^{308/y} sont donc un modèle de choix pour l'étude de la physiopathologie du syndrome de Rett puisqu'ils possèdent une mutation similaire à celles rencontrées chez les patientes et permettent d'en analyser les symptômes en se gardant des variations potentiellement engendrées par le mécanisme d'inactivation du chromosome X.

4. Restauration de la fonctionnalité de *Mecp2* dans les souris déficientes

Le syndrome de Rett ne serait pas dû à un défaut du développement cérébral mais plutôt à l'absence prolongée de MeCP2 au sein des neurones matures. En effet, le délai d'apparition de la pathologie, environ six mois, est similaire chez l'humain et les souris hétérozygotes $MeCP2^{+/-}$ qui sont pourtant à des stades développementaux très différents, et le déficit de MeCP2 uniquement au sein des neurones post-mitotiques est suffisant pour induire la pathologie.

Pour évaluer cette hypothèse, Luikenhuis *et al.* ont mené des expériences visant à rétablir la fonctionnalité de *Mecp2* chez des souris déficientes. La restauration de l'expression de *Mecp2* placé sous contrôle du promoteur de *tau* (dont l'activation est spécifique aux neurones post-mitotiques) chez des souris mutantes $Mecp2^{1lox}$ est suffisante pour rétablir des fonctions neurologiques normales chez ces animaux (68). Ces résultats semblent donc indiquer que, d'une part, le défaut de MeCP2 dans les tissus périphériques n'a pas d'influence significative sur le déroulement de la maladie et que, d'autre part, MeCP2 ne joue pas de rôle majeur dans les stades très précoces du développement cérébral mais semble indispensable à la fonctionnalité et à la stabilité à long terme du système nerveux mature.

La restauration de *Mecp2* à différents stades du développement dans des souris mutantes $Mecp2^{1lox/y}$ a, par ailleurs, renforcé ces observations. En plaçant la séquence d'ADN complémentaire de *Mecp2* en aval d'une cassette *LoxP-Stop-LoxP*, sa cinétique d'expression peut être contrôlée. Cette cassette peut en effet être délétée de façon conditionnelle par croisement avec différentes souches de souris Cre, assurant ainsi la recombinaison et donc la réactivation de *Mecp2* à des stades embryonnaires (Nestin-Cre et Tau-Cre) ou à 2 et 4 semaines après la naissance (CamKII-Cre93 et CamKII-Cre159). Ainsi, la réactivation spécifique de *Mecp2* au sein des neurones, même à des stades tardifs post-natals, est capable d'affecter la progression de la maladie en retardant l'apparition des symptômes et la date de la mort (69). Ces résultats sous-tendent donc que des nouveau-nés atteints de RTT ne seraient pas encore affectés de dommages neuronaux irréversibles, ceux-ci ne surviendraient que plus tardivement.

Dans la continuité de ces travaux, un modèle d'extinction et ré-expression du gène *Mecp2* endogène a été développé. Guy *et al.* ont généré une souche de souris pour laquelle le gène *Mecp2* endogène est éteint par insertion d'une cassette *lox-Stop* (les mâles $Mecp2^{lox-Stop/y}$ présentant des symptômes similaires à ceux des souris $Mecp2^{-/y}$). Pour contrôler la réactivation de *Mecp2*, ces souris sont croisées avec une souche exprimant un transgène *Cre-ER* codant pour une protéine de fusion « Cre-récepteur aux oestrogènes modifié » localisée dans le cytoplasme. En réponse à un traitement au Tamoxifen (TM), cette protéine *Cre-ER* est transloquée au noyau où elle assure alors la réactivation conditionnelle de $Mecp2^{lox-Stop}$, le gène étant reconstitué sous contrôle de son promoteur et de ses éléments régulateurs endogènes. Un traitement au TM chez des souris symptomatiques mâles $Mecp2^{lox-Stop/y}, cre-ER$ ou femelles adultes $Mecp2^{lox-Stop/+}, cre-ER$ permet leur rétablissement et un retour à un phénotype proche ou identique de celui des souris sauvages (70). Les symptômes neurologiques associés au syndrome, précoces ou tardifs, sont donc réversibles par expression *de novo* de *Mecp2* que ce soit dans des cerveaux immatures ou matures et adultes. La restauration des fonctions neurologiques par une réexpression tardive de MeCP2 suggère donc que les conditions moléculaires nécessaires à sa fonctionnalité sont maintenues dans ces neurones.

L'ensemble de ces travaux confirme donc que l'absence de MeCP2 au cours du développement n'induit pas de dommages neuronaux irréversibles, que les neurones déficients en MeCP2 semblent exercer pleinement

leur fonction aux stades embryonnaires et chez le jeune animal et enfin, que la fonction majeure de MeCP2 serait d'assurer la stabilisation et le maintien d'un stade neuronal mature nécessaire au bon fonctionnement du système nerveux.

V. LE SYNDROME DE RETT AU REGARD DES MODÈLES MURINS

1. Implication de MeCP2 dans la différenciation et la maturation neuronale

La cinétique d'expression de MeCP2 au sein des structures centrales suit l'ontogénie du système nerveux. Son expression est par exemple précoce dans la moëlle épinière et le tronc cérébral puis plus tardive dans l'hippocampe et le cortex cérébral. Au sein de ces structures, l'apparition de MeCP2 corrèle aux phases de différenciation et de maturation des neurones, qui succèdent aux phases de migration, et reste indétectable dans les cellules gliales (62, 71, 72).

Les différentes phases du développement neuronal se caractérisent par l'expression d'un panel de neurotransmetteurs, neuropeptides et molécules de signalisation spécifiques. Le profil protéique d'un neurone mature est ainsi entièrement différent de celui exprimé durant les stades embryonnaires ou du développement précoce. Au regard de son profil d'expression, MeCP2 pourrait être impliquée dans la transition entre les programmes génétiques nécessaires à l'aboutissement des différentes étapes du développement neuronal.

Pour identifier les mécanismes cellulaires et les étapes développementales précises au cours desquels MeCP2 exerce ses fonctions, l'équipe du D^r Gabriele Ronnett a choisi le système olfactif comme modèle neuro-développemental. Au sein de l'épithélium olfactif sauvage, le profil d'expression spatiotemporel de MeCP2 est dynamique, corrèle à la maturation neuronale mais pas à la neurogenèse et passe par un pic au cours de la synaptogenèse (73). L'analyse *in vivo* du développement du système olfactif de souris déficientes pour *Mecp2* montre qu'au cours de la synaptogenèse, le défaut de MeCP2 induit un retard dans la maturation des neurones vers les stades de différenciation terminale. Ce délai de maturation provoque une désorganisation de l'épithélium olfactif, la rupture du ciblage axonal précis au sein du bulbe olfactif et une désorganisation subglomérulaire (74). Ce retard est concomitant à l'apparition de différences entre profils protéomiques des systèmes olfactifs des souris mutantes et sauvages qui affectent cinq grands groupes de fonctions biologiques (réarrangements du cytosquelette, remodelage de l'actine, métabolisme énergétique, signalisation cellulaire et neuroprotection) (75). Ces observations soulignent donc le rôle critique de MeCP2 dans le contrôle de la différenciation terminale des neurones, incluant maturation, ciblage axonal et plasticité synaptique.

L'hypothèse d'un rôle exercé par MeCP2 dans les étapes de maturation neuronale a été éprouvée dans un système de culture et différenciation *in vitro* de précurseurs neuronaux issus de souris sauvages, *Mecp2^{+/-}* et *Mecp2^{-y}*. Dans ce modèle, les mutations de MeCP2 n'affectent ni la prolifération, ni la prise de décision précoce d'entrée dans le lignage neuronal des précurseurs neuronaux (62). En revanche, l'observation chez des souris *Mecp2^{-y}* d'un néocortex plus fin, conséquence d'une réduction du soma et de l'arborisation dendritique des neurones, suggère que les mutations de MeCP2 conduisent à une maturation neuronale anormale ou à une maintenance insuffisante de la complexité morphologique associée à leur maturité.

À la lumière de l'ensemble de ces travaux, MeCP2 semble donc être impliquée dans la maturation et la stabilisation des neurones différenciés du SNC et non dans les stades précoces de leur développement incluant prolifération, spécification du lignage et migration. Le profil d'expression de MeCP2 coïncide également avec les périodes de développement de l'arborisation dendritique, du ciblage des projections axonales, de la mise en place des réseaux ou encore de la connectivité inter-neuronale. Le rôle de MeCP2 dans ces étapes clés reste néanmoins à évaluer.

2. Implication de MeCP2 dans la plasticité, la mémorisation et le comportement

Différentes études d'électrophysiologie menées sur les modèles murins du syndrome de Rett ont pu mettre à jour des anomalies de la transmission et de la plasticité synaptique chez ces animaux. Ces altérations donnent de bonnes indications sur les fonctions probables de MeCP2 et expliquent certaines des manifestations pathologiques associées à son déficit.

Les souris déficientes pour *Mecp2* affichent une réduction de l'activité électrique corticale, réduction qui précède les symptômes puis s'aggrave dès leur apparition. Cette diminution d'activité, conséquence à la fois d'une diminution des potentiels spontanés excitateurs et d'une augmentation des potentiels inhibiteurs, correspond à une réduction d'excitabilité du réseau plutôt qu'à un défaut intrinsèque des neurones (76). Ce déséquilibre de la balance entre excitation et inhibition au sein des aires corticales impliquées dans les programmes moteurs, le comportement ou le langage pourrait expliquer certains des aspects du phénotype associé au syndrome de Rett. La réduction des mécanismes de potentialisation et de dépression à long terme dans la région CA1 de l'hippocampe a également été mesurée, sans toutefois que les propriétés de la neurotransmission basale ne soient altérées (77). Ces altérations de la plasticité synaptique à long terme pourraient contribuer aux déficits cognitifs de ces souris.

De même, des études ultra-structurales et d'électrophysiologie ont clairement montré que les souris *Mecp2*^{308/y} présentent des déficits d'apprentissage et de mémoire liés à des altérations de structure, de transmission et de plasticité synaptique, notamment au sein de l'hippocampe et du néocortex (67). Ces dysfonctions synaptiques sont un évènement précoce de la pathogenèse du syndrome de Rett et précèdent l'apparition des symptômes neurologiques.

Enfin, les propriétés élémentaires de la transmission synaptique des neurones déficients en *Mecp2* ont été évaluées. Des cultures primaires dissociées de neurones hippocampiques, issus de nouveau-nés déficients pour *Mecp2* ou sauvages, permettent d'examiner les fonctions synaptiques indépendamment des altérations générales du réseau ou de l'homéostasie cérébrale. La fréquence des potentiels spontanés post-synaptiques excitateurs miniatures (mEPSCs) des neurones mutants est diminuée de façon significative mais ne résulte ni d'un changement du nombre de récepteurs post-synaptiques, ni d'une diminution du nombre de terminaisons pré-synaptiques. Au cours de réponses évoquées, ces neurones libèrent une plus grande quantité de neurotransmetteur entraînant une déplétion plus rapide du *pool* de vésicules synaptiques et un délai allongé du recyclage vésiculaire après stimulation, retardant ainsi la restauration de la réponse (78). Ces altérations de la transmission spontanée excitatrice et la dépression synaptique à court terme plaident en faveur d'une spécificité de fonction de MeCP2 dans le contrôle pré-synaptique de la transmission excitatrice.

La neurotransmission spontanée est importante pour des processus neuronaux tels maturation et stabilisation des réseaux synaptiques ou inhibition locale de la production de protéines dendritiques (79 , 80 , 81). La diminution des mEPSCs chez les neurones mutants pourrait ainsi être à l'origine des anomalies neuromorphologiques observées chez les souris déficientes en *Mecp2* ou chez les patients atteints de RTT. De même, la dépression synaptique à court terme étant fondamentale dans les mécanismes synaptiques nécessaires à la localisation des sons (82) ou à l'adaptation rapide du cortex sensoriel (83), sa détérioration pourrait contribuer aux altérations comportementales ou d'interaction sociale associées au syndrome (63, 66, 84).

METHYL CpG BINDING PROTEIN 2

I. CARACTÉRISTIQUES BIOCHIMIQUES ET STRUCTURALES

1. Identification de MeCP2 et de ses isoformes

MeCP2, methyl-CpG binding protein 2, a initialement été identifiée, purifiée et séquencée par l'équipe du D^r Adrian Bird sur la base de sa capacité de liaison à des dinucléotides CpG méthylés (85, 86). Analysée comme une protéine monomérique de 84 kDa chez le rat et de 80 kDa chez la souris, sa dégradation selon la méthode d'Edman a permis de générer des sondes utilisées pour identifier la séquence complète de son ADN complémentaire. Son gène a ensuite pu être localisé sur le *locus* Xq28 (87, 88) et reconnu comme soumis au mécanisme d'inactivation du chromosome X (89).

Des sites de polyadénylation alternatifs donnent lieu à des variants d'ARN messager qui diffèrent par leurs extrémités 3'UTR (88, 90, 91). Les deux transcrits majoritaires de 1,9 et 10 kb possèdent des demi-vies similaires mais des profils d'expression distincts au sein des tissus. Le transcrit de 10 kb prédomine durant la vie intra-utérine, alors que le transcrit de 1,9 kb est dominant dans le cerveau adulte. Des analyses d'hybridation *in situ* chez la souris ont montré que l'expression de l'ARN de *Mecp2* est ubiquitaire dans l'embryon et détectée dans la quasi-totalité des neurones du cerveau post-natal, les niveaux les plus élevés étant mesurés dans le bulbe olfactif et l'hippocampe.

MECP2 a longtemps été considéré comme un gène à trois exons, chacun prenant part à la formation de la protéine. Cependant, en 2000, le séquençage et l'analyse bioinformatique détaillée des *locus* humains et murins a révélé l'existence d'un exon additionnel en 5' (91). Plus récemment encore, deux études parallèles ont montré l'existence d'un site d'épissage alternatif au niveau de l'exon 1 générant deux isoformes, appelées MeCP2A et MeCP2B chez l'homme (respectivement MeCP2 β et MeCP2 α chez la souris) (92, 93). La forme MeCP2A, initialement décrite, utilise comme codon initiateur l'ATG de l'exon 2 ; la forme MeCP2B utilise un ATG localisé dans l'exon 1, en exprime les 24 acides aminés mais exclut les 9 acides aminés initiaux codés par l'exon 2. Une des différences majeures entre ces deux isoformes est la présence de séquences répétées poly-alanine et poly-glycine à l'extrémité N-terminale de la forme « longue » MeCP2B. Ces deux protéines sont distribuées de façon ubiquitaire dans l'organisme mais la forme B est exprimée de façon préférentielle dans le cerveau. Quelle que soit l'isoforme, MeCP2, riche en résidus basiques, contient de courts motifs (R)GRP(K) et SPKK impliqués dans la liaison de protéines au sillon mineur de séquences ADN riches en motifs AT.

2. Domaines fonctionnels

MeCP2 est le membre fondateur de la famille des *methyl-CpG binding proteins* (94) qui ont la spécificité de se lier à des dinucléotides CpG méthylés grâce à un domaine de liaison conservé : le *methyl-CpG binding domain* (MBD). Le domaine MBD de MeCP2 est un domaine de 85 acides aminés (peptide 78-162) nécessaire et suffisant pour permettre sa liaison à l'ADN *in vitro* et la reconnaissance d'une seule paire de nucléotides CpG symétriquement méthylés sur les deux brins de l'hélice ADN (95). La présence d'une séquence riche en A/T à proximité des dinucléotides CpG méthylés (à une distance de 3 à 8 bases) augmente l'affinité de MeCP2 pour ses cibles (96).

La structure en solution du domaine MBD a été résolue par spectrométrie RMN et a révélé une structure en « coin » constituée d'un feuillet- β antiparallèle à quatre brins (A, B, C et D) sur la face N-terminale et d'une hélice- α suivie d'un coude sur la face C-terminale. Ensemble, la boucle flexible entre brins B et C, et les faces exposées des brins B, C et D constituent la surface de liaison à l'ADN méthylé (97).

L'association de MeCP2 à l'ADN est spécifiée par son domaine MBD. Dans les cellules de souris, MeCP2, localisée sur l'intégrité des bras chromosomiques, est particulièrement concentrée au niveau de l'hétérochromatine péricentromérique qui contient de façon prédominante les satellites chromosomiques majeurs hautement méthylés. Dans les cellules humaines ou de rat, qui ne possèdent pas de tels satellites, la localisation de MeCP2 est plus diffuse sur l'ensemble du génome (98).

MeCP2 contient également un domaine de répression de la transcription (TRD), localisé des résidus 207 à 310. Ce domaine est très basique (26 % de lysine et d'arginine) et riche en acides aminés neutres (12,5 % d'alanine, 10,5 % de valine et 8 % de proline) (99). Le domaine TRD est le domaine minimal nécessaire à la répression de la transcription par MeCP2 *in vitro* et *in vivo* ; il s'associe à des facteurs de corépression ou à la machinerie transcriptionnelle basale et permet une action à distance (100-102). Le signal de localisation nucléaire de MeCP2 est localisé au sein du TRD, des résidus 255 à 271 (98).

Enfin, MeCP2 contient un domaine (WDR) capable de se lier spécifiquement aux domaines WW de groupe II des facteurs d'épissage FBP11 (forming binding protein 11) et HYPC. La région WDR de MeCP2 (résidus 325 à 486 à l'extrémité C-terminale) contient en son centre une séquence riche en proline (376-405) et deux régions conservées CR1 et CR2 en C-terminal (103) (Illustration 4).

II. PROFIL ET RÉGULATION DE L'EXPRESSION DE MECP2 DANS LE SYSTÈME NERVEUX CENTRAL

Dans le système nerveux central, MeCP2 est fortement exprimée dans les populations neuronales mais absente des cellules gliales (microglie, oligodendrocytes et astrocytes) (71, 72, 104). Les niveaux d'expression de MeCP2 varient entre populations neuronales de régions ou structures différentes et peuvent également différer entre neurones d'une même structure. Les cellules arborant un faible niveau d'expression, MeCP2^{lo}, sont les plus abondantes dans le cerveau et les tissus périphériques alors que les cellules de haut niveau d'expression,

MeCP2^{hi}, sont caractéristiques de la couche IV du néocortex, du cervelet et des neurones pyramidaux de l'hippocampe (56).

Le profil d'expression de MeCP2 suit l'ontogénie du système nerveux central et le profil de maturation des neurones post-migratoires. Les noyaux du tronc cérébral font partie des cellules exprimant le plus précocement MeCP2 alors que son expression apparaît relativement tardivement dans le thalamus et les noyaux de la base ; son expression augmente progressivement des stades embryonnaires jusqu'à la fin de l'enfance dans le tronc cérébral, le cervelet et le cortex. Au cours de la formation du cortex, MeCP2 est initialement exprimée dans les cellules de la pré-plaque, de la sous-plaque et de Cajal-Retzius puis son expression apparaît progressivement des couches profondes vers les couches superficielles du cortex de façon parallèle au profil chronologique de migration et de maturation des neurones (71, 105, 106) (Illustration 5).

À ce jour, il n'existe que peu d'informations sur les mécanismes régulateurs de l'expression de MeCP2 qui contrôlent sa spécificité tissulaire, sa dynamique d'expression au cours du développement ou la quantité de protéine produite.

Le gène *Mecp2* contient plusieurs sites d'initiation de la transcription, contenus dans une région riche en résidus GC et en îlots CpG, mais aucune des boîtes canoniques TATA ou CAAT (107).

Des expériences de gène rapporteur ont permis d'identifier la région minimale du promoteur de *Mecp2* (-677/+56) suffisante pour réguler l'expression dynamique de MeCP2 spécifiquement aux neurones centraux et selon un profil spatiotemporel proche de celui du gène natif. La majorité de l'activité promotrice de cette séquence est régulée par un élément de 19 paires de bases (-64/-46), l'élément MR (MeCP2 regulatory element), qui joue le rôle de régulateur positif de l'expression de *Mecp2*, à la fois dans les tissus neuronaux et non neuronaux.

Chez l'homme, une séquence de 1 kb en amont du site d'initiation de la transcription de *MECP2* présente une activité promotrice. Elle est composée d'un « cœur » (-179/-309) qui assure le niveau d'expression basal du gène, de deux éléments régulateurs positifs (-681/-847 et -847/-1071) et de deux éléments régulateurs négatifs (-309/-370 et -553/-681) (108).

La faible similarité de séquence (50 à 80 %) entre régions promotrices des gènes humains et murins *MECP2/Mecp2* semble indiquer qu'il pourrait exister une divergence de recrutement de facteurs de transcription entre ces deux espèces.

Le locus de *MECP2* contient trois régions qui pourraient renfermer des éléments régulateurs en *Cis* : un large intron 2 de 60 kb, une région 3'UTR de 8,5 kb avec séquences hautement conservées et sites de polyadénylation et enfin, une région intergénique de 40 kb en amont de *MECP2*. En réalisant des comparaisons de séquences inter-espèces et des essais de gènes rapporteurs, Liu *et al.* ont identifié quatre « *enhancers* » et deux « *silencers* » parmi 27 séquences conservées non codantes incluses dans la région de 210 kb entourant le locus de *MECP2*. Ces éléments sont capables d'agir à distance sur le promoteur de *MECP2*. L'un des *enhancers* et l'un des *silencers* sont localisés dans la région 3'UTR à environ 75 kb de *MECP2*, les deux autres *enhancers* sont à plus de 100 kb en aval de *MECP2* (108). Cependant il reste encore à déterminer quels éléments cis-régulateurs et quels facteurs de transcription sont impliqués dans la régulation temporelle et tissulaire de l'expression de *MECP2*.

III. FONCTIONS BIOLOGIQUES

1. Répression de la transcription

Dans les cellules eucaryotes, deux voies majeures contrôlent la répression de la transcription : les modifications de la chromatine et la modulation des activateurs transcriptionnels.

Par exemple, l'induction d'une liaison des histones H1 avec le *linker* des nucléosomes compacte la chromatine et rend l'ADN inaccessible aux activateurs transcriptionnels. Les histones centrales des nucléosomes subissent également des modifications réversibles comme méthylation ou acétylation. L'acétylation des histones contribue à l'activation des gènes alors qu'à l'inverse, leur dé-acétylation constitue un mécanisme actif de répression génique. Pour moduler spécifiquement l'expression de gènes cibles, les enzymes de modification des histones doivent donc être recrutées sur leur lieu d'action soit par des activateurs, soit par des répresseurs transcriptionnels. MeCP2 participe à de tels mécanismes et joue ainsi un rôle de répresseur transcriptionnel.

1.1. Dé-acétylation des Histones

Suite à son association à l'ADN méthylé *via* son domaine MBD, MeCP2 recrute des facteurs de corépression transcriptionnel tels mSin3A, la proto-oncoprotéine virale Ski ou encore N-CoR. Tous participent à la formation de larges complexes protéiques intégrant des histones dé-acétylases, notamment HDAC1 et HDAC2 (100, 101, 109) (Illustration 6).

Des protéines contenant un domaine MBD peuvent donc, par ce biais, former un lien moléculaire entre la méthylation de l'ADN sur les régions promotrices et l'extinction de l'expression génique par dé-acétylation.

Cependant, bien qu'une diminution de l'acétylation des histones H3 ait été observée chez des sujets atteints du syndrome de Rett (110), une augmentation de l'acétylation des histones H4 est à l'inverse clairement observée dans les lymphoblastes de patients RTT (111). De même, les souris porteuses d'un gène *Mecp2* invalidé montrent une augmentation de l'acétylation des histones H3 dans leur cerveau, mais aucun changement de l'acétylation des histones H4 (65). Enfin, le traitement par des inhibiteurs d'HDAC n'abroge que partiellement les fonctions répressives de MeCP2 et ne restaure pas les niveaux transcriptionnels initiaux des gènes rapporteurs (101, 112).

Des mécanismes additionnels, indépendants de la dé-acétylation des histones, semblent donc permettre à MeCP2 d'exercer ses fonctions de répresseur transcriptionnel.

1.2. Méthylation des Histones

La méthylation est un évènement clé des modifications post-traductionnelles des histones. Elle représente un mécanisme de régulation épigénétique important pour l'organisation de la structure chromatinienne et la répression de l'expression des gènes (113). La méthylation des histones sur la lysine 9 (H3K9) est particulièrement associée à l'extinction de gènes.

MeCP2 est impliquée dans la répression génique *via* la méthylation des histones ; pour le gène H19, la méthylation connexe à l'action de MeCP2 est spécifique à H3K9 (114).

Par ailleurs, MeCP2 semble exercer des fonctions dans le complexe repressor-element-1-silencing transcription factor (REST)-Rest-corepressor-1 (RCOR1). Ce complexe se lie aux éléments de répression dans les promoteurs de gènes cibles, tels le gène du canal sodique de type II (SCN2A), recrute MeCP2 et inactive la transcription *via* la méthylation des histones en H3K9 par SUV39H1 (histone lysine methyltransferase suppressor of variegation 3-9 hologue 1) (114, 115). Cependant, la fonction exacte de MeCP2 au sein de ce complexe reste inconnue.

L'ensemble de ces données indique que MeCP2 participe à l'établissement de différentes marques épigénétiques probablement impliquées dans la régulation de l'expression génique.

1.3. Modulation Directe de la Machinerie Transcriptionnelle :

MeCP2 peut également maintenir à l'état inactif un gène cible en interférant dans l'assemblage du complexe de pré-initiation de la transcription. En effet, MeCP2 interagit spécifiquement *via* son domaine TRD avec TFIIB, élément clé de la machinerie transcriptionnelle basale. Dans ce cas, l'activité répressive de MeCP2 ne nécessite ni le recrutement de co-facteurs, ni la formation d'un complexe multiprotéique (102).

2. Modification structurale des histones et de l'architecture chromatinienne

De récents travaux supportent l'hypothèse d'une répression de la transcription des gènes par MeCP2 *via* des mécanismes indépendants de la méthylation de l'ADN et des modifications enzymatiques des histones. MeCP2 se lie à de l'ADN non méthylé (avec une haute affinité sur des séquences spécifiques, avec une basse affinité sans spécificité de séquence) et en réprime l'expression *in vitro* (86, 102, 116). Le domaine MBD seul réprime la transcription de gènes *in vivo* dans un modèle hétérologue dépourvu d'ADN méthylé (117). Enfin, l'extrémité C-terminale de MeCP2 exprimée en fusion au domaine de liaison à l'ADN Gal4 est capable de réprimer l'expression du promoteur SV40 *in vivo* et ce, même en présence de trichostatin-A, inhibiteur des HDACs (112). Ces données valident donc l'hypothèse d'un mécanisme de répression par MeCP2 ne nécessitant ni la méthylation des gènes cibles, ni le recrutement des histones dé-acétylases par le TRD (Illustration 6).

Un tel mécanisme de répression pourrait résider dans les capacités de MeCP2 de modifier le niveau de compaction, la conformation et la structure tridimensionnelle de la chromatine (Illustration 7).

Des expériences *in vitro* ont montré que MeCP2 se lie à des chaînes nucléosomales de 12-meres et déclenche différents changements structuraux selon le ratio molaire entre MeCP2 et nucléosomes. Ainsi, MeCP2 peut provoquer la compaction locale de quelques nucléosomes au sein de la chaîne, une compaction plus extensive de la chaîne nucléosomale en une structure ellipsoïdale (structure secondaire), ou encore l'assemblage de ces particules en une supra-structure oligomérique (structure tertiaire) (118).

La liaison de MeCP2 à l'ADN et à la chromatine implique différents domaines de la protéine et plusieurs types d'interactions moléculaires. MeCP2 se lie à l'ADN nu des régions *linker* des nucléosomes puis les appose dans une conformation en « hampe » *via* une deuxième interaction ADN-MeCP2. La formation de tels motifs nécessite des domaines de liaison à l'ADN distincts du MBD localisés dans les 294 premiers résidus de MeCP2. Ces deux étapes de liaison et de compaction de l'ADN par MeCP2 ne nécessitent pas la portion C-terminale de la protéine, extrémité qui est en revanche requise pour la liaison de MeCP2 aux nucléosomes et leur agrégation, aboutissant

à la compaction maximale de la chromatine (119, 120). En formant des complexes ADN-MeCP2-ADN ou nucléosomes-MeCP2-nucléosomes, indépendamment du statut de méthylation, MeCP2 est donc capable de modifier la conformation et le niveau de compaction de la chromatine.

La formation de telles structures tridimensionnelles ou condensées de la chromatine constituant une barrière physique potentielle aux éléments de la machinerie transcriptionnelle, les capacités de compaction et de remodelage structural de MeCP2 pourraient être responsables de ses propriétés de répression génique indépendantes des mécanismes de méthylation et dé-acétylation des histones.

Par ailleurs, l'analyse *in vivo* de la structure chromatinienne de la région de 70 kb contenant *Dlx5* et *Dlx6* a permis de mettre en évidence l'importance de MeCP2 dans la formation de boucles chromatinienne silencieuses. Lorsque les histones de cette région sont acétylées (état actif), ce *locus* s'organise en deux boucles chromatinienne de 58 et 9,3 kb autorisant son expression. Lorsque MeCP2 s'associe à ses sites de liaison dans ce *locus*, elle favorise dé-acétylation et méthylation des histones H3 et provoque l'organisation d'une structure en boucle de 11 kb entre régions distantes de chromatine inactive. L'organisation tri-dimensionnelle de ce *locus* par MeCP2 génère donc une boucle particulière corrélée à l'inactivation transcriptionnelle de ces gènes (121) (Illustration 8).

L'organisation structurale de la chromatine étant primordiale pour le contrôle de l'expression des gènes, notamment par le rapprochement entre régions contrôles et séquences distantes, la formation de boucles chromatinienne par MeCP2 pourrait constituer un des mécanismes de son action de répresseur transcriptionnel.

3. Épissage alternatif

Des expériences de co-immunoprécipitation ont pu mettre à jour l'interaction de MeCP2 avec YB-1, interaction nécessitant la présence d'ARN. Y-box-binding protein 1 (YB-1), qui appartient à la famille multifonctionnelle des protéines de liaison aux ADN/ARN, prend part à la régulation de l'épissage alternatif des ARN messagers. Il agit aussi comme facteur de transcription en se liant aux boîtes Y des promoteurs de gènes cibles et participe à la réparation et à la réplication de l'ADN. La signification fonctionnelle de cette association a été testée dans un modèle de minigènes rapporteurs, cibles de YB-1, possédant plusieurs sites d'épissage. Le complexe MeCP2/YB-1 est capable de prendre en charge l'ARN précurseur transcrit du gène rapporteur et d'en orienter l'épissage alternatif *in vitro* mais également *in vivo*. La description de profils d'épissage alternatif aberrants dans le cortex cérébral de souris *Mecp2*^{308/y}, notamment pour *Dlx5* ou pour la sous-unité 1 du récepteur au NMDA (NR1), semble valider la relevance *in vivo* d'une telle interaction (122).

La régulation par MeCP2 des mécanismes de transcription et d'épissage pourrait être coordonnée pour assurer à la fois le contrôle quantitatif et qualitatif de l'expression des gènes cibles. Ainsi, la réactivation d'un promoteur cible libérerait MeCP2 et la rendrait disponible pour le contrôle de l'épissage du transcrit néo-synthétisé. Les pathologies neuronales induites par des défauts de MeCP2 pourraient donc résulter à la fois d'un défaut de régulation de la transcription et de l'épissage alternatif des gènes cibles.

4. Maintien du profil de méthylation des gènes au cours de la réplication

La méthylation de l'ADN sur les résidus cytosines participe à des mécanismes primordiaux tels l'empreinte génétique, l'inactivation du chromosome X ou la répression génique. Le maintien du profil de méthylation des gènes après réplication est assuré, entre autre, par une ADN méthyltransférase de maintenance, Dnmt1, qui a la capacité de méthyler le brin ADN néo-synthétisé. L'extrémité C-terminale de Dnmt1 transfère les groupes méthyl sur les cytosines alors que sa région N-terminale interagit avec des protéines impliquées dans le cycle cellulaire, la réplication ou l'architecture de la chromatine comme les HDACs. Le mécanisme de recrutement de Dnmt1 sur le brin hémi-méthylé reste cependant à élucider car cette protéine ne possède pas de domaine de liaison à l'ADN.

Kimura *et al.* ont montré que MeCP2 est capable de s'associer à des CpG hémi-méthylés et de recruter Dnmt1 *via* son domaine TRD. Le complexe MeCP2/Dnmt1 conserve la pleine activité enzymatique de méthyltransférase de Dnmt1 et participe ainsi au maintien du profil de méthylation des gènes durant la réplication. L'interaction directe entre MeCP2 et Dnmt1 prévient l'association d'HDAC avec l'un ou l'autre de ses partenaires, leur activité de méthyltransférase s'effectue donc indépendamment d'un remodelage des histones par les dé-acétylases (123). Une interaction dynamique entre MeCP2, Dnmt1 et HDACs au cours de la réplication cellulaire pourrait expliquer les mécanismes moléculaires à l'origine du maintien de l'empreinte génétique et de la répression transcriptionnelle des gènes ainsi méthylés (Illustration 9).

IV. GÈNES CIBLES

1. Identification de gènes cibles par approche globale

Au regard de l'ensemble de ses propriétés biologiques, la fonction majeure de MeCP2 semble être de participer activement à la régulation de l'expression génique ; que ce soit quantitativement, *via* l'assemblage de complexes multiprotéiques répresseurs et la formation de structures chromatiniennes « inactives », ou qualitativement, *via* l'orientation du profil d'épissage de gènes cibles. Un défaut d'expression de MeCP2 devrait donc naturellement se traduire *in vivo* par une augmentation du niveau d'expression ou une expression inappropriée de ses gènes cibles (124).

Afin d'évaluer cette hypothèse, plusieurs équipes ont mené des études de transcriptome et de protéome pour mesurer les variations globales d'expression génique au sein des cellules déficientes pour *MECP2/Mecp2*. Des études menées sur des lignées lymphoblastiques issues de patientes souffrant du syndrome de Rett ont effectivement montré des altérations subtiles du niveau d'expression de divers gènes dans ces cellules (125, 126). Pour certains d'entre eux, la liaison de MeCP2 sur leurs promoteurs dans des lignées cellulaires normales suggère que MeCP2 pourrait contribuer de façon directe à leur répression. Cependant, les lignées cellulaires en culture présentant de plus hauts niveaux de méthylation des dinucléotides CpG que ceux observés dans des cultures primaires, la relevance de ces gènes comme cibles de MeCP2 reste encore à déterminer (127).

Des changements globaux des niveaux d'expression génique de tissus nerveux issus de patientes ou de souris déficientes pour *Mecp2* ont également été mesurés par d'autres équipes. Mais ces différentes études ayant été menées sur des panels de gènes distincts et par des technologies différentes, leurs résultats ne peuvent être recoupsés (75, 128, 129). De plus, aucun gène candidat probant n'a pu être identifié par ce type d'approche ; certaines des variations observées affectant notamment des gènes dont les fonctions biologiques ne semblent pas immédiatement pertinentes dans la physiopathologie du syndrome de Rett. Ces approches globales d'analyse du profil transcriptionnel ou protéique ne sont donc pas des méthodes efficaces pour discerner les gènes cibles de MeCP2.

2. Gènes soumis à l'empreinte génétique parentale

Le mécanisme d'empreinte génétique parentale ou *imprinting* correspond à l'application de marqueurs épigénétiques sur certains *loci* au cours des stades terminaux de la gamétogenèse et permet de réprimer spécifiquement l'expression de gènes selon leur origine parentale (130). Les gènes soumis à un tel mécanisme sont généralement regroupés dans des régions chromosomiques et, entre autres caractéristiques, sont méthylés sur un seul de leurs allèles (131-133). Ce mécanisme étant particulièrement relevant dans le développement post-natal du système nerveux central, diverses équipes se sont appliquées à déterminer si MeCP2 pouvait être impliquée dans le maintien de la répression des gènes soumis à l'empreinte génétique parentale.

Chez des patientes affectées de RTT, l'expression monoallélique de plusieurs gènes soumis à l'*imprinting* est maintenue dans les cellules exprimant la protéine mutée, bien qu'une interaction physique de MeCP2 aux allèles silencieux de certains de ces gènes ait été observée (54, 134, 135). C'est notamment le cas du gène *H19* ; bien qu'il soit une cible directe de MeCP2 et que son niveau d'expression soit doublé dans les cellules déficientes pour *Mecp2*, la répression de l'allèle paternel, soumis à l'empreinte génétique, n'est pas levée en absence de MeCP2 (136).

Une approche de clonage et séquençage de fragments d'ADN après chromatine-immunoprécipitation a permis d'identifier le *locus* des gènes *Dlx5* et *Dlx6*, soumis à l'empreinte génétique parentale, comme cible de MeCP2 dans le cerveau murin (121, 137, 138). Au sein de ce *locus*, MeCP2 se lie à des séquences introniques méthylées et participe à la formation d'une boucle chromatinienne entre les deux gènes, responsable de leur répression.

Si la perte d'expression monoallélique de *DLX5* est observée dans 3 sur 4 des lignées lymphoblastiques issues de patientes RTT (121), elle est retrouvée dans 13 lignées contrôles sur 15 (139), ce qui suggère que les mutations de *MECP2* ne sont pas seules responsables de l'expression biallélique de *DLX5*. De plus, *Dlx5* n'est pas soumis à l'empreinte parentale dans le cerveau murin ; l'augmentation d'expression de *Dlx5* décrite dans le cerveau de souris déficientes pour *Mecp2* serait donc une conséquence de la perte de la boucle chromatinienne répressive plutôt que d'une perte du maintien de l'expression monoallélique.

Ces travaux mettent donc en lumière un autre mécanisme par lequel MeCP2 participerait à la régulation de l'expression des *loci* sujets à l'empreinte génétique parentale : une régulation à distance par formation de boucles chromatiniennes. Ce mécanisme est d'autant plus intéressant qu'il explique l'altération de l'expression de gènes non soumis à l'empreinte génétique mais localisés dans des *loci* qui, eux, le sont. C'est par exemple le cas de *GABRB3/Gabrb3*, situé dans le *locus* de *UBE3A/Ube3a*, soumis à l'empreinte génétique parentale, et qui est

significativement sous exprimé dans le cerveau de patients RTT et de souris déficientes pour *Mecp2* (140). *GABRB3* codant pour la sous-unité β du récepteur au GABA (141), son défaut d'expression pourrait expliquer le déficit de la transmission GABAergique inhibitrice observé dans le cerveau des souris déficientes pour *Mecp2* et les épisodes d'épilepsie chez les patients atteints du syndrome de Rett (76).

En plus des mécanismes *cis*-régulateurs, les gènes localisés dans les régions génomiques soumises à l'empreinte génétique parentale subissent des régulations en *trans* via une interaction entre allèles paternels et maternels (142, 143). Ainsi, l'appariement des allèles homologues du *locus GABRB3* est observé au cours du développement dans les neurones corticaux humains et dans des lignées en culture mais est absent chez les patients atteints de RTT. De plus, cet appariement peut être inhibé en culture en bloquant la liaison de MeCP2 (144). Ces résultats, qui demandent à être confirmés, suggèrent que MeCP2 participerait à l'établissement des interactions entre allèles homologues au sein de *loci* soumis à l'empreinte génétique.

3. Gène du Brain-derived neurotrophic factor

Deux équipes ont simultanément identifié le gène *Brain-derived neurotrophic factor* (*Bdnf*) comme une cible potentielle de MeCP2 (145, 146). Le *Bdnf* est un facteur neurotrophique primordial pour la survie, la croissance et le maintien des neurones au cours du développement du système nerveux central. Impliqué dans l'apprentissage et la mémorisation, il a la capacité de moduler la plasticité synaptique en remodelant les connexions axonales et dendritiques (147-149). Le *Bdnf* est codé par un *locus* complexe contenant quatre promoteurs (150), dont l'un d'eux, situé en amont de l'exon III chez le rat, de l'exon IV chez la souris, est activé lors de la dépolarisation membranaire des neurones en culture (151, 152). L'expression de *Bdnf*, contrôlée par ce promoteur et l'influx calcique lors de l'activation, est corrélée à la déméthylation d'éléments de réponse au calcium localisés en *cis*.

MeCP2, en complexe avec ses partenaires mSin3A et HDAC1, s'associe spécifiquement au promoteur de l'exon III/IV de *Bdnf* lorsque les neurones sont au repos. Après dépolarisation membranaire, MeCP2 est phosphorylée et se désassocie partiellement de ce promoteur, permettant ainsi le remodelage local de la chromatine et la transcription du gène (145, 146).

L'influx calcique subséquent à la dépolarisation membranaire et certaines neurotrophines provoquent, via la voie CaMKII, la phosphorylation de MeCP2 sur la sérine 421 *in vitro* et *in vivo*. Par cette phosphorylation spécifique au cerveau, l'activité neuronale régule de façon dynamique l'implication et l'action de MeCP2 dans la formation du réseau dendritique, la maturation des épines dendritiques et la régulation des gènes dont l'expression dépend de l'activité. La rupture de ce processus chez les individus affectés de mutations de MeCP2 pourrait être à l'origine de la spécificité neurologique de la maladie (153).

Du déficit de *Mecp2* dans les neurones résulte une augmentation d'un facteur 2 du niveau de transcrits de *Bdnf*, ce qui ne correspond toutefois pas à une « activation » du gène puisque dans des neurones activés ce niveau augmente de plus de 100 fois par rapport aux neurones au repos. Cette faible augmentation pourrait cependant suffire pour provoquer de subtils changements de la plasticité synaptique et contribuer ainsi au phénotype du syndrome de Rett. Par contre, aucune différence du niveau d'expression de *Bdnf* n'est observée après dépolarisation de cultures neuronales issues de souris déficientes pour *Mecp2* ou sauvages (145, 146).

Dans le cerveau de souris déficientes pour *Mecp2*, le niveau basal de BDNF est réduit et non augmenté, contrairement à ce qui est attendu (154). Cette observation surprenante laisse spéculer que, puisque l'expression de *Bdnf* est étroitement corrélée à l'activité neuronale, la diminution globale d'activité électrique des cerveaux déficients pour *Mecp2* pourrait induire cette diminution marquée de l'expression de *Bdnf* et masquer ainsi la légère surexpression basale qu'induit le défaut de MeCP2 dans les neurones au repos. Ce déficit d'activité neuronale pourrait également expliquer la plus grande proportion de BDNF dans le *pool* de vésicules synaptiques rapidement libérables (155).

Enfin, la démonstration d'un lien fonctionnel entre MeCP2 et BDNF *in vivo* provient du développement et de l'exploitation de modèles animaux (154). La délétion conditionnelle de *Bdnf* au sein de l'encéphale de souris *Mecp2^{ly}* exacerbe le phénotype pathologique de ces animaux et à l'inverse, la surexpression de *Bdnf* dans l'encéphale des souris *Mecp2^{ly}* annihile certains des symptômes normalement observés, comme la réduction de durée de vie, la diminution d'activité motrice ou encore la faible activité électrique des couches corticales. Ces résultats suggèrent donc une interaction fonctionnelle entre MeCP2 et BDNF dans le système nerveux central et la modulation par *Bdnf* de la progression de la maladie.

4. Les gènes de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien

L'anxiété étant une composante importante du versant comportemental du syndrome de Rett, le groupe du Dr Huda Zoghbi s'est intéressé aux conséquences moléculaires du défaut de MeCP2 sur l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien chez les souris *Mecp2³⁰⁸*.

Des études comportementales chez ces souris ont souligné une plus grande propension à l'anxiété et une réponse physiologique au stress plus marquée, notamment au stress de contention, qui se traduit par une libération plus élevée de corticostérone dans le sang. Cette augmentation du taux de glucocorticoïdes et cette réponse comportementale altérée sont une conséquence probable d'une surexpression du gène *Crh* (*corticotropin-releasing hormone*) dans les noyaux paraventriculaires de l'hypothalamus et dans l'amygdale centrale. Chez des animaux sauvages, le gène *Crh* est une cible directe de MeCP2 puisqu'elle se lie *in vivo* aux dinucléotides CpG méthylés de son promoteur (156). L'altération du contrôle du *Crh* chez les souris *Mecp2³⁰⁸* et la suractivation subséquente de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien pourraient donc contribuer au phénotype comportemental du syndrome de Rett mais également à la réduction du réseau dendritique, à la diminution de la plasticité synaptique ou aux défauts de mémorisation observés dans le RTT analogues à ceux rencontrés lors d'expositions chroniques aux glucocorticoïdes.

Mais le niveau d'expression de *Crh* n'est pas la seule composante de cet axe et de la signalisation par les corticoïdes à être altérée lors de déficits en MeCP2. Les gènes *Sgk* (*serum glucocorticoid-inducible kinase 1*) et *Fkbp5* (*FK506-binding protein 51*), gènes sensibles aux glucocorticoïdes et impliqués dans la réponse au stress, voient en effet leurs niveaux d'expression augmenter d'un facteur deux à trois dans le cerveau de souris *Mecp2^{ly}* (157). L'expression de ces gènes étant augmentée d'un facteur 1,5 chez des animaux sauvages traités de façon chronique par du cortisol, les niveaux de *Sgk* et *Fkbp5* chez les souris *Mecp2^{ly}* correspondent donc à des niveaux habituellement induits par un stress soutenu.

La liaison directe de MeCP2 aux promoteurs de ces gènes s'effectue sur des sites distincts des régions modulées par le complexe « récepteur aux glucocorticoïdes-ligands », MeCP2 n'étant pas libérée lors de l'administration de

corticostérone. Néanmoins, l'interaction de MeCP2 sur ses sites ne provoque pas l'extinction complète de ces gènes, suggérant une modulation de leur niveau d'expression basal plutôt qu'une stricte répression.

Aux vues des rôles de *Sgk* et *Fkbp5* dans les fonctions nerveuses, survie et excitabilité neuronale, modulation de la réponse aux stéroïdes (158, 159), et des effets délétères d'une exposition aux corticoïdes sur le développement cérébral (160), la perte de modulation de ces gènes par MeCP2, mimant des niveaux comparables à un stress chronique, participerait à la pathogenèse du syndrome de Rett et expliquerait, du moins en partie, la similarité entre certains des symptômes observés chez des enfants RTT (épilepsie, anxiété, agitation) et les conséquences physiologiques de l'exposition aux glucocorticoïdes.

V. IMPLICATIONS PHYSIOPATHOLOGIQUES

1. Pathologies neurologiques liées au défaut de MeCP2

L'identification d'une mutation au sein de la séquence de *MECP2* n'est pas nécessairement le synonyme d'un syndrome de Rett. Les mutations de MeCP2 sont aussi associées à d'autres pathologies neurologiques comme le syndrome d'Angelman (161), les retards mentaux liés à l'X (37), le syndrome PPM-X (162), certaines formes d'autisme (163) ou des encéphalopathies néonatales (164).

2. Pathologies neurologiques liées à une surexpression de MeCP2

Différents diagnostics réalisés chez des patients souffrants de formes atypiques de RTT (165), de retards mentaux liés à l'X ou sévères et progressifs (166-168), ou encore de retards développementaux (169) ont identifié des duplications du *locus* de *Mecp2* comme responsables de ces atteintes neurologiques.

Les conséquences physiologiques d'une augmentation de dose de MeCP2 ont pu être explorées dans un modèle murin. L'équipe du D^r Huda Zoghbi a développé un modèle de souris transgéniques exprimant le *locus* génomique humain de *MECP2* sous contrôle de son promoteur endogène. Le phénotype de ces souris MeCP2^{Tg1} se traduit par une augmentation de leur capacité d'apprentissage et de plasticité synaptique aux stades précoces de leur vie, puis par le développement d'une pathologie neurologique progressive dont l'apparition et la sévérité varient en corrélation avec le niveau de MeCP2 exprimée. Même un faible excès de MeCP2, d'un facteur minimal de 2 en raison de l'expression de la forme endogène et d'une seule copie du transgène, est capable d'induire une telle pathologie (170).

De même, l'expression homozygote du transgène *Tau-Mecp2* dans des souris exprimant l'allèle sauvage, résultant en une augmentation du niveau protéique de MeCP2 d'un facteur 4 à 6, provoque de sévères dysfonctions motrices, des tremblements et une stérilité chez ces animaux, soulignant l'aspect délétère d'une surexpression de MeCP2 (68).

Le système nerveux central est donc extrêmement sensible aux doses de MeCP2. Aux vues de son profil d'expression spatio-temporel complexe et du peu de variation acceptable en terme de quantité de protéine, son expression doit donc être très finement régulée. Des thérapies visant à augmenter le niveau de MeCP2 chez les patients atteints du syndrome de Rett ou de pathologies associées à une perte de fonction de MeCP2 devront

donc être envisagées avec une extrême prudence car elles pourraient produire des effets secondaires neurologiques délétères importants.

VI. CONCLUSION

MeCP2 est donc une protéine multifonctionnelle capable de moduler de façon quantitative et qualitative l'expression génique et dont le défaut d'expression est à l'origine d'une pathologie lourde. Ses fonctions biologiques majeures sont désormais clairement identifiées mais pourtant, ses cibles génétiques sont imprécises et leur identification est encore une source de débat dans la littérature.

Par exemple, si les groupes du D^r Janine LaSalle et du D^r Ruth Shemer ont pu mettre en évidence une régulation du niveau d'expression du gène *Ube3a*, soumis à l'empreinte parentale, par MeCP2 (140, 171) tant chez les souris adultes déficientes en *Mecp2* que chez des patientes souffrant de RTT, le D^r Uta Francke conteste ces résultats en rapportant que l'expression de *Ube3a* n'est altérée ni en RT-PCR quantitative, ni en immuno-blot dans deux souches de souris déficientes pour *Mecp2* (172).

Des résultats si divergents entre groupes semblent provenir de différences dans les choix d'approches expérimentales, d'âge ou de souches de souris utilisés. Cette polémique souligne donc la difficulté d'obtenir des résultats reproductibles dans le cadre de la recherche des cibles de MeCP2 car ces régulations semblent différer, pour un gène donné, en fonction du type cellulaire ou du stade développemental étudié.

LE COMPLEXE MAJEUR D'HISTOCOMPATIBILITÉ DE CLASSE I

I. DÉFINITION ET CARACTÉRISTIQUES GÉNÉRALES

L'un des défis majeurs des organismes eucaryotes supérieurs est la défense contre l'invasion par des pathogènes et contre le développement de cellules cancéreuses. Le système immunitaire a évolué pour mettre en place un système dit « adaptatif » capable de reconnaître spécifiquement et de détruire des antigènes disséminés dans les fluides corporels ou localisés au sein des cellules. Les effecteurs majeurs de la réponse immunitaire adaptative sont les lymphocytes B et T.

Parmi ces populations lymphocytaires, les lymphocytes T CD8⁺cytotoxiques (CTLs) reconnaissent et détruisent les cellules infectées ou malignes. Les cellules cytotoxiques ne pouvant accéder à l'espace intracellulaire pour détecter la présence de pathogènes, une machinerie complexe permet la présentation en surface cellulaire des protéines synthétisées dans le cytosol. La partie émergée de cette machinerie sophistiquée est constituée par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I. Ces glycoprotéines prennent en charge les antigènes peptidiques et les exposent à la surface cellulaire. Si les peptides proviennent de protéines endogènes normales, les CTLs les reconnaissent comme du « soi » et restent silencieux, exceptés dans le cadre de pathologies auto-immunes. Si au contraire, les peptides exposés sont générés à partir de protéines exogènes ou mutées, alors certains des CTLs, porteurs d'un récepteur TCR approprié, vont déclencher une réponse dite cytotoxique, létale pour la cellule présentant ce type d'antigène. Les molécules de CMH de classe I jouent donc un rôle crucial dans la réponse immunitaire adaptative en fournissant aux CTLs un échantillon toujours renouvelé des protéines synthétisées au sein d'une cellule.

1. Les molécules de CMH de classe I

1.1 Caractéristiques biochimiques et structurales

Les molécules de CMH de classe I sont constituées de deux chaînes polypeptidiques associées de façon non covalente : une chaîne lourde α ou H (44 kDa) ancrée à la membrane et codée au sein du *locus* du CMH et une sous-unité soluble, la β 2-microglobuline (12 kDa), non polymorphique et codée en dehors du *locus* du CMH. Ce dimère chaîne α / β 2-microglobuline nécessite d'être stabilisé soit par la tapasine, au sein du réticulum endoplasmique, soit par l'association avec un peptide antigénique (173).

La chaîne lourde des molécules de CMH de classe I est constituée de trois domaines α 1, α 2 et α 3. L'agencement tridimensionnel des deux domaines distaux α 1 et α 2 forme une plateforme de feuillets- β

antiparallèles entourée de deux hélices- α qui constituent respectivement le plancher et les parois de la poche de liaison aux peptides antigéniques. Les molécules de CMH de classe I s'associent préférentiellement à des peptides de 8 à 11 acides aminés. La liaison d'un peptide dans la poche d'une molécule de CMH de classe I est stabilisée à ses deux extrémités par le contact entre les résidus libres des extrémités N- et C-terminales du peptide, appelés résidus d'ancrage, et les sites invariants situés de chaque côté de la poche. En plus de l'interaction des résidus terminaux, des liaisons hydrogènes se forment entre les résidus de la chaîne lourde et le squelette d'acides aminés du peptide qui correspond à la séquence variable identifiée par les lymphocytes T. La nature des sites d'ancrage nécessaires à ces interactions donne à chaque molécule de CMH de classe I sa spécificité de liaison à un type de peptide donné (174) (Illustration 10).

1.2 Apprêtement et présentation des antigènes par les molécules de CMH de classe I

Les protéines endogènes sont constamment dégradées par le protéasome, un complexe multi-catalytique présent dans le cytosol. Après poly-ubiquitination, les protéines obsolètes ou les produits défectifs issus des ribosomes (DRiPs), qui sont les deux types de substrats majeurs de dégradation par le protéasome, sont fragmentés en peptides de 3 à 22 résidus. Plus de 99 % des peptides ainsi générés sont détruits dans la minute qui suit et sont donc perdus pour la présentation par le CMH.

Les peptides restants sont pris en charge par des peptidases cytosoliques, comme par exemple l'aminopeptidase sensible à la puromycine (PSA) ou l'hydrolase bleomycin (BH). Des peptides long de moins de 15 résidus sont écourtés exclusivement par la tripeptidyl peptidase-II (TPP-II) qui possède à la fois une activité exo- et endopeptidase. Les peptides ainsi édités sont ensuite transportés dans la lumière du réticulum endoplasmique (ER) par les transporteurs TAP (transporter associated with antigen processing).

Ils sont alors à nouveau raccourcis par les aminopeptidases ERAP1/2 (ER-luminal aminopeptidase) jusqu'à une longueur de 8 à 11 acides aminés et chargés sur les molécules de CMH de classe I par le complexe macromoléculaire PLC (peptide-loading complex). Le complexe CMH-peptide est ensuite transporté *via* le golgi vers la membrane plasmique où il sera exposé à la surface cellulaire pour être détecté par les lymphocytes (175-177) (Illustration 11).

2. Les gènes du CMH de classe I

2.1. Organisation génomique du complexe majeur d'histocompatibilité

Les molécules du CMH sont codées par un large *cluster* de gènes originellement identifiés par leur implication dans les mécanismes immunitaires à l'origine du rejet de greffes allogéniques. Le complexe majeur d'histocompatibilité est situé sur le chromosome 6 chez l'homme, 17 chez la souris, et s'étend sur une région génomique d'approximativement 4 cM (178) (Illustration 12).

Ce *cluster* contient un grand nombre de gènes impliqués dans le fonctionnement du système immunitaire. Il contient les gènes codant pour les molécules de CMH de classe I classique (ou Ia) et les gènes codant pour les chaînes α et β de CMH de classe II. Les molécules de CMH de classe II ont, comme les molécules de classe I, la

capacité de présenter des antigènes en surface cellulaire et sont impliquées dans l'activation des lymphocytes T de type CD4⁺ ou auxiliaires.

Ce *locus* comprend également des gènes peu polymorphes codant pour des protéines de « type » CMH de classe I, s'associant elles aussi à la β 2-microglobuline mais qui ont des fonctions très spécifiques. Ces gènes sont appelés gènes de CMH de classe I non-classique (ou Ib) (179).

Outre les gènes codant pour les molécules de CMH de classe Ia, Ib et II, cette région contient les gènes de TAP, LMP, tapasin, HLA-DM, HLA-DO et, au sein de sa partie centrale de 1 Mb, les gènes du CMH dit de classe III dont certains codent pour des molécules du complément ou des cytokines.

Le complexe majeur d'histocompatibilité est polygénique ; il contient plusieurs gènes codant pour des molécules de CMH de classe I différentes de telle sorte que chaque individu ne possède pas qu'un seul type de molécule mais un lot de molécules de classe I ayant chacune un champ de spécificité de liaison antigénique différent. Chez l'homme, il existe trois gènes codant pour la chaîne α du CMH de classe I : HLA-A, -B et -C (H2-K, -D et -L chez la souris) et trois paires de gènes codant pour les chaînes α et β de CMH de classe II : HLA-DR, -DP et -DQ (H2-A et -E chez la souris).

Le CMH est également hautement polymorphe, il existe jusqu'à plus de 200 allèles pour certains de ces gènes. En raison de ce grand nombre d'allèles et de leurs expressions codominantes à chaque *locus*, la diversité d'expression des molécules présentatrices d'antigène est augmentée entre individus. Le polymorphisme des molécules de CMH de classe I affecte principalement les acides aminés situés dans la poche de liaison aux peptides antigéniques et en modifie la spécificité. Les résidus d'ancrage des peptides permettant la liaison à chacun des variants alléliques sont donc différents.

2.2. Régulation transcriptionnelle des gènes du CMH de classe I

Bien que les gènes du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I soient constitutivement actifs dans tous les tissus, leurs niveaux relatifs d'expression varient dramatiquement entre types cellulaires. Leur expression atteint par exemple ses niveaux les plus élevés dans les cellules du système immunitaire et reste presque indétectable dans des tissus dits immunoprivilégiés tels les cellules germinales, les yeux ou le système nerveux central. Ainsi, bien que les promoteurs des gènes de CMH I soient accessibles à la machinerie transcriptionnelle basale, ils sont soumis à des régulations complexes dépendantes du type cellulaire. De plus, leur expression est dynamiquement régulée par des *stimuli* tels les cytokines, certaines hormones ou des agents inflammatoires. L'expression des gènes de CMH I est donc soumise à deux types de régulation : une régulation basale déterminant le niveau d'expression tissu-spécifique de ces gènes et une régulation dynamique, soit activatrice, soit inhibitrice, qui module de façon transitoire leur niveau d'expression.

Les régions génomiques régulatrices modulant l'expression basale et inductible des gènes de CMH de classe I sont toutes contenues dans une région de 1 kb en amont des séquences codantes (180) et sont organisées en deux domaines distincts : un domaine de -800 à -700 bp responsable de l'expression tissu-spécifique et un domaine de -500 à -50 bp responsable de l'expression basale et induite (181). L'expression appropriée des gènes du CMH de classe I dépend alors de l'intégration au niveau du promoteur « cœur » des signaux provenant de ces régions régulatrices et de ceux de la machinerie transcriptionnelle générale.

Le promoteur cœur des gènes du CMH de classe I

Le promoteur cœur des gènes du CMH de classe I (situé des nucléotides -50 à +14) est défini comme la séquence minimale d'ADN suffisante pour déclencher l'initiation d'une transcription appropriée par l'ARN polymérase (Pol) II, ceci en assurant :

- le recrutement des facteurs généraux de la transcription basale ;
- leur association avec l'ARN Pol II ;
- l'intégration des signaux provenant des séquences régulatrices activatrices et inhibitrices en amont ;
- le choix du site d'initiation de la transcription (182-184).

Le promoteur cœur des gènes du CMH de classe I contient trois éléments majeurs pour le contrôle de leur expression : le motif TATAA, le motif Inr-like et une région riche en CA/GT (S-box) – site de liaison des facteurs de la famille Sp1 (185).

La transcription basale s'initie sur des sites en amont dans le promoteur cœur (aux positions -14 et -18) et requiert la liaison de l'activateur Sp1 à la région S-box ainsi que le facteur de transcription général TAF1 (TAF_{II}250), sous-unité de TFIID. La transcription activée s'initie, elle, sur des sites en aval dans le promoteur cœur (des positions -4 à +12) et est indépendante de Sp1 ou de TAF1 (TAF_{II}250) (185).

Les voies de la transcription basale ou activée des gènes de CMH de classe I utilisent donc des sites d'initiation et des domaines de régulations distincts au sein du promoteur cœur ainsi que des complexes protéiques d'initiation de la transcription différents.

Éléments et facteurs impliqués dans le contrôle de l'expression des gènes du CMH I

L'activation des promoteurs des gènes du CMH de classe I et de la β 2-microglobuline est assurée par trois éléments régulateurs majeurs : l'élément *enhancer* A, l'élément de réponse à l'IFN « ISRE » (IFN-stimulated response element) et le module SXY (constitué des quatre boîtes S box, X1 box, X2 box et Y box) (186, 187). Ces éléments régulateurs sont localisés en amont du promoteur cœur dans une région s'étendant approximativement des nucléotides -220 à -95. Les variations de séquences observées entre *loci* de gènes de CMH au niveau de ces éléments expliquent les différences de niveaux d'expression basale et inducible observées entre gènes de CMH de classe I et entre types cellulaires (188).

L'*enhancer* A et l'ISRE contiennent respectivement des sites de liaison au facteur de transcription nucléaire NF- κ B (nuclear transcription factor κ B) et aux membres de la famille des IRF (interferon-regulatory factor) (189, 190). Ainsi, les gènes du CMH de classe I et de la β 2-microglobuline sont soumis à l'action de NF- κ B et de IRF-1, tous deux régulateurs transcriptionnels en aval des voies de signalisation Jak/STAT induites par les cytokines TNF- α et IFN- γ .

Le module SXY est un site de liaison pour un complexe multiprotéique RFX/CREB/ATF/NFY (regulatory factor X, cAMP response element binding protein, activating transcription factor et nuclear factor Y), appelé « MHC enhanceosome », responsable de la transactivation des gènes du CMH I et de la β 2-microglobuline (191, 192). En association avec ce complexe, le facteur CIITA (class II transactivator) permet d'assurer, *via* des interactions protéine-protéine, l'activation induite par l'IFN- γ de ces gènes (193, 194).

Cette région régulatrice en amont des gènes du CMH I ou de la β 2-microglobuline contient également des sites de liaison pour le facteur de transcription Sp1 et des boîtes canoniques E (E-boxes), sites de liaison pour les

facteurs de transcription USF-1 et 2 (upstream stimulatory factor) qui contribuent à l'expression basale du CMH I (195) (Illustration 13).

Contrôle de l'expression des gènes de CMH de classe I par remodelage de la chromatine

Le contrôle des promoteurs des gènes du CMH de classe I repose également sur le recrutement d'enzymes de remodelage de la chromatine qui sont des composants critiques pour l'organisation locale de l'architecture de la chromatine et de son accessibilité à la machinerie transcriptionnelle.

Lors de son interaction avec le « MHC enhanceosome », CIITA agit comme une plateforme de recrutement d'histones acétyl-transférases (HATs), notamment de p300/CBP et son facteur associé PCAF. CIITA possède également une activité HAT intrinsèque assurée par son extrémité N-terminale et régulée par son domaine de liaison au GTP carboxy-terminal. CBP et PCAF sont aussi capables d'acétyler CIITA au niveau de son signal de localisation nucléaire sur des résidus lysine spécifiques et, en provoquant ainsi son accumulation au noyau, favorisent son activité (196, 197).

Alors que les HATs promeuvent l'action de CIITA, d'autres enzymes de modification de la chromatine, les histones déacétylases (HDACs), interfèrent avec ses fonctions. En effet, HDAC1 et HDAC2 inhibent la transactivation médiée par CIITA en réponse à l'IFN- γ en perturbant l'assemblage du « MHC enhanceosome » et l'association de CIITA à ses partenaires protéiques. Les activités HAT et HDAC agissent donc comme des modulateurs moléculaires de l'expression des gènes de CMH de classe I, respectivement activatrices ou inhibitrices.

D'autres facteurs de remodelage de la chromatine, comme BRG-1 (Brahma related gene 1), un composant du complexe SWI/SNF, sont également impliqués dans le contrôle de l'expression des gènes du CMH I. BRG-1 est impliqué dans les processus d'activation dépendants de l'*enhancer* A et participe, de façon indirecte, à l'augmentation d'expression des gènes de CMH I en réponse à l'IFN- γ médiée par CIITA (198, 199).

II. LE CMH DE CLASSE I ET LE SYSTÈME IMMUNITAIRE

Le rôle majeur des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I est de présenter en surface cellulaire les peptides issus de la dégradation des protéines cytosoliques. Les peptides ainsi exposés peuvent donc être issus de protéines endogènes, de protéines mutées dans le cas de transformations tumorales ou de protéines virales et bactériennes dans le cadre d'infections.

Les molécules de CMH de classe I constituent donc un informateur privilégié du système immunitaire, elles lui donnent accès à la nature et à l'état des cellules et lui permettent ainsi d'adopter la réponse la plus efficace et la plus adaptée.

Les molécules de CMH de classe I interviennent dans de nombreux processus immunitaires complexes. Les plus marquants peuvent être résumés ainsi.

1. Rôle des molécules de CMH de classe I dans la différenciation et la sélection thymique

Au cours de leur développement, les thymocytes doivent subir des étapes majeures de contrôle au cours desquelles une transduction de signaux, *via* leur pré-TCR (T-cell receptor) puis leur TCR $\alpha\beta$, va autoriser ou non le franchissement des étapes de différenciation, sélection et engagement dans les lignages lymphocytaires CD4 ou CD8. Le thymus est le premier lieu de confrontation de ces cellules avec les complexes CMH-peptide qui participent activement à leur développement.

Le premier événement de signalisation (*étape de β -selection checkpoint*) a lieu alors que les thymocytes sont au stade double-négatif CD4⁻CD8⁻ trois (DN3) et permet de contrôler le réarrangement de la chaîne TCR β réalisé par les protéines RAG (recombination activating genes). Une signalisation efficace *via* le pré-TCR (chaîne β réarrangée, chaîne pré-TCR α invariante et complexe CD3/ ζ) est nécessaire pour déclencher l'exclusion allélique du *locus* TCR β , la prolifération de ces cellules et l'expression des co-récepteurs CD4 et CD8. Au stade double-positif CD4⁺CD8⁺ et après 6 à 8 divisions, les thymocytes cessent de proliférer et réexpriment les gènes RAGs permettant le réarrangement du *locus* de la chaîne TCR α , second composant du TCR mature.

Les étapes de contrôle suivantes s'exercent sur des thymocytes exprimant un TCR $\alpha\beta$ mature et conduisent à des destinées différentes selon :

- la force d'interaction entre les complexes CMH-peptides du soi et le TCR du thymocyte en développement ;
- la localisation intra-thymique de cette interaction.

Dans le cortex, l'absence d'interaction entre un thymocyte et les complexes CMH-peptides du soi exprimés par les cellules épithéliales corticales conduit à la mort par négligence alors qu'une interaction appropriée permet la survie (sélection positive). Cette étape a pour objet d'éliminer les thymocytes incapables de reconnaître les molécules de CMH I du soi et qui, en conséquence, ne serait pas fonctionnels en périphérie. Les thymocytes survivant engagent leur différenciation vers le lignage simple-positif CD4 ou CD8 selon que l'interaction avec les cellules épithéliales corticales s'est effectuée *via*, respectivement, des molécules de CMH de classe II ou de classe I.

Les cellules ayant subi cette étape de sélection et d'entrée en lignage migrent dans la medulla où elles rentrent en contact avec des cellules épithéliales médullaires et des cellules dendritiques spécialisées qui présentent également des complexes CMH-peptides du soi. À cette nouvelle étape de contrôle, si l'interaction entre le TCR des cellules simple-positives (et son co-récepteur CD4 ou CD8) et ces complexes antigéniques est de trop forte affinité alors les thymocytes sont éliminés par apoptose afin d'écarter un risque de réactivité contre le soi en périphérie (sélection négative). Après une période de résidence dans la medulla, les thymocytes matures simple-positifs rejoignent la circulation (200-202).

Les molécules de CMH de classe I participent donc activement aux processus de sélection et de différenciation des lymphocytes en exerçant pleinement leur rôle de présentation d'antigène et en éduquant les lymphocytes sur la nature des antigènes endogènes de l'organisme, établissant ainsi une tolérance vis-à-vis du soi (Illustration 14).

2. Rôle des molécules de CMH de classe I dans l'initiation et la modulation des réponses immunitaires cellulaires

Les molécules de CMH de classe I sont des plateformes d'information pour les effecteurs cellulaires des réponses immunitaires. Elles leur permettent de détecter la présence de pathogènes intracellulaires dans l'organisme et les transformations tumorales en assurant, dans un même temps, la distinction des cellules voisines saines grâce à l'exposition de peptides du soi.

Les molécules de CMH de classe I sont impliquées dans deux processus majeurs des réponses immunitaires à médiation cellulaire dont je vais présenter ici une description générale.

2.1. Initiation des réponses T cytotoxiques

Lorsque les lymphocytes T ont achevé leur développement dans le thymus, ils gagnent la circulation générale pour rejoindre les organes lymphoïdes périphériques. Ces lymphocytes T matures naïfs circulent en continu entre organes lymphoïdes secondaires *via* le système sanguin et la lymphe jusqu'à la rencontre avec le complexe peptide-CMH dont ils sont spécifiques.

Dans le cas des lymphocytes T CD8⁺ naïfs, la présentation de cet antigène spécifique se fait dans le contexte des molécules de CMH de classe I exposées à la surface des cellules présentatrices d'antigène (CPA) professionnelles.

Lorsque les CPA immatures, et en particulier les cellules dendritiques, ingèrent un agent pathogène ou sont infectées dans les tissus périphériques, elles s'activent. Leur activation provoque des modifications phénotypiques et fonctionnelles induisant leur maturation et leur migration vers les organes lymphoïdes secondaires drainant le site d'infection. Les CPA matures peuvent alors présenter les antigènes dans le contexte des molécules de CMH I de façon efficace grâce à l'expression de molécules d'adhésion, de costimulation et la sécrétion de cytokines.

Les interactions entre le complexe peptide-CMH I sur la CPA activée et le complexe TCR/CD3/CD8 sur le lymphocyte naïf et, dans un même temps, entre les molécules de costimulation et leurs récepteurs, déclenchent l'activation des lymphocytes T CD8⁺. Dans certains cas, cette activation nécessite l'aide de lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires activés par la même CPA.

Une fois activés, les lymphocytes T CD8⁺ entrent dans le cycle cellulaire et se divisent rapidement pour générer un grand nombre de descendants se différenciant en lymphocytes T cytotoxiques effecteurs activés. Prolifération et différenciation sont assurées par leur propre production d'IL2 et l'expression de son récepteur.

Les lymphocytes T CD8⁺ effecteurs synthétisent alors les molécules d'adhésion nécessaires à leur entrée au site d'infection et les molécules nécessaires à leur fonction cytotoxique : perforine, granzyme, Fas Ligand et cytokines. Au site d'infection, les lymphocytes effecteurs vont reconnaître les cellules cibles infectées *via* l'expression à leur surface cellulaire du complexe peptide-CMH de classe I dont ils sont spécifiques. Lorsque les lymphocytes T CD8⁺ sont activés, la rencontre avec leur antigène ne nécessite pas la présence des molécules de costimulation et ils peuvent donc diriger leur action lytique vers tous les types cellulaires.

La présentation des peptides intracellulaires par les molécules de CMH de classe I étant effective sur presque toutes les cellules nucléées de l'organisme, bien qu'à des niveaux variables, le CMH de classe I permet donc l'élimination des infections virales de l'organisme par les lymphocytes T cytotoxiques.

Cependant, certains types cellulaires, comme les globules rouges ou les neurones, n'expriment que peu ou pas de molécules de classe I et constituent des réservoirs infectieux – les virus s'y répliquant ne pouvant être détectés par les lymphocytes T CD8⁺. Ces exemples renforcent clairement l'importance du rôle de la présentation des antigènes intracellulaires par les molécules de CMH de classe I (203, 204) (Illustration 15).

2.2. Modulation des réponses cytolytiques par les cellules NK

Les cellules tueuses naturelles ou *Natural Killer* (NK) sont une population de lymphocytes issus de la moëlle osseuse qui jouent un rôle primordial dans les stades précoces de la réponse immunitaire innée dirigée contre les cellules infectées par des virus, des pathogènes intracellulaires, contre les cellules tumorales ou contre les greffons (205-209).

À la différence des lymphocytes T et B, les cellules NK n'expriment pas de récepteur pour un antigène donné ; leur réponse est immédiate et non spécifique. Elles produisent des cytokines pro-inflammatoires et ont une action cytolytique médiée par la production de perforine et de granzyme.

Cependant, ces cellules NK possèdent la capacité de discriminer les cellules saines du soi des cellules cibles (infectées, malignes ou greffées). Cette reconnaissance s'effectue grâce à l'expression d'un panel de récepteurs inhibiteurs ou activateurs en surface cellulaire.

L'activation des cellules NK est régulée par la balance entre les signaux activateurs, générés par l'interaction des récepteurs activateurs et divers ligands exprimé par les cellules infectées ou stressées, et les signaux inhibiteurs, générés par la reconnaissance spécifique des molécules de CMH de classe I (Illustration 16).

Les cellules NK détectent la nature et le niveau des molécules de CMH de classe I classique *via* deux modes. Par reconnaissance directe : les molécules de CMH de classe I classique sont liées directement par des récepteurs de la famille des KIR (Killer cell Immunoglobulin-like Receptor) chez l'homme ou par le récepteur Ly49 chez la souris. Et par reconnaissance indirecte : le récepteur hétérodimérique CD94/NKG2A permet aux NK d'identifier les peptides *leader* des molécules de CMH de classe I classique (et non la molécule entière mature) présentés à la surface cellulaire par une molécule de CMH de classe I non classique spécialisée, HLA-E chez l'homme ou Qa-1 chez la souris. Les signaux inhibiteurs générés par la reconnaissance du soi sont dominants et maintiennent les cellules NK dans un état inactif.

Les cellules NK ne déclenchent donc pas de réponse lytique vers des cellules saines, du soi et exprimant des niveaux normalement élevés de molécules de CMH de classe I à leur surface. Dans le cas d'infection virale, la synthèse ou le transport des molécules de CMH I sont susceptibles d'être diminués ; de même que lors des processus de transformation tumorale. Lorsque les cellules NK détectent l'absence ou la diminution du niveau de CMH I, le signal inhibiteur est levé, les récepteurs activateurs détectent les modifications d'expression des glycoprotéines membranaires et la réponse lytique est alors initiée.

Les cellules NK participent également aux processus de rejet de greffe lorsque le greffon n'exprime pas le même haplotype de CMH de classe I que son hôte.

Les molécules de CMH de classe I permettent donc la détection d'infections intracellulaires, de transformations malignes ou de cellules étrangères par les deux versants de la réponse immunitaire : par les lymphocytes T cytotoxiques pour le volet adaptatif et par les cellules NK pour la part innée.

III. LE CMH DE CLASSE I ET LE SYSTÈME NERVEUX

Le statut immuno-privilegié du SNC est basé, entre autre, sur l'absence d'expression des molécules de CMH de classe I par les neurones. De nombreuses études ont en effet échoué à détecter les protéines de CMH I sur des coupes de cerveaux sains non traités, sur des neurones en culture ou sur des lignées neuronales immortalisées (210-214). En revanche, les neurones sont capables d'exprimer des niveaux élevés de molécules de CMH de classe I en réponse à divers traitements tels l'axotomie (215), les infections virales (216, 217), l'exposition aux cytokines (218, 219) ou l'altération pharmacologique de leur activité électrique (220).

Des études récentes ont néanmoins démontré que des neurones sains, dans leur environnement normal, expriment des molécules de CMH de classe I classique et non-classique *in vivo*. Les transcrits et les protéines ont en effet été détectés dans différentes populations neuronales telles les cellules pyramidales hippocampiques (221) et corticales (221, 222), les neurones sensoriels de l'organe voméro-nasal (223, 224), les neurones spinaux moteurs (225, 226), du tronc cérébral (227) ou du *locus niger* (222, 226).

Les gènes de CMH de classe I classique et non-classique montrent des profils d'expression au sein de ces populations neuronales distincts, complexes et particulièrement dynamiques au cours du développement du SNC (221, 222, 224). Leur expression étant également régulée par l'activité électrique normale ou évoquée (219, 221, 222), ces observations semblent indiquer que le niveau et le profil d'expression spatio-temporel des molécules de CMH soient des éléments cruciaux pour l'accomplissement de leur fonction dans le système nerveux.

Je vous présenterai ici certaines des études qui ont permis de mettre en évidence l'implication et l'importance des molécules de CMH de classe I dans le développement et le fonctionnement du système nerveux et qui sont à la base de la découverte de fonctions non immunes des molécules de CMH de classe I.

1. Le CMH de classe I dans le développement et la plasticité du SNC

Dans le système visuel des mammifères supérieurs, les *stimuli* en provenance de chaque oeil sont strictement séparés dans différentes couches du noyau géniculé latéral (LGN) et au sein des colonnes du cortex visuel primaire. Cette ségrégation est la résultante de processus de remodelage et d'affinement des projections et des connexions inter-neuronales au cours du développement du système visuel. Cette réorganisation anatomique et fonctionnelle est un processus actif, dépendant de l'activité électrique neuronale d'abord spontanée puis initiée par les *stimuli* visuels. Au cours de la formation des couches de projections neuronales spécifiques de chaque oeil dans le LGN, le blocage des trains de potentiels d'action en provenance des neurones sensitifs rétiniens par la tetrodotoxine (TTX) abolit la formation de telles couches et résulte en des projections axonales anarchiques au sein du LGN. Les mécanismes de plasticité synaptique et leur consolidation nécessitant des modifications des programmes d'expression génique, Corriveau *et al.* ont réalisé un criblage par multiplex des gènes régulés par l'activité électrique endogène au cours de la formation des circuits rétino-géniculés chez le chat afin d'identifier les composants moléculaires impliqués dans le ciblage précis des connexions synaptiques (221).

Ainsi ces auteurs ont pu mettre en évidence que les gènes codant pour les molécules de CMH I participent au cours du développement à la spécification fonctionnelle des couches neuronales du LGN et sont régulés par les potentiels d'action spontanés et l'activité neuronale déclenchée par les *stimuli* visuels.

L'expression des ARN messagers codant pour le CMH I est régulée de façon dynamique durant le développement et corrèle avec les périodes et les régions de remodelage synaptique. Dans l'hippocampe par exemple, un niveau d'expression relativement élevé des molécules de CMH I est maintenu dans les zones CA1 et CA3 durant le développement mais aussi à l'âge adulte.

L'expression protéique des molécules de classe I et de leur sous-unité, la β 2-microglobuline, a été confirmée chez le rat dans certaines sous-populations neuronales du système nerveux central. De même, la chaîne CD3 ζ , composante de leur récepteur TCR, est exprimée dans le SNC et pourrait donc constituer un partenaire d'interaction privilégié des molécules de CMH I dans le système nerveux. CD3 ζ joue un rôle clé dans les événements de transduction du signal en induisant lors de sa phosphorylation, la modification d'activité des protéines tyrosine kinases intracellulaires Lck et Fyn, cette dernière étant impliquée dans les mécanismes de potentialisation à long terme dans l'hippocampe (221).

Pour évaluer de façon directe l'hypothèse d'un rôle du CMH de classe I dans les mécanismes de plasticité synaptique et de remodelage structural dépendants de l'activité neuronale, Huh *et al.* ont alors examiné des souris déficientes pour la β 2-microglobuline ou TAP1, molécules nécessaires à l'expression en surface cellulaire des molécules de CMH de classe I, ou déficientes pour leur récepteur CD3 ζ (222).

Chez tous ces mutants, la ségrégation normale et le ciblage précis des afférences rétiniennes dans le LGN sont abrogés ; les zones occupées par ces projections restent étendues et sont même parfois ectopiques, suggérant un défaut spécifique des événements de remodelage dépendants de l'activité électrique et nécessaires au ciblage synaptique précis et à l'organisation structurale des noyaux neuronaux.

La régulation fine de la connectivité neuronale correspond à des événements de modification de la « force » synaptique. Cette plasticité synaptique, particulièrement connue au sein de l'hippocampe, est dépendante de la fréquence de la stimulation électrique : de hautes fréquences induisent des dépressions à long terme (LTP), à l'origine du retrait de connectivités inter-neuronales, et de basses fréquences induisent des potentialisations à long terme (LTD), à l'origine du renforcement et de la stabilisation de synapses.

En examinant la plasticité synaptique dans l'hippocampe adulte de ces souris mutantes, ces auteurs ont pu observer un biais dans la régulation bidirectionnelle de retrait/stabilisation des synapses qui favorise la potentialisation au détriment des mécanismes de dépression. Ainsi, en absence de CMH de class I ou de CD3 ζ , une activité neuronale qui n'a normalement aucun effet sur les propriétés de la synapse ou induit une LTD, va au contraire induire une LTP inappropriée. Ce phénomène observé dans l'hippocampe pourrait par ailleurs expliquer pourquoi dans le LGN des connexions neuronales inappropriées persistent (222).

Ces travaux valident donc l'hypothèse d'un rôle des molécules de CMH de classe I et de leur signalisation *via* CD3 ζ dans les mécanismes normaux de régression et de renforcement des connexions synaptiques dans le SNC en développement ou adulte.

2. Le CMH de classe I et la fonctionnalité synaptique

Les premières études menées pour identifier les fonctions des molécules de CMH de classe I au sein du système nerveux central ont donc permis de mettre en évidence l'implication de ces molécules dans les mécanismes de plasticité synaptique dépendants de l'activité électrique neuronale et d'ouvrir des pistes quant à la nature des récepteurs candidats.

Cependant, ces travaux n'ont pas permis de déterminer si les molécules de CMH de classe I sont un élément de la machinerie moléculaire intracellulaire régulant les fonctions et la structure synaptiques ou si elles exercent leur fonction *via* une localisation et des interactions directement à la synapse.

Des travaux du groupe de Carla Shatz (228) publiés en 2007 se sont attachés à répondre à ces questions et ont clairement démontré que les molécules de CMH de classe I participent à la régulation de la fonction et de la morphologie synaptiques en condition basale et en réponse au blocage de l'activité électrique.

En effet, des expériences d'électrophysiologie sur des cultures de neurones hippocampiques ont démontré des altérations de la transmission synaptique basale (augmentation de la fréquence des mEPSCs) ou en réponse au TTX (aucune augmentation de la fréquence et de l'amplitude des mEPSCs) des neurones issus de souris déficientes pour la β 2-microglobuline ou TAP, dépourvus d'expression stable de CMH I en surface cellulaire.

Par ailleurs, des expériences d'immunohistochimie et de microscopie électronique montrent des altérations de la structure synaptique des neurones KO, et en particulier des boutons pré-synaptiques.

Les molécules de CMH de classe I ayant été localisées, dans cette même étude, sur les membranes dendritiques post-synaptiques, l'observation d'altérations structurales pré-synaptiques suggère que les protéines du CMH de classe I pourraient participer à la signalisation synaptique rétrograde qui traduit les changements soutenus de l'activité électrique neuronale en modifications de la structure synaptique à long terme.

Ces résultats suggèrent donc un nouveau rôle pour les molécules de CMH de classe I dans la communication entre éléments pré- et post-synaptiques qui pourrait être un élément de leur modulation de la plasticité synaptique.

3. Le CMH de classe I et l'organe voméro-nasal

Parmi les molécules codées par les gènes du CMH, les molécules de classe I classique ne sont pas les seules à exercer des fonctions non immunes dans le système nerveux. Les travaux récents des groupes de Catherine Dulac (223) et Peter Mombaerts (224) ont démontré que des gènes du CMH de classe I non classique sont spécifiquement exprimés dans des sous-populations neuronales de l'organe voméro-nasal des mammifères (OVN) où, là encore, ils exercent des fonctions inattendues.

L'OVN est une structure sensorielle de la cavité nasale spécialisée dans la détection de petites molécules et de protéines, les phéromones, qui fournissent des informations sur le sexe et le statut social ou reproductif des congénères et déclenchent lors de leur perception des réponses endocrines ou comportementales. L'OVN est organisé en deux couches distinctes : une couche apicale dont les neurones sensoriels expriment les récepteurs aux phéromones de la famille V1R et une couche basale dont les neurones expriment ceux de la famille V2R (229). Chaque récepteur des 100 à 200 membres de chacune de ces familles n'est exprimé que dans un petit

groupe de neurones, de sorte que chaque neurone sensoriel a une identité unique basée sur le nombre et la nature des récepteurs aux phéromones qu'il exprime.

En réalisant le criblage des gènes exprimés dans l'OVN, ces deux groupes ont pu identifier neuf gènes de CMH de classe I non classique des familles M1 et M10 exclusivement exprimés dans la couche basale de l'OVN et dont les profils d'expression corrèlent pour chacun d'eux à celui d'un groupe de récepteurs V2R donné. La β 2-microglobuline est également exprimée dans ces neurones et la formation d'un complexe multiprotéique M10s, V2R, β 2-microglobuline est nécessaire au transport, à l'adressage et à la stabilisation des récepteurs aux phéromones à la surface des dendrites des neurones sensoriels (223).

Mais l'association des M10s aux V2Rs semble également nécessaire à la détection et à la transmission du signal déclenché par les phéromones et aux modifications comportementales qui en découlent. En effet, des peptides ligands des molécules du CMH sont capables d'induire la dépolarisation membranaire des neurones sensoriels de l'OVN et la formation de potentiels d'action efficaces. La perception de ces peptides du CMH déclenche également des réponses comportementales fortes comme l'effet Bruce (lorsqu'une femelle récemment inséminée est exposée à un mâle différent de celui avec lequel elle s'est accouplée, à son urine ou dans ce cas aux peptides du CMH qui en sont extraits, la grossesse en cours est alors interrompue) (230-232). Enfin, des souris mâles déficients pour l'expression de la β 2-microglobuline présentent un défaut d'agressivité lors de l'intrusion d'un mâle étranger dans leur habitat (223). La β 2-microglobuline étant largement exprimée dans le cerveau et les tissus périphériques, l'origine exacte de cette altération comportementale ne peut être affirmée mais elle correspond à ce qui pourrait être attendu d'un défaut de perception des phéromones par les V2Rs.

IV. CONCLUSION

L'étude des rôles et fonctions des molécules de CMH de classe I a traditionnellement été menée dans le système immunitaire, puisque les molécules de CMH I font partie intégrante des protéines « immunes » indispensables au déclenchement et au développement des réactions immunitaires. Mais contrairement au dogme affirmant leur absence d'expression dans le système nerveux central, les molécules de CMH de classe I sont également impliquées dans des processus cellulaires centraux en dehors de leurs fonctions immunes.

De nombreuses questions restent néanmoins en suspens quant à la nature de leur rôle dans le SNC : les molécules de CMH de classe I sont-elles des molécules de signalisation au sein du système nerveux ou exercent-elles plutôt un rôle structural de stabilisation des synapses ?

La découverte de nouvelles fonctions du CMH dans le SNC a ouvert un large champ d'investigation pour comprendre les multiples fonctions de ces molécules, non limitées au système immunitaire.

EXPLORATION
DES RÔLES IMMUNO-MODULATEURS DE MECP2
ET DE SON TRANSFERT INTERCELLULAIRE



RÉSULTATS

PARTIE I



EXPLORATION DES RÔLES IMMUNO-MODULATEURS DE MECP2

CONTEXTE ET HYPOTHÈSE DE TRAVAIL

L'annonce en 1999, par l'équipe du D^r Huda Zoghbi, de la découverte de l'origine génétique du syndrome de Rett a nourri de nombreux espoirs quant à la meilleure compréhension de cette pathologie et au développement de thérapies curatives. Mais malgré l'identification des mutations du gène *MECP2*, les mécanismes moléculaires responsables de ce syndrome et de son large panel symptomatologique restent inconnus. Il semble néanmoins que cette pathologie soit la conséquence de l'expression incontrôlée de gènes normalement réprimés par MeCP2 dans les neurones matures. Au regard des analyses du transcriptome et du protéome des patientes RTT, il est clair aujourd'hui que ces altérations d'expression génique ne sont ni globales, ni de grande amplitude mais affectent des mécanismes précis et subtils. La découverte des gènes cibles de MeCP2 est donc un objectif majeur des travaux de recherche visant à comprendre la physiopathologie du syndrome de Rett.

L'objectif de ces travaux de thèse a été d'explorer l'hypothèse selon laquelle les gènes codant pour les molécules du CMH de classe I pourraient être des gènes contrôlés par MeCP2 au sein du système nerveux central. Les molécules du CMH I sont en effet impliquées dans l'établissement de connexions neuronales fines, indispensables au bon déroulement de la synaptogenèse, et dans la plasticité ou la fonctionnalité synaptiques. Après une expression transitoire au cours du développement, ces gènes, qui sont très riches en îlots CpG, sont activement réprimés au sein des neurones matures selon un profil spatio-temporel miroir de celui de MeCP2. Certaines molécules de CMH de classe I non classiques sont, elles, indispensables au transport et à l'expression en surface cellulaire des récepteurs aux phéromones au sein des neurones sensitifs de l'organe voméro-nasal des rongeurs. Les peptides ligands des molécules de classe I sont également capables de déclencher des signaux électriques au sein de ces mêmes neurones.

À la lumière de ces observations, les gènes du CMH de classe I nous sont donc apparus comme des cibles potentielles de MeCP2 et nous avons envisagé qu'en absence de MeCP2, une dérégulation des gènes du CMH pourrait perturber l'établissement et le remodelage des connexions synaptiques, altérer le statut immunologique des tissus nerveux et ainsi contribuer à la progression de la pathologie qui se développe chez les patientes atteintes du syndrome de Rett.

À la suite de travaux préliminaires encourageants, nous avons également entrepris de caractériser le système immunitaire des souris déficientes pour *Mecp2*. En effet, le CMH de classe I est indispensable au développement et à l'activation du système immunitaire et une altération de son expression en périphérie pourrait perturber l'intégrité et la fonctionnalité des cellules lymphoïdes. Puisque système nerveux et système immunitaire partagent l'expression de nombreuses molécules, ligands, récepteurs, et de nombreux mécanismes moléculaires, nous avons envisagé que MeCP2 pourrait réguler l'expression du CMH de classe I non seulement au sein du système nerveux central mais également en périphérie.

MANUSCRIT I – EN RÉVISION



High levels of MeCP2 depress MHC class I molecules expression in neuronal cells

Julie MIRALVÈS¹, Eddy MAGDELEINE¹, Lara KADDOUM¹, Hélène BRUN²,
Sophie PÉRIES¹, Denis HUDRISIER¹, Brian HENDRICH³ and Etienne JOLY¹

1. IPBS, CNRS, Toulouse, France

2. CPTP, INSERM, Toulouse, France

3. Institute for Stem Cells Research, University of Edinburgh, Scotland, UK

MANUSCRIT I – SYNTHÈSE DES RÉSULTATS

1. La surexpression transitoire de MeCP2 réduit le niveau d'expression basal des molécules de CMH de classe I.

Afin d'explorer l'hypothèse d'une répression de l'expression des molécules de CMH de classe I par MeCP2 au sein du système nerveux central, nous avons réalisé des expériences de transfections transitoires de la lignée neuronale murine N2A par des vecteurs d'expression des formes humaines et murines de MeCP2. Les niveaux d'expression respectifs des molécules de CMH et de MeCP2 ont été alors évalués par cytométrie en flux. Nous avons ainsi pu mettre en évidence que la surexpression transitoire de MeCP2 dans ce type cellulaire induit une diminution du niveau d'expression en surface cellulaire des molécules de CMH de classe I et de la β 2-microglobuline. Cet effet est spécifique à ces molécules, puisque, en contrôle, le niveau d'expression du récepteur à la transferrine n'est pas affecté par la surexpression de MeCP2.

Quelle que soit l'isoforme, A ou B, la surexpression de MeCP2 provoque une réduction d'approximativement 35 à 40 % du niveau d'expression de chacune des molécules de CMH I (K^k , L^d , D^d) et de la β 2-microglobuline, dans les cellules neuronales N2A mais aussi dans la lignée fibroblastique NIH 3T3. Au cours de ces expériences, nous avons également observé une corrélation entre effet répresseur et niveau d'expression de MeCP2 dans les cellules transfectées. MeCP2 nécessite donc d'être exprimée à des niveaux élevés pour exercer son action sur les molécules de CMH de classe I.

2. La surexpression transitoire de MeCP2 bloque l'induction des molécules de CMH de classe I par l'IFN- γ .

Ces premiers résultats étant en faveur de l'hypothèse d'un rôle répresseur de MeCP2 sur l'expression des molécules de CMH I, nous avons voulu évaluer sa capacité à interférer avec des activateurs de l'expression des molécules de classe I et en particulier avec l'IFN- γ . Pour cela, nous avons renouvelé ces mêmes expériences de transfections transitoires mais, cette fois-ci, traitées ou non pendant 48h par de l'IFN- γ . Alors qu'un tel traitement résulte en une augmentation du niveau d'expression des molécules de CMH de classe I et de la β 2-microglobuline d'un facteur 2 à 4 dans des cellules non transfectées, la surexpression transitoire de MeCP2 diminue voire bloque l'inductibilité de ces molécules par l'IFN- γ .

3. Des formes mutées de MeCP2, responsables de syndromes de Rett, conservent un effet répresseur sur les molécules de CMH de classe I.

Dans le même objectif d'évaluation de la relevance physiopathologique de l'action répressive de MeCP2 sur les molécules de CMH de classe I, nous avons généré des formes mutées de MeCP2 identifiées chez des patientes atteintes du syndrome de Rett (R133C, T158M, R306C et R308* pour chaque isoforme). Nous avons

alors testé leur action sur l'expression des molécules du CMH de classe I selon les mêmes protocoles de transfection et d'analyse par cytométrie en flux que ceux utilisés précédemment pour les formes sauvages. La surexpression transitoire des formes mutées de MeCP2 résulte, dans les cellules N2A, en la diminution spécifique du niveau d'expression des molécules de CMH de classe I en surface cellulaire. Ces mutations ne sont donc pas suffisantes pour abroger l'effet de la surexpression de MeCP2 sur les molécules de CMH de classe I.

4. L'expression du CMH de classe I est peu modifiée dans les cerveaux adultes de souris MeCP2-KO et inchangée dans les neurones issus de nouveau-nés.

Ces études menées *in vitro* supportent en partie notre hypothèse initiale d'un contrôle des gènes de CMH de classe I et de la β 2-microglobuline par MeCP2. Nous avons alors souhaité tester la relevance physiopathologique d'un tel contrôle dans le cadre du syndrome de Rett en évaluant le niveau d'expression des molécules de CMH I dans le modèle murin MeCP2^{tm1.1Bird}.

Des approches d'immunohistochimie sur des coupes en congélation de cerveaux de souris sauvages et MeCP2^{-y} adultes nous ont permis de détecter l'expression globale des molécules de CMH de classe I dans les structures centrales de ces animaux. Les résultats ainsi obtenus révèlent une légère augmentation du niveau d'expression des molécules de CMH de classe I dans certaines régions cérébrales des souris MeCP2^{-y} en comparaison des niveaux sauvages. Mais cette variation est perceptible uniquement lors de l'utilisation d'une méthode très sensible, l'EnVision (Dako), qui a pour caractéristique d'amplifier plus de mille fois le signal HRP classique.

Afin de quantifier cette légère différence de niveau d'expression et d'en identifier la sous-population responsable (neurones, astrocytes, cellules gliales), nous avons établi des cultures gliales mixtes de portées de 2 jours issues d'accouplements entre femelles MeCP2^{+/-} et mâles sauvages. Ces portées, génotypées *a posteriori*, étaient donc constituées de mâles et femelles sauvages, de femelles MeCP2^{+/-} et de mâles MeCP2^{-y}. Après deux jours *in vitro*, ces cultures gliales mixtes sont traitées ou non pendant 48h par de l'IFN- γ et analysées par cytométrie en flux pour l'expression des molécules de CMH de classe I. Les neurones sont identifiés par l'expression spécifique de la β -III-tubuline ; les astrocytes par leurs caractéristiques de taille et granulosité. Aucune différence de niveau d'expression des molécules de CMH de classe I, basale ou inductible, n'est détectable pour un type cellulaire donné entre cultures de génotypes différents.

EXPLORATION DU SYSTÈME IMMUNITAIRE DES SOURIS MeCP2-KO



Observations Préliminaires

CONTEXTE

À la suite de résultats encourageants concernant la régulation des molécules de CMH de classe I par MeCP2 dans le lignage neuronal, nous avons souhaité évaluer ses capacités à exercer des fonctions immuno-modulatrices en dehors du système nerveux central.

Des données de la littérature abondaient également dans le sens d'une action probable de MeCP2 dans le système immunitaire. En effet, MeCP2 interfère avec l'activité de gènes impliqués dans le développement des lymphocytes T, leur spécification de lignage ou leur différenciation. Par exemple, MeCP2 s'associe aux promoteurs des gènes ID (233) ou au facteur transcriptionnel PU.1, par liaison protéine-protéine, et oriente son activité vers une action répressive en recrutant le complexe mSin3A-HDAC1 (234). Les facteurs Id et PU.1 appartiennent tous deux à un groupe de facteurs de transcription essentiels pour orienter le choix de lignage des précurseurs multi-potents entre lignages T/B et lignages NK/DC/cellules myéloïdes, et dont les niveaux d'expression doivent être régulés de façon précise et dynamique à chaque étape du développement lymphocytaire (235-237). MeCP2 a aussi été localisée au promoteur du gène codant pour l'IFN- γ dont elle inhibe l'expression en recrutant le co-répresseur mSin3A. Au cours de la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ activés vers un profil Th1, T-bet provoque l'activation du gène de l'IFN- γ en dissociant le complexe mSin3A/MeCP2 (238).

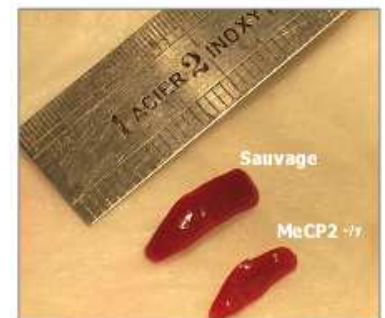
Des observations réalisées chez les patientes souffrant du syndrome de Rett corroborent également l'hypothèse de fonctions immuno-modulatrices de MeCP2. Les familles des patientes rapportent notamment que les signes pathologiques initiaux, correspondant au déclenchement clinique du syndrome, apparaissent souvent à la suite d'un épisode infectieux ou inflammatoire. Par ailleurs, les populations lymphocytaires périphériques de patientes RTT présentent un pourcentage réduit de lymphocytes T CD8⁺ – résultant en une augmentation du ratio CD4⁺/CD8⁺ – et une diminution de la proportion des cellules *Natural-Killer* (239). Enfin, l'expression de la forme mutée de MeCP2 induit un désavantage de croissance aux clones T issus de patientes RTT (54).

Aux vues de ces différentes données et de nos premières expériences *in vitro*, nous avons décidé d'explorer le système immunitaire des souris MeCP2-KO afin de déterminer si MeCP2 joue un rôle immuno-modulateur en périphérie. Je vous présenterai ici des observations préliminaires.

OBSERVATIONS

1. Les souris déficientes en *Mecp2* montrent une diminution importante de la taille de leurs organes lymphoïdes.

Notre première observation frappante au cours de l'exploration du système immunitaire des souris MeCP2^{tm1.1Bird} fut de constater la réduction significative de taille de la rate et du thymus des mâles MeCP2^{-/-} en comparaison de ceux de leurs frères sauvages. Nous avons pu réitérer cette observation chez cinq couples de frères sauvages et *knock-out* mais les différences d'âges ou de scores cliniques entre fratries ne nous ont pas permis d'obtenir suffisamment d'animaux par groupe pour mener des études statistiques sur ces résultats. L'involution des ganglions lymphatiques est également si marquée qu'il nous fut impossible de réaliser des analyses par cytométrie en flux de ces tissus. Cette réduction de taille des organes lymphoïdes semble corrélée avec l'aggravation de la symptomatologie de ces animaux.



Rates de 10 semaines

2. La population thymique double positive (CD4⁺CD8⁺) des souris déficientes en *Mecp2* disparaît en corrélation avec l'aggravation de la pathologie.

Nous avons utilisé une approche classique d'analyse par cytométrie en flux des populations thymiques et spléniques des souris MeCP2^{-/-} (Figure 1). L'expression spécifique en surface cellulaire de marqueurs de lignage, de différenciation et d'activation permet de discerner les différentes sous-populations lymphoïdes. Nous avons ainsi observé une disparition des thymocytes double-positifs (CD4⁺CD8⁺) dans les souris MeCP2^{-/-} qui s'amplifie avec la progression de la maladie, et dans certains cas l'expression aberrante de marqueurs de différenciation ou d'activation sur les thymocytes MeCP2^{-/-}. Ce phénotype est probablement spécifique à la perte de MeCP2 puisque l'analyse d'un mâle MBD2^{-/-}, membre de la famille des *methyl-CpG-binding protein* et impliqué dans la génération du *pool* de lymphocytes T CD8⁺ mémoires, ne révèle aucune altération thymique. Le double mutant MBD2^{-/-}MeCP2^{-/-} que nous avons pu tester présente un phénotype similaire à celui observé pour les souris MeCP2^{-/-}.

3. La délétion de *Mecp2* s'accompagne d'altérations de l'architecture splénique.

Nous avons réalisé des études d'immunohistochimie sur des coupes de rates issues de souris sauvages ou MeCP2^{-ly} (Figure 2). Les rates des souris MeCP2^{-ly} semblent être altérées : les populations lymphoïdes sont compactées au sein de pulpes blanches dont les limites entre sous-compartiments sont diffuses et les contours crénelés, traduisant une désorganisation de l'architecture interne des pulpes blanches MeCP2^{-ly}.

4. Le phénotype immun lié au déficit de *Mecp2* est récessif.

L'analyse phénotypique de souris femelles MeCP2^{+/-} n'a abouti à la découverte d'aucune anomalie du compartiment immun chez ces souris, quels que soient leur âge ou leur symptomatologie.

POURSUITE DES TRAVAUX

L'exploration plus en avant de ces observations préliminaires a fait l'objet du sujet de stage de deux étudiantes ; Sophie Pèries en M1 et Florence Deknuydt en M2R. Florence a pu confirmer la diminution de taille des organes lymphoïdes, la disparition progressive des thymocytes double-positifs et la corrélation de ces anomalies immunes avec le stade de la pathologie. Elle entreprend actuellement des approches de chimères hématopoïétiques entre mâles déficients en *Mecp2* et mâles sauvages afin de discerner les responsabilités respectives de l'influence environnementale et des caractères intrinsèques du compartiment lymphoïde sur la disparition des populations thymiques double-positives chez les souris MeCP2-KO.

PARTIE I



EXPLORATION DES RÔLES
IMMUNO-MODULATEURS DE MECP2



DISCUSSION

DISCUSSION

Au cours de la première partie de ces travaux *in vitro*, nous avons pu mettre en évidence que l'expression à des niveaux élevés de MeCP2 résulte en une diminution d'expression de la $\beta 2$ -microglobuline et des molécules de CMH de classe I en surface cellulaire et en un blocage de leur induction par l'IFN- γ . Des degrés d'inhibition équivalents étant mesurés pour chaque molécule de CMH, ces observations suggèrent que MeCP2 provoque cet effet répresseur par un mécanisme global et indirect. Il est en effet peu probable que MeCP2 puisse se lier à chacun des promoteurs du locus du CMH – qui n'ont pas des séquences strictement identiques – et y exercer ses fonctions de répresseur transcriptionnel avec la même efficacité. Bien sûr, MeCP2 pourrait réprimer de façon directe les promoteurs des gènes de la $\beta 2$ -microglobuline, de TAP ou de LMP, indispensables à leur stabilisation et leur adressage, et expliquer ainsi la diminution concomitante de toutes les molécules de classe I. Mais les résultats que nous avons obtenus avec les formes mutées ou tronquées de MeCP2 plaident en faveur d'un mécanisme indirect.

En effet, les mutants des domaines MBD ou TRD testés (T158M, R133C et R306C) conservent leur capacité d'inhibition de l'expression des molécules du CMH I. Ces mutations induisent soit la perte de liaison aux nucléotides CpG méthylés, soit la perte de la capacité de recrutement de facteurs de co-répression. Dans tous les cas, MeCP2 ne peut plus exercer d'action directe de répression transcriptionnelle sur ses promoteurs cibles. La seule propriété conservée dans ces mutants est la capacité de MeCP2 à remanier l'architecture chromatinienne en compactant l'ADN – selon un mécanisme indépendant de sa méthylation – et en organisant des structures tridimensionnelles complexes, notamment des boucles chromatiniennes silencieuses. De telles modifications structurales expliqueraient également la perte d'induction des molécules de classe I par l'IFN- γ dans les cellules surexprimant MeCP2 ; la condensation de l'ADN à ce locus inhibant la liaison des facteurs activateurs sur leurs éléments de réponse. Les résultats obtenus avec la forme tronquée MeCP2-R308*, qui conserve l'effet répresseur sur l'expression des molécules de classe I, indiquent par ailleurs que l'extrémité C-terminale de la protéine n'est pas nécessaire à son action sur le CMH. Cette portion de la protéine est requise pour la compaction maximale de la chromatine mais n'intervient pas dans les premières étapes de condensation et de conformation en hampe de l'ADN par MeCP2 (118, 119). MeCP2 exercerait donc un rôle structural au locus du CMH en induisant un changement conformationnel de l'ADN plutôt qu'un rôle de facteur de répression transcriptionnel.

Si de tels mutants nous ont dévoilé des pistes quant au mécanisme par lequel MeCP2 pourrait réguler le niveau d'expression des molécules de CMH de classe I, le maintien de leur capacité répressive exclut de fait toute implication d'une dérégulation des molécules de CMH dans les mécanismes physiopathologiques du syndrome de Rett. De même, les neurones issus de nouveau-nés déficients pour *Mecp2* ne présentent aucune augmentation détectable du niveau basal ou inductible des molécules de CMH de classe I en comparaison de leur contrepartie sauvage. Néanmoins, il est probable que le niveau d'expression de MeCP2 dans ces cellules immatures est insuffisant pour agir sur le CMH et par conséquent pour induire une différence entre cellules

sauvages et déficientes. Nos travaux *in vitro* ont en effet clairement montré que MeCP2 doit être exprimée à des niveaux élevés pour réprimer le CMH, niveaux qui n'ont pu être détectés dans les cultures gliales mixtes. De plus, le profil d'expression de MeCP2 *in vivo* suit les étapes de la différenciation neuronale pour atteindre un maximum dans les neurones matures (71, 72). Ces observations écartent donc l'hypothèse d'une implication de MeCP2 dans les mécanismes de régulation de l'expression du CMH pendant les étapes développementales précoces, étapes au cours desquelles les molécules de CMH de classe I participent à l'établissement des connexions neuronales fines.

Notre hypothèse de travail initiale était que les gènes du CMH de classe I pouvaient constituer des cibles potentielles de MeCP2 et, qu'en absence d'une régulation adéquate par cette protéine, ils pourraient participer à la pathogenèse du syndrome de Rett en perturbant l'établissement et le remodelage des connexions synaptiques et en altérant le statut immunologique des tissus nerveux. Si nos résultats excluent un rôle de MeCP2 dans le contrôle de l'expression du CMH au cours de la synaptogenèse, ils n'éliminent cependant pas la possibilité d'une participation de MeCP2 dans le maintien de l'extinction des gènes du CMH dans les neurones matures.

Nos études d'immunohistochimie, menées sur les cerveaux adultes de souris sauvages et déficientes pour *Mecp2*, ont révélé une légère augmentation du niveau d'expression des molécules de CMH de classe I dans les cerveaux mutants. Cette observation est en accord avec des analyses *post mortem* du transcriptome de cerveaux de patientes RTT montrant une augmentation significative du niveau d'expression des molécules HLA-A chez ces patientes (128). Ainsi, par ses propriétés structurales, MeCP2 pourrait contribuer à la répression des gènes du CMH de classe I dans les neurones matures. L'organisation d'une conformation condensée de l'ADN au *locus* du CMH par MeCP2 pourrait être un mécanisme efficace de maintien à long terme de la répression de ces molécules et pourrait également expliquer la perte d'inductibilité des molécules de classe I par l'IFN- γ dans les neurones matures. L'hypothèse de propriétés immuno-modulatrices de MeCP2 au sein du système nerveux central n'est donc pas à exclure.

Cette hypothèse est d'ailleurs renforcée par l'exploration, à ce jour préliminaire, du système immunitaire des souris déficientes pour *Mecp2* qui laisse présager un rôle immuno-modulateur de MeCP2 en périphérie. Nous avons pu constater une diminution globale de taille des organes lymphoïdes de ces animaux, une involution marquée de la population thymique immature double-positif (CD4⁺CD8⁺) et une altération de l'architecture splénique. L'ensemble de ces traits, spécifiques au défaut de MeCP2, s'aggravent en corrélation avec l'évolution de la maladie. Au regard de la perte quantitativement importante des thymocytes immatures double-positifs, précurseurs des populations lymphocytaires T CD4⁺ ou CD8⁺, une incertitude demeure quant à la qualité du répertoire de lymphocytes T générés et quant à leur fonctionnalité. De même, la désorganisation cellulaire au sein de la rate et la perte de colonisation des ganglions lymphatiques par les populations lymphoïdes ouvrent de nombreuses interrogations quant à la sécrétion au sein des organes lymphoïdes des cytokines nécessaires au recrutement des lymphocytes et à leur organisation par territoires au sein de ces structures. Le système immunitaire de ces animaux pourra-t-il élaborer des réponses adaptées et efficaces face à un pathogène ? Enfin, des observations menées sur des patientes affectées du syndrome de Rett soutiennent également la possibilité de fonctions immunes exercées par MeCP2. En effet, ces petites filles présentent un déficit de leurs populations lymphocytaires CD8⁺ et *Natural-Killer* périphériques et souffrent d'infections respiratoires récurrentes (239).

Différentes hypothèses s'offrent à nous aujourd'hui pour expliquer l'origine de telles altérations du système immunitaire lors du déficit de MeCP2 : un défaut intrinsèque aux populations lymphoïdes, une influence

négative de l'environnement hormonal sur ces populations ou encore un déficit du contrôle homéostatique du système immunitaire par le système nerveux central.

- MeCP2 pourrait en effet exercer une fonction intrinsèque aux populations hématopoïétiques. Au cours de leur développement, les lymphocytes T en différenciation sont guidés par un groupe complexe de facteurs de transcription qui agissent de façon coordonnée et répétée pour orienter leur spécification de lignage, leur différenciation et leur maturation (235, 236). Un élément critique de la différenciation des lymphocytes T est le contrôle dynamique du niveau d'expression de tels facteurs de transcriptions à chaque étape de différenciation. Or, MeCP2 est impliquée dans ces contrôles. Par exemple, MeCP2 interfère avec les activités des facteurs Id et PU.1 qui participent tous deux au choix de lignage des précurseurs multipotents entre lignées T/B ou NK/DC/cellules myéloïdes (233, 234). MeCP2 participe aussi à l'extinction basale de l'expression du gène de l'IFN- γ en se liant à son promoteur et en recrutant le corépresseur mSin3a. Au cours de la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ en lymphocytes Th1, cette inhibition est levée par T-bet qui dissocie le complexe mSin3a/MeCP2 (238). Le défaut de ces régulations pourrait expliquer une part du phénotype lymphocytaire observé chez les souris déficientes en *Mecp2*.

- Les cellules immunitaires subissent également l'influence de leur environnement, notamment l'influence de l'environnement hormonal, au cours de leur séjour dans le thymus et en périphérie. Or, le déficit en MeCP2 est associé à une rupture de la modulation de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien et des gènes de réponse au stress corticoïde, comme *Sgk* et *Fkbp5* (156, 157). Cette perte de régulation se traduit par une augmentation chronique du niveau sanguin de glucocorticoïdes et en une augmentation de la sensibilité cellulaire aux stéroïdes. Les glucocorticoïdes ont de nombreuses propriétés immunosuppressives, notamment la capacité de provoquer la mort par apoptose des lymphocytes T matures et des thymocytes (240-242). Une expression excessive et incontrôlée des glucocorticoïdes pourrait contribuer à l'altération du développement et du maintien des populations thymiques chez les souris mutantes déficientes en *Mecp2*.

- Enfin, le système nerveux central peut contrôler l'homéostasie et la réactivité du système immunitaire par le biais de la sécrétion d'hormones mais également par l'innervation sympathique et parasympathique des organes lymphoïdes (243). Des dommages causés à ces innervations et aux structures centrales les contrôlant, dont le système limbique et l'hypothalamus, provoquent des altérations du système immunitaire comme diminution des populations lymphocytaires (244, 245) et de leur fonctionnalité (246-248), involution thymique (249, 250), défaut des architectures cellulaires de la rate et des ganglions lymphatiques (251, 252); phénotypes qui recourent parfois celui observé chez les souris déficientes en *Mecp2*. Dans ce cas, l'altération du système immunitaire serait une conséquence indirecte du phénotype neurologique associé au défaut de MeCP2.

Bien sûr, ces explications ne sont pas exclusives et au regard des multiples fonctions exercées par MeCP2, elles se combinent probablement.

Quoi qu'il en soit, élévation du niveau d'expression des molécules de CMH de classe I dans le cerveau adulte et altérations du système immunitaire chez les souris déficientes en *Mecp2* soutiennent l'hypothèse d'une implication de MeCP2 dans des mécanismes d'immuno-modulation centrale et périphérique. La question qui demeure alors est de savoir si une telle fonction peut avoir une influence sur le phénotype et la progression du syndrome de Rett.

Les résultats obtenus avec les mutants que nous avons testés montrent clairement que la répression du CMH de classe I par MeCP2 ne sera pas une fonction perdue dans tous les cas de syndrome de Rett. Pourtant, quelles seraient les conséquences de cette perte chez des petites filles dont les mutations de MeCP2 induisent la perte de ses propriétés architecturales et pour lesquelles le CMH de classe I ne serait plus réprimé à long terme dans le système nerveux central ? L'effet répresseur de MeCP2 sur le CMH de classe I pourrait cependant être récessif, au même titre que son action sur le système immunitaire ; pour confirmer ou infirmer ce point, il faudrait évaluer le niveau d'expression du CMH I dans le cerveau adulte de souris hétérozygotes MeCP2^{+/-}.

L'immunoprivilège central correspond à un panel de mécanismes actifs coordonnés par les neurones et la glie qui régulent l'entrée des cellules immunitaires dans le système nerveux central, contrôlent la détection des antigènes locaux et orientent le type de réponse immunitaire déclenché par les lymphocytes activés (253, 254). Quand ces mécanismes régulateurs sont rendus dysfonctionnels par l'âge, l'exposition à des pathogènes ou la neurodégénérescence, le seuil de déclenchement d'inflammations centrales et les capacités des cellules gliales à orienter une réponse immunitaire appropriée sont altérés. Or, le maintien de l'intégrité, la fonctionnalité et la régénération du système nerveux central sont dépendants de l'initiation de réponses immunitaires neuroprotectives et du contrôle des réponses neuroinflammatoires. L'expression soutenue et inappropriée des molécules de CMH de classe I pourrait perturber les mécanismes régulateurs du statut immunitaire du système nerveux central et même orienter les réponses lymphocytaires vers un volet inflammatoire délétère. De plus, l'exposition continue sur des neurones matures d'antigènes neuronaux du soi pourrait favoriser l'émergence d'une auto-immunité centrale. À terme, la susceptibilité à la neuroinflammation et/ou à l'auto-immunité chez ces patientes pourrait aggraver le phénotype et accélérer la progression de la pathologie en associant aux désordres neurologiques fonctionnels une neuro-dégénérescence.

Enfin, système immunitaire et système nerveux central interagissent activement et modulent de façon réciproque leur homéostasie et leurs fonctions. Si le système nerveux régule le système immunitaire par la production d'hormones, de cytokines et par l'innervation (para-)sympathique, le système immunitaire en retour peut initier *via* la production de cytokines des réponses neuronales comme la fièvre, le sommeil et le comportement alimentaire (255). De plus, les cellules immunitaires produisent des facteurs neurotrophiques et sont nécessaires aux mécanismes de neurogenèse, d'apprentissage et de mémorisation dans le cerveau adulte (256, 257). Bien que chez les souris mutantes le phénotype immunitaire associé à la délétion de *Mecp2* semble récessif, les petites filles affectées du syndrome de Rett présentent les signes d'un système immunitaire altéré. Il est donc concevable que le phénotype observé chez les souris mâles MeCP2^{-/-} soit la conséquence de la perte des fonctions de MeCP2 intrinsèques au compartiment lymphoïde, compensée chez les femelles hétérozygotes par un probable avantage prolifératif et de survie des cellules immunes exprimant le chromosome X porteur de l'allèle sauvage de MeCP2, et que le phénotype observé chez les patientes souffrant de RTT soit une conséquence à plus long terme de l'influence de l'environnement corticoïde et/ou d'une altération de la régulation neuronale des populations lymphocytaires. Ainsi dans le cadre du syndrome de Rett, les altérations de chacun de ces deux systèmes pourraient s'amplifier mutuellement.

Chez ces enfants, un système immunitaire incompétent, quelle qu'en soit l'origine, pourrait non seulement compromettre les processus de régénération neuronale mais induire une susceptibilité accrue aux infections et une inflammation systémique chronique en ne développant pas de réponses adaptées. Dans le cas de pathologies neuro-dégénératives à volet neuro-inflammatoire, comme la sclérose en plaque ou la maladie

d'Alzheimer, les infections systémiques exacerbent l'inflammation du système nerveux central et aggravent les désordres neurologiques (258). Les signaux inflammatoires, notamment les cytokines, générés en périphérie par une infection ou une blessure vont amplifier la réponse des macrophages résidents du système nerveux central et de la microglie déjà activés par la pathologie neuronale. Qu'en est-il dans le cadre du syndrome de Rett qui n'est pas une maladie neuro-dégénérative ? Des infections chroniques et des réponses immunitaires adaptatives déficientes pourraient-elles influencer la progression de la pathologie ? Si la microglie n'est pas activée dans le RTT, les mécanismes régulateurs du statut immunitaire du système nerveux central, impliquant une coordination entre glie et neurones, pourraient être compromis en raison des désordres neurologiques associés à la pathologie et le seuil de déclenchement d'une réponse neuro-inflammatoire pourrait être abaissé. Des réponses immunitaires inefficaces, des infections systémiques mal contrôlées, des défauts de communication entre systèmes pourraient-ils provoquer des épisodes neuro-inflammatoires chez les patientes atteintes du syndrome de Rett et aggraver ou accélérer la progression de la maladie ?

Il est aujourd'hui clair que de nombreuses protéines partagent leurs fonctions entre systèmes et plus particulièrement entre système nerveux central et système immunitaire. Des facteurs trophiques, des facteurs endocrines, des mécanismes moléculaires de transduction du signal sont utilisés par ces deux systèmes et reflètent des mécanismes cellulaires communs employés pourtant à des fins biologiques distinctes. Ainsi, MeCP2 originellement définie par ses fonctions spécifiques au système nerveux semble également exercer une activité biologique au sein du système immunitaire. Un tel partage moléculaire pourrait dévoiler des pistes quant aux processus de développement, aux mécanismes fonctionnels et physiopathologiques suivis par chacun de ces systèmes, la compréhension de l'un éclairant la connaissance de l'autre.

PARTIE II



EXPLORATION DU TRANSFERT INTERCELLULAIRE DE MECP2

CONTEXTE ET OBJECTIF

Dans le cadre de nos travaux sur la régulation de l'expression du CMH de classe I par MeCP2, nous avons utilisé une batterie de vecteurs d'expression codant pour différentes formes de MeCP2 et introduit dans certains d'entre eux des mutations ponctuelles identiques à celles identifiées chez les patientes atteintes du syndrome de Rett. Suite à ces modifications de séquence, nous avons souhaité vérifier l'expression et la localisation des protéines mutées par immunofluorescence. Nous avons alors remarqué un profil d'expression très particulier. Les cellules transfectées exprimant la protéine sauvage ou mutée à des niveaux élevés étaient très fréquemment entourées d'une couronne de cellules l'exprimant à des niveaux plus faibles. Ces niveaux d'expression semblaient d'autant plus se réduire que les cellules de ce halo étaient éloignées de la cellule centrale exprimant fortement le transgène ; mimant ainsi le profil d'un gradient d'expression. Nous nous sommes alors interrogés sur la capacité de MeCP2 à induire l'expression de *Mecp2* endogène dans les cellules voisines lorsqu'elle est surexprimée, mais ce type de profil est également observé lors de l'utilisation d'un anticorps dirigé contre l'étiquette myc de la protéine transfectée. Cette observation évoquait donc la possibilité d'un transfert de MeCP2 entre cellules voisines. Ce phénomène nous a particulièrement surpris et intrigués puisque MeCP2 est un facteur de transcription, localisé au noyau. Ce type de passage intercellulaire de facteur de transcription, plutôt non conventionnel, a néanmoins déjà été décrit, pour la protéine Tat du virus HIV (259, 260), par exemple, et surtout pour un groupe majeur de facteurs de transcription : les homéoprotéines (261, 262).

Les homéoprotéines sont une famille de facteurs de transcription caractérisée par un domaine de liaison à l'ADN conservé, l'homéodomaine, constitué de trois hélices α (263). Ces protéines régulent des étapes clés du développement notamment dans le système nerveux central où elles sont impliquées dans les mécanismes de définition topographique de territoires, dans la spécification de lignage *via* le contrôle de programmes de différenciation ou encore dans le guidage et le ciblage axonal (264). Le mécanisme de transfert intercellulaire des homéoprotéines nécessite une étape de sécrétion et une étape d'internalisation, toutes deux régies par des mécanismes non conventionnels, particulièrement étudiés pour *Engrailed*.

- La sécrétion se produit malgré l'absence de peptide signal et nécessite une séquence de 11 acides aminés localisés dans l'homéodomaine (265). Cette séquence fait partie prenante de la séquence d'export nucléaire, la sécrétion des homéoprotéines nécessitant d'abord leur passage par le noyau (266). Avant la sécrétion, *Engrailed* s'associe à des microdomaines membranaires et des vésicules « caveolae-like », riches en cholestérol et en glycosphingolipides (267). Ce processus est bloqué par la phosphorylation, suggérant qu'il existe des mécanismes de régulation pour contrôler la sécrétion des homéoprotéines (268).
- L'internalisation requiert une séquence de 16 acides aminés, appelée « pénétratine », localisée dans la troisième hélice de l'homéodomaine et dont le tryptophane en position 48 est indispensable à la translocation (261, 263). Le modèle actuel d'internalisation suggère une liaison du peptide à la surface cellulaire par des interactions électrostatiques et la déstabilisation de la bicouche lipidique par

l'incorporation du tryptophane, déstabilisation propice à la formation de micelles inverses (269-272). Les homéoprotéines entières, leur homéodomaine et la pénétratine peuvent tous être internalisés efficacement par des cellules vivantes et gagner cytoplasme et noyau. Les mécanismes de translocation de la protéine entière et du peptide pénétratine pourraient néanmoins ne pas être strictement identiques.

Ces facteurs de transcription ont donc la caractéristique d'être échangés entre cellules adjacentes et de se re-localiser au noyau des cellules qui les intègrent, probablement pour y exercer leur fonction (273). Dans le cas des homéoprotéines, ce mécanisme semble particulièrement relevant et efficace pour la transmission entre cellules des données de localisation topographique.

Ce deuxième volet de mes travaux de thèse a donc eu pour but d'explorer les capacités de transfert intercellulaire de MeCP2 et d'en comprendre les spécificités. MeCP2 pourrait, en plus de ses propriétés de facteurs de transcription, de régulateur d'épissage, d'architecte de la chromatine, être une « protéine messenger » (274), capable de transmettre un signal transcriptionnel entre cellules voisines.

MANUSCRIT II – EN PRÉPARATION



The Rett Syndrome Transcription Factor MeCP2 transfers efficiently between adjacent neuronal cells

Julie MIRALVES¹, Lara KADDOUM¹, Hélène BRUN², and Etienne JOLY¹

1. IPBS, CNRS, Toulouse, France
2. CPTP, INSERM, Toulouse, France

MANUSCRIT II - SYNTHÈSE DES RÉSULTATS

1. Les formes humaines et murines de MeCP2 ont la capacité d'être transférées entre cellules adjacentes.

Au cours de nos travaux nous avons utilisé un panel de vecteurs d'expression codant pour les formes murines MeCP2 α et β , pour la forme humaine MeCP2A et pour les formes humaines MeCP2A et B étiquetées myc. Afin de vérifier la localisation intranucléaire des protéines exprimées par ces plasmides, nous avons réalisé des expériences d'immunofluorescence sur les cellules neuronales murines N2A transfectées par ces différents vecteurs. À l'aide d'anticorps dirigés contre l'extrémité N-terminale de MeCP2 ou dirigés contre l'étiquette C-terminale myc, nous avons pu observer la correcte localisation de la protéine MeCP2 transgénique à l'hétérochromatine des cellules transfectées. Sur l'ensemble de la population, le profil d'expression de MeCP2 mime une expression en gradient : des cellules de fort niveau d'expression étant entourées d'une couronne de cellules à faible expression. Pour tester l'hypothèse d'un transfert intercellulaire de la protéine transgénique, nous avons réalisé des co-cultures entre des cellules transfectées pour les formes de MeCP2 humaines A et B étiquetées myc marquées par le traceur intracellulaire CMTMR et des cellules N2A « naïves ». Par marquage anti-myc en immunofluorescence, nous avons pu constater le transfert de la protéine MeCP2-myc des cellules transfectées vers les cellules adjacentes ne l'exprimant pas. Ce transfert intercellulaire a pu être documenté pour toutes les formes de MeCP2 à notre disposition.

2. Le transfert intercellulaire de MeCP2 est spécifique de l'espèce et du type cellulaire des partenaires en interaction.

Nous avons ensuite réalisé ce même type de co-culture entre des cellules N2A exprimant de façon stable les formes humaines A et B de MeCP2 étiquetées myc, marquées au CMTMR, et un panel de cellules d'espèce et de type cellulaire varié. Nous avons constaté alors que MeCP2 est transmise aux cellules naïves selon un mode espèce- et tissu-spécifique, c'est-à-dire que les transfectants N2A ne donnent de MeCP2 à aucune des lignées humaines testées, à aucune des lignées fibroblastiques de rat ou de souris mais uniquement à des lignées neuronales murines et avec une moindre efficacité à des lignées neuronales de rat.

3. Le transfert intercellulaire de MeCP2 est une propriété neuronale.

Des cellules fibroblastiques de souris, L cells, exprimant de façon stable les formes humaines A et B de MeCP2 étiquetées myc sont incapables de transmettre en co-culture la protéine transgénique aux cellules voisines « naïves », quel que soit leur espèce ou leur type cellulaire.

4. Le transfert intercellulaire de MeCP2 est bloqué par le 18-βGA.

Nous avons testé l'action de différentes drogues – inhibant le remaniement du cytosquelette, le transport et la sécrétion des protéines ou encore les jonctions gap et les flux ioniques (Ca^{2+} , K^+ , Cl^-) – sur l'efficacité du transfert intercellulaire de MeCP2 dans des co-cultures entre transfectants stables et N2A naïves. La seule drogue pour laquelle nous avons observé une inhibition du transfert, à 50 μM , puis un blocage, dès 75 μM , est l'acide 18-βGlycyrrhétinique (18-βGA) inhibiteur du couplage des jonctions gap et des courants ioniques. Les cellules N2A étant dépourvues de connexines, constituant les jonctions gap, son action passe probablement par l'inhibition des flux transmembranaires.

5. Les formes mutées T158M, R133C et R306C de MeCP2, impliquées dans le syndrome de Rett, conservent leur capacité de transfert.

Nous avons généré les formes mutées T158M, R133C et R306C pour les deux isoformes humains de MeCP2 étiquetée myc et testé leur efficacité de passage dans des co-cultures entre transfectants stables N2A les exprimant et N2A naïves. Chacun de ces mutants, identifiés chez des patientes souffrant du syndrome de Rett, conserve ses capacités de transfert entre cellules adjacentes.

6. Des cellules primaires issues de cultures gliales mixtes ont la capacité à internaliser la protéine MeCP2 transmise par les transfectants N2A.

Pour évaluer la pertinence physiologique de ce mécanisme, du moins pour une première approche, nous avons souhaité tester la capacité de cellules primaires à internaliser la protéine transgénique transmise en co-culture. Nous avons donc établi des cultures gliales mixtes à partir de cerveaux de souris nouveau-nés de 2 jours et cultivé ces dernières en présence de cellules N2A marquées au CMTMR exprimant les formes humaines A et B de MeCP2-myc pendant 12 heures. Nous avons pu observer la transmission de MeCP2 aux cellules primaires et sa correcte relocalisation au noyau des cellules l'ayant internalisée.

7. Autres résultats, non présentés.

Récemment, nous avons pu valider le transfert de la protéine entière par des expériences de Western-Blot. Après co-cultures de 12 et 24 heures ou mélanges extemporanés, les cellules réceptrices Epi et les transfectants stables N2A, exprimant les formes MeCP2 A et B étiquetées myc, sont triés sur la base de l'expression de l'haplotype k de la molécule H2-K, exprimée uniquement par les cellules N2A. Les extraits cellulaires des cellules Epi triées sont alors soumis à un immunoblot dirigé contre myc. Nous avons alors pu détecter la présence d'une bande d'approximativement 64 kD, taille de la protéine MeCP2-myc entière, dans les extraits des Epi issues des co-cultures mais pas des mélanges extemporanés, soulignant la nécessité d'une certaine durée en co-culture pour permettre le transfert de MeCP2.

DISCUSSION

Ces travaux nous ont permis de mettre à jour une propriété inédite de MeCP2 : sa capacité à être transférée entre cellules adjacentes. Nous avons montré que MeCP2, quels que soient son espèce et son isoforme, peut être transmise entre cellules adjacentes au sein d'une co-culture *in vitro* et se re-localiser au noyau de la cellule réceptrice. Le suivi de ce processus par des anticorps dirigés soit contre l'extrémité N-terminale de la protéine soit contre son étiquette myc C-terminale - par immunofluorescence ou par immunoblot après tri - indique que la protéine entière est transférée, et non un produit de dégradation. La cinétique très rapide de ce transfert, dès 1 heure de co-culture, écarte par ailleurs l'hypothèse d'un transfert de l'ARN messager codant pour la protéine transgénique. Si le processus de transfert intercellulaire de facteurs de transcription a déjà été décrit pour les homéoprotéines (273), les caractéristiques générales du transfert de MeCP2 semblent néanmoins en différer.

En effet, l'un des traits majeurs du transfert de MeCP2 est la spécificité d'espèce et de type cellulaire ce qui le distingue de celui des homéoprotéines, aspécifique. Nous avons constaté que MeCP2 ne peut être transmise qu'entre cellules de type neuronal et de même espèce. Ce transfert nécessite donc une reconnaissance réciproque des partenaires et des mécanismes de sécrétion et/ou d'internalisation spécifiques du lignage neuronal.

Par ailleurs, des expériences réalisées dans l'équipe par Lara Kaddoum ont pu montrer que MeCP2 purifiée est incapable de franchir seule la membrane plasmique des cellules N2A lorsqu'elle est ajoutée au milieu extracellulaire. Les cellules doivent être préalablement perméabilisées pour que MeCP2 puisse atteindre le noyau des cellules réceptrices. Il semble donc que sur ce point encore, MeCP2 diffère des homéoprotéines qui, elles, possèdent un domaine spécifique ayant la capacité de franchir seul les membranes biologiques.

Plusieurs scénarios sont envisageables quant au mécanisme de transfert de MeCP2 entre cellules mais aux vues de sa spécificité d'espèce et tissulaire, tous sont à débattre.

- Si l'on suppose que le mécanisme de transfert de MeCP2 suit un profil équivalent à celui des homéoprotéines, MeCP2 pourrait être sécrétée dans le milieu extracellulaire par exocytose et être ensuite internalisée par les cellules adjacentes. L'efficacité de transfert de MeCP2 étant particulièrement dépendante de la distance entre cellules, la quantité de MeCP2 libérée dans le milieu n'est sans doute pas élevée. Des protéines ainsi libérées dans le milieu extracellulaire peuvent être internalisées selon trois modes majeurs : par la traversée d'un pore ou canal, par endocytose suite à la liaison à un récepteur et par endocytose suite à l'accumulation à la membrane (MeCP2 étant incapable de franchir les membranes cellulaires seules, l'hypothèse d'une internalisation sur le même mode que la pénétatine, par formation de micelle inverse, est exclue). Il est difficile dans de tels scénarios d'imaginer l'étape permettant la spécificité tissulaire et d'espèce du transfert de MeCP2, notamment dans le cas de co-cultures entre transfectants N2A stables et lignées neuronales humaines. En effet, la protéine MeCP2 exprimée par ces transfectants est la forme humaine, si l'internalisation de MeCP2 nécessitait le passage

d'un canal ou d'un récepteur qui lui soit spécifique, son transfert devrait être d'autant plus efficace vers les cellules humaines.

Dans les neurones, MeCP2 a été localisée dans la fraction post-synaptique ; il est donc tentant d'imaginer que la sécrétion et l'internalisation de MeCP2 puissent se dérouler à la synapse. La libération des vésicules synaptiques étant dépendante des flux calciques, ce mode de libération de MeCP2 pourrait être sensible à l'acide 18-βGlycyrrhétinique (18-βGA) et la formation de synapses nécessitant une reconnaissance préalable entre partenaire, cette voie de transfert pourrait également expliquer la spécificité de passage. Cependant, les cellules N2A que nous avons utilisées dans cette étude ne sont pas différenciées, il est donc peu probable que le réseau d'extensions qu'elles forment au sein de la culture aboutissent à des interactions synaptiques fonctionnelles. Leurs pseudo-synapses pourraient néanmoins en présenter quelques caractéristiques.

- Le transfert de MeCP2 entre cellules neuronales pourrait être assuré par la formation de nanotubes. Les nanotubes sont des extensions membranaires de 50 à 200 nm de diamètre et de longueur pouvant atteindre plusieurs fois le diamètre de la cellule qui les génère. Ils assurent sur de longues distances une continuité membranaire et cytoplasmique entre cellules connectées (275). Ils se forment en quelques minutes et ne sont pas toujours restreints à un couple de cellules : ils peuvent former des réseaux locaux (276). Par le biais de ces nanotubes, les cellules connectées s'échangent des vésicules – issues du système endosomal ou lysosomal – des organelles, des lipides, des protéines à ancre lipidique ou encore de petites molécules solubles (275, 277-279). MeCP2, logée dans des vésicules – à l'instar des homéoprotéines associées aux vésicules caveolae-like – pourrait être ainsi rapidement transportée entre cellules *via* les nanotubes.

Cependant, la formation et le maintien de ces nanotubes, constitués de filaments de microtubule et/ou d'actine (280), sont sensibles à des drogues comme la cytochalasine D ou la latrunculin B qui n'ont pourtant aucun effet apparent en microscopie sur l'efficacité du transfert. D'autre part, ces nanotubes peuvent s'établir entre cellules de type ou d'espèce différents, ils ont par exemple été décrits entre la lignée PC12 murine et la lignée HEK humaine (281), ce qui n'est pas compatible avec la spécificité de transfert observée dans le cas du passage de MeCP2.

- Enfin, MeCP2 pourrait être transmise entre cellules donneuses et réceptrices par des exosomes. Les exosomes sont de petites vésicules membranaires de 50 à 90 nm de diamètre qui correspondent aux vésicules internes des endosomes multi-vésiculaires (MVBs) et sont sécrétées par les cellules lors de la fusion de ces MVBs avec la membrane plasmique (282, 283). Plusieurs mécanismes potentiels d'interaction des exosomes avec les cellules réceptrices ont été décrits : la liaison des exosomes à des récepteurs (284), l'attachement ou la fusion avec la membrane plasmique réceptrice (285) ou l'internalisation par endocytose (286). Dans les neurones, la présence de MVBs dans les axones et les dendrites a été décrite et pourrait constituer un mécanisme d'élimination de produits de dégradation ou de protéines, comme les récepteurs de neurotransmetteurs dans les mécanismes de dépression synaptique (287). De plus, il est envisagé que les exosomes produits par les neurones et les cellules gliales soient internalisés par les neurones voisins puisqu'ils sont impliqués dans la dissémination de la protéine pathogène PrP^{Sc} (288, 289). Enfin, la libération des exosomes par des neurones primaires en culture est stimulée par la dépolarisation membranaire ; ce mécanisme pourrait donc être sensible au 18-βGA qui perturbe les courants Ca²⁺, K⁺ et Cl⁻. Dans l'hypothèse d'un transfert intercellulaire de MeCP2

par les exosomes, la question du mécanisme d'adressage de MeCP2 aux vésicules endosomales et de la spécificité de l'interaction des exosomes aux cellules cibles demeure.

Tous ces mécanismes, non exclusifs, pourraient donc potentiellement et partiellement expliquer le mécanisme de transfert de MeCP2. De nombreux travaux sont encore à entreprendre pour éclairer ce processus, les divers acteurs impliqués et les domaines de la protéine engagés (signal de localisation nucléaire, signal d'export nucléaire...).

Mais le transfert de MeCP2 dans notre modèle s'inscrit dans le cadre « forcé » de l'expression à niveau élevé d'un transgène humain dans un neuroblastome murin et se déroule *in vitro* entre lignées en culture. Même si nous avons pu détecter le transfert de MeCP2 à des cellules primaires, qu'en est-il de ce transfert *in vivo* dans des neurones différenciés et matures, exprimant la protéine MeCP2 endogène ? Cette observation d'un transfert intercellulaire de MeCP2 ne prendra réellement de sens que lorsque sa relevance physiologique pourra être établie *in vivo*.

À ce jour, des données de la littérature laissent à penser que le transfert intercellulaire de MeCP2 peut se dérouler *in vivo*. Dans les cerveaux de femelles hétérozygotes *Mecp2^{+/-}*, deux niveaux d'expression cellulaire de MeCP2 sont attendus : un niveau élevé, MeCP2^{hi}, chez les neurones exprimant l'allèle sauvage et une absence d'expression dans les cellules exprimant l'allèle muté. Pourtant, une étude de quantification topographique de l'expression de MeCP2 dans le cerveau de souris hétérozygotes a mis en évidence que l'expression de MeCP2 n'est pas strictement nulle ou positive dans les structures centrales mais qu'un groupe de cellules expriment MeCP2 à des niveaux intermédiaires et variables. De plus, les cellules déficientes pour l'expression de MeCP2 correspondent à 20 – 39 % des cellules centrales, proportion bien inférieure aux 50 % attendus, et les niveaux d'expression des cellules MeCP2^{hi} des cerveaux hétérozygotes sont toujours plus bas que les niveaux mesurés dans les cellules MeCP2^{hi} des cerveaux sauvages. Les mêmes observations ont été effectuées sur des cerveaux *post-mortem* de patientes affectées du syndrome de Rett. Les auteurs de ces travaux ont expliqué ce phénomène par l'influence négative des neurones exprimant l'allèle muté sur les niveaux d'expression des neurones exprimant l'allèle sauvage (290). À la lumière du mécanisme de transfert intercellulaire de MeCP2, nous pourrions plutôt supposer que les cellules exprimant les niveaux intermédiaires de MeCP2 dans ces cerveaux correspondent à des cellules mutées ayant internalisé après transfert la protéine sauvage exprimée par les neurones voisins qui, en conséquence, voient leur propre niveau d'expression être diminué par effet de dilution. Nous avons également observé qu'après transfert, les niveaux variables de MeCP2 dans les cellules réceptrices n'atteignent jamais les niveaux initiaux élevés des cellules donneuses, ceci expliquerait donc la gamme de niveaux intermédiaires mesurée dans les cerveaux hétérozygotes.

Dans une autre étude, l'évaluation de l'expression de MeCP2 par immunofluorescence a montré que dans des cultures neuronales hippocampiques issues d'embryons de souris MeCP2^{308/x}, le pourcentage de cellules exprimant MeCP2 varie de 61 % à 77 % après 3 jours de culture *in vitro*. De même, dans des co-cultures de ratio 1 : 1 entre neurones issus de mâles sauvages et neurones issus de mâles mutants MeCP2^{308/y}, après 7 jours de culture la population exprimant MeCP2 prédomine (approximativement 67 % des cellules). Ces auteurs ont expliqué ces résultats par un avantage sélectif conféré par l'expression de l'allèle sauvage et/ou une pression contre les cellules exprimant l'allèle muté (291). Encore une fois, nous serions tentés d'interpréter ces résultats au

regard du mécanisme de transfert de MeCP2 qui pourrait très simplement expliquer l'augmentation de la proportion cellulaire exprimant MeCP2 après plusieurs jours de culture.

Ces différents travaux confortent donc l'hypothèse qu'un transfert de la protéine MeCP2 endogène, exprimée sous contrôle de ses propres éléments de régulation, peut avoir lieu entre neurones primaires et dans les structures centrales *in vivo*, soutenant ainsi la possibilité d'une relevance physiologique de ce mécanisme. Mais il serait également intéressant de déterminer la fonction de ce processus. MeCP2 se re-localisant au noyau après son transfert, il semble qu'elle soit apte à exercer ses fonctions de facteurs de transcription ou d'architecte de la chromatine dans les cellules réceptrices. Une variation du niveau d'expression de MeCP2, même faible, étant un élément critique aux conséquences majeures pour le fonctionnement neuronal, le transfert d'une très faible quantité de MeCP2 pourrait suffire pour modifier des régulations ou des programmes génétiques. Mais les cibles précises de MeCP2 étant encore mal connues, il sera difficile de déterminer quels processus cellulaires sont modifiés en réponse à l'internalisation de molécules de MeCP2 supplémentaires. Cependant, MeCP2 est une protéine multi-fonctionnelle et le rôle qu'elle joue au travers de son transfert pourrait s'avérer être tout autre que ceux déjà observés. En effet, au cours de ce processus, MeCP2 pourrait exercer un rôle de messenger ou de molécule de signalisation en interagissant *via* son domaine C-terminal avec des complexes protéiques localisés à la membrane, dans le cytoplasme ou dans les vésicules d'endocytoses des cellules réceptrices.

Enfin, l'étude des fonctions de MeCP2 étant tout particulièrement associée à l'étude de la physiopathologie du syndrome de Rett, il sera intéressant de déterminer qu'elle est l'implication du transfert intercellulaire de MeCP2 dans le syndrome de Rett. Nous avons documenté le transfert efficace de formes mutées de MeCP2 (T158M, R133C et R306C) identifiées chez des patientes souffrant du syndrome de Rett. Ces mutations ponctuelles ne sont donc pas suffisantes pour abroger cette propriété. Ces résultats suggèrent donc que, *in vivo*, les mutants de MeCP2 puissent passer vers des cellules exprimant l'allèle sauvage. Des mutants ainsi transférés pourraient-ils perturber la fonction de la protéine endogène et exercer un rôle de dominant négatif en dissociant les complexes multi-protéiques liés à la protéine sauvage ou en la délogeant de ses cibles chromatiniennes ? De même, le transfert de la forme sauvage pourrait-elle limiter l'action de mutants dans leurs cellules, des mutations inhibant le transfert intercellulaire de MeCP2 pourraient-elles induire un phénotype moins marqué chez les fillettes souffrant de RTT ?

La découverte du transfert intercellulaire de MeCP2 jette un nouveau regard et de nouvelles questions sur la fonction et la complexité de cette protéine. Il sera désormais important de déterminer les mécanismes cellulaires impliqués dans ce processus mais surtout d'en discerner le rôle fonctionnel afin d'en valider la relevance physiologique *in vivo*.

EXPLORATION
DES RÔLES IMMUNO-MODULATEURS DE MECP2
ET DE SON TRANSFERT INTERCELLULAIRE



CONCLUSION GÉNÉRALE

CONCLUSION GÉNÉRALE

Depuis l'identification des mutations de MeCP2 comme étant à l'origine du syndrome de Rett, de nombreux progrès ont été réalisés quant à l'identification de ses fonctions cellulaires. MeCP2 s'est avérée être une protéine multifonctionnelle agissant à de nombreux niveaux de contrôle des programmes génétiques ; elle peut tout autant réguler le niveau transcriptionnel de gènes cibles que leur profil d'épissage, elle participe au maintien du profil de méthylation des gènes après réplication ou organise l'architecture chromatinienne en des conformations « silencieuses ». Cette multifonctionnalité est probablement responsable de l'étendue des symptômes associés au syndrome de Rett et explique en partie les difficultés rencontrées par les chercheurs au cours des travaux d'identification des cibles de MeCP2, indispensable au développement d'outils thérapeutiques appropriés.

Ces travaux de thèse ont été initiés avec l'objectif d'examiner l'hypothèse d'une régulation des gènes du CMH de classe I par MeCP2. Si les résultats obtenus ne sont pas immédiatement relevant dans le syndrome de Rett, ils ont permis de mettre en évidence de nouvelles propriétés de la protéine MeCP2.

D'une part, MeCP2 semble posséder une activité immuno-modulatrice, ou du moins, être impliquée dans le développement et/ou le maintien du système immunitaire. Son rôle dans ce compartiment est probablement récessif, puisque nous n'avons pas pu détecter de déficits chez les souris hétérozygotes MeCP2^{+/-}. Les interactions entre système nerveux central et système immunitaire sont néanmoins particulièrement étroites et indispensables à leur homéostasie et à leurs fonctions respectives. Il est donc légitime de s'interroger sur les conséquences potentielles d'une altération du système immunitaire et de sa réactivité, même mineure, sur le cours d'une pathologie comme le syndrome de Rett. En effet, les infections systémiques, et les réponses immunes qui en découlent, peuvent être à l'origine du déclenchement de crises inflammatoires centrales associées à des pathologies neurodégénératives comme la sclérose en plaque ou la maladie d'Alzheimer. Une réponse immunitaire altérée en périphérie chez des petites filles atteintes du syndrome de Rett pourrait favoriser une sensibilisation du système nerveux central à la neuro-inflammation et à terme accélérer la progression de la maladie en facilitant l'émergence de crises inflammatoires. Si cette hypothèse s'avérait exacte, il serait alors intéressant de traiter les petites filles par des drogues modulant les réponses immunitaires lors d'infections pour contenir la production de molécules pro-inflammatoires potentiellement délétères. Cependant, la frontière entre réponses inflammatoires neuroprotectrices et neurotoxiques est étroite et l'utilisation de telles drogues pourrait, à l'inverse, aggraver la pathologie en limitant les réponses immunes spécifiques au système nerveux, nécessaires à son maintien et à sa régénération. Seule la réalisation d'essais pré-cliniques sur les différentes souches de souris transgéniques MeCP2-KO pourra apporter un éclairage initial sur ce type de questions.

D'autre part, nous avons découvert que MeCP2, à l'image des homéoprotéines, a la capacité d'être transférée entre cellules adjacentes en co-culture. Ce mécanisme, extrêmement rapide, semble posséder une spécificité d'espèce et tissulaire. À ce jour, nous ne pouvons affirmer la pertinence physiologique ou physiopathologique d'un tel phénomène et nous tentons aujourd'hui d'identifier le mécanisme mis en jeu lors de ce transfert. L'une des applications majeures de la découverte du transfert intercellulaire des homéoprotéines sera probablement l'utilisation du domaine impliqué, la pénétratine, ou des domaines de synthèse similaires à des fins de véhicule moléculaire. En effet, ces domaines ayant pour propriété intrinsèque de traverser les membranes plasmiques et nucléaires des cellules, ils constituent des vecteurs de choix pour des molécules thérapeutiques. La découverte d'un tel domaine chez MeCP2 pourrait ouvrir de nouvelles perspectives thérapeutiques tant dans le domaine du syndrome de Rett que dans d'autres pathologies neurologiques. En effet, puisque son transfert est spécifique au lignage neuronal, si l'un de ses domaines était impliqué dans ce processus, il pourrait être utilisé comme vecteur ciblant spécifiquement les neurones. Cependant, nous avons pu constater que MeCP2 seule n'a pas la capacité de traverser les membranes cellulaires. Il semble donc peu probable que MeCP2 possède un domaine identique à celui des homéoprotéines et que son transfert s'effectue sur le même mode. Par contre, dans la perspective d'approches de thérapie cellulaire, l'apport de cellules exprimant fortement MeCP2 et capable de donner cette protéine aux cellules adjacentes pourrait ouvrir de nouvelles perspectives thérapeutiques. Dans ce cas, la dose de MeCP2 délivrée aux cellules cibles serait un élément critique à maîtriser : les neurones étant particulièrement sensibles au niveau protéique de MeCP2, un transfert d'une quantité trop élevée de protéine pourrait être néfaste.

Ces travaux ont donc abouti à la découverte de nouvelles propriétés de MeCP2. De nombreuses études seront néanmoins encore nécessaires pour en connaître la pertinence physiologique et physiopathologique. MeCP2 apparaît donc, encore une fois, comme une protéine complexe, aux multiples fonctions, qui semble exercer son action dans de nombreux processus cellulaires qui peut-être ne sont pas limités au contrôle de l'expression de programme génétique. MeCP2 pourrait-elle aussi être une protéine messagère ?

RÉFÉRENCES



RÉFÉRENCES

1. Rett, A. 1966. [On a unusual brain atrophy syndrome in hyperammonemia in childhood]. *Wien Med Wochenschr* 116:723.
2. Hagberg, B., J. Aicardi, K. Dias, and O. Ramos. 1983. A progressive syndrome of autism, dementia, ataxia, and loss of purposeful hand use in girls: Rett's syndrome: report of 35 cases. *Ann Neurol* 14:471.
3. Amir, R. E., I. B. Van den Veyver, M. Wan, C. Q. Tran, U. Francke, and H. Y. Zoghbi. 1999. Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nat Genet* 23:185.
4. Percy, A. K. 2002. Rett syndrome. Current status and new vistas. *Neurol Clin* 20:1125.
5. Trevathan, E., and S. Naidu. 1988. The clinical recognition and differential diagnosis of Rett syndrome. *J Child Neurol* 3 Suppl:S6.
6. Hagberg, B., F. Hanefeld, A. Percy, and O. Skjeldal. 2002. An update on clinically applicable diagnostic criteria in Rett syndrome. Comments to Rett Syndrome Clinical Criteria Consensus Panel Satellite to European Paediatric Neurology Society Meeting, Baden Baden, Germany, 11 September 2001. *Eur J Paediatr Neurol* 6:293.
7. Burford, B., A. M. Kerr, and H. A. Macleod. 2003. Nurse recognition of early deviation in development in home videos of infants with Rett disorder. *J Intellect Disabil Res* 47:588.
8. Einspieler, C., A. M. Kerr, and H. F. Prechtl. 2005. Abnormal general movements in girls with Rett disorder: the first four months of life. *Brain Dev* 27 Suppl 1:S8.
9. Einspieler, C., A. M. Kerr, and H. F. Prechtl. 2005. Is the early development of girls with Rett disorder really normal? *Pediatr Res* 57:696.
10. Armstrong, D., J. K. Dunn, B. Antalffy, and R. Trivedi. 1995. Selective dendritic alterations in the cortex of Rett syndrome. *J Neuropathol Exp Neurol* 54:195.
11. Subramaniam, B., S. Naidu, and A. L. Reiss. 1997. Neuroanatomy in Rett syndrome: cerebral cortex and posterior fossa. *Neurology* 48:399.
12. Bauman, M. L., T. L. Kemper, and D. M. Arin. 1995. Microscopic observations of the brain in Rett syndrome. *Neuropediatrics* 26:105.
13. Bauman, M. L., T. L. Kemper, and D. M. Arin. 1995. Pervasive neuroanatomic abnormalities of the brain in three cases of Rett's syndrome. *Neurology* 45:1581.
14. Armstrong, D. D. 1992. The neuropathology of the Rett syndrome. *Brain Dev* 14 Suppl:S89.
15. Neul, J. L., and H. Y. Zoghbi. 2004. Rett syndrome: a prototypical neurodevelopmental disorder. *Neuroscientist* 10:118.
16. Zoghbi, H. Y. 2005. MeCP2 dysfunction in humans and mice. *J Child Neurol* 20:736.
17. Martinho, P. S., P. G. Otto, F. Kok, A. Diament, M. J. Marques-Dias, and C. H. Gonzalez. 1990. In search of a genetic basis for the Rett syndrome. *Hum Genet* 86:131.
18. Migeon, B. R., M. A. Dunn, G. Thomas, B. J. Schmeckpeper, and S. Naidu. 1995. Studies of X inactivation and isodisomy in twins provide further evidence that the X chromosome is not involved in Rett syndrome. *Am J Hum Genet* 56:647.

19. Schanen, N. C., E. J. Dahle, F. Capozzoli, V. A. Holm, H. Y. Zoghbi, and U. Francke. 1997. A new Rett syndrome family consistent with X-linked inheritance expands the X chromosome exclusion map. *Am J Hum Genet* 61:634.
20. Sirianni, N., S. Naidu, J. Pereira, R. F. Pillotto, and E. P. Hoffman. 1998. Rett syndrome: confirmation of X-linked dominant inheritance, and localization of the gene to Xq28. *Am J Hum Genet* 63:1552.
21. Amir, R., E. J. Dahle, D. Toriolo, and H. Y. Zoghbi. 2000. Candidate gene analysis in Rett syndrome and the identification of 21 SNPs in Xq. *Am J Med Genet* 90:69.
22. Wan, M., and U. Francke. 1998. Evaluation of two X chromosomal candidate genes for Rett syndrome: glutamate dehydrogenase-2 (GLUD2) and rab GDP-dissociation inhibitor (GDI1). *Am J Med Genet* 78:169.
23. Trappe, R., F. Laccone, J. Cobilanschi, M. Meins, P. Huppke, F. Hanefeld, and W. Engel. 2001. MECP2 mutations in sporadic cases of Rett syndrome are almost exclusively of paternal origin. *Am J Hum Genet* 68:1093.
24. Girard, M., P. Couvert, A. Carrie, M. Tardieu, J. Chelly, C. Beldjord, and T. Bienvenu. 2001. Parental origin of de novo MECP2 mutations in Rett syndrome. *Eur J Hum Genet* 9:231.
25. Shahbazian, M. D., and H. Y. Zoghbi. 2001. Molecular genetics of Rett syndrome and clinical spectrum of MECP2 mutations. *Curr Opin Neurol* 14:171.
26. Wan, M., S. S. Lee, X. Zhang, I. Houwink-Manville, H. R. Song, R. E. Amir, S. Budden, S. Naidu, J. L. Pereira, I. F. Lo, H. Y. Zoghbi, N. C. Schanen, and U. Francke. 1999. Rett syndrome and beyond: recurrent spontaneous and familial MECP2 mutations at CpG hotspots. *Am J Hum Genet* 65:1520.
27. Schanen, C. 2001. Rethinking the fate of males with mutations in the gene that causes Rett syndrome. *Brain Dev* 23 Suppl 1:S144.
28. Villard, L. 2007. MECP2 mutations in males. *J Med Genet*.
29. Schanen, N. C., T. W. Kurczynski, D. Brunelle, M. M. Woodcock, L. S. t. Dure, and A. K. Percy. 1998. Neonatal encephalopathy in two boys in families with recurrent Rett syndrome. *J Child Neurol* 13:229.
30. Kankirawatana, P., H. Leonard, C. Ellaway, J. Scurlock, A. Mansour, C. M. Makris, L. S. t. Dure, M. Friez, J. Lane, C. Kiraly-Borri, V. Fabian, M. Davis, J. Jackson, J. Christodoulou, W. E. Kaufmann, D. Ravine, and A. K. Percy. 2006. Early progressive encephalopathy in boys and MECP2 mutations. *Neurology* 67:164.
31. Lundvall, M., L. Samuelsson, and M. Kyllerman. 2006. Male Rett phenotypes in T158M and R294X MeCP2-mutations. *Neuropediatrics* 37:296.
32. Topcu, M., C. Akyerli, A. Sayi, G. A. Toruner, S. R. Kocoglu, M. Cimbis, and T. Ozcelik. 2002. Somatic mosaicism for a MECP2 mutation associated with classic Rett syndrome in a boy. *Eur J Hum Genet* 10:77.
33. Ravn, K., J. B. Nielsen, P. Uldall, F. J. Hansen, and M. Schwartz. 2003. No correlation between phenotype and genotype in boys with a truncating MECP2 mutation. *J Med Genet* 40:e5.
34. Salomao Schwartzman, J., M. Zatz, L. dos Reis Vasquez, R. Ribeiro Gomes, C. P. Koiffmann, C. Fridman, and P. Guimaraes Otto. 1999. Rett syndrome in a boy with a 47,XXY karyotype. *Am J Hum Genet* 64:1781.
35. Schwartzman, J. S., A. Bernardino, A. Nishimura, R. R. Gomes, and M. Zatz. 2001. Rett syndrome in a boy with a 47,XXY karyotype confirmed by a rare mutation in the MECP2 gene. *Neuropediatrics* 32:162.

36. Orrico, A., C. Lam, L. Galli, M. T. Dotti, G. Hayek, S. F. Tong, P. M. Poon, M. Zappella, A. Federico, and V. Sorrentino. 2000. MECP2 mutation in male patients with non-specific X-linked mental retardation. *FEBS Lett* 481:285.
37. Couvert, P., T. Bienvenu, C. Aquaviva, K. Poirier, C. Moraine, C. Gendrot, A. Verloes, C. Andres, A. C. Le Fevre, I. Souville, J. Steffann, V. des Portes, H. H. Ropers, H. G. Yntema, J. P. Fryns, S. Briault, J. Chelly, and B. Cherif. 2001. MECP2 is highly mutated in X-linked mental retardation. *Hum Mol Genet* 10:941.
38. Xi, C. Y., H. W. Ma, Y. Lu, Y. J. Zhao, T. Y. Hua, Y. Zhao, and Y. H. Ji. 2007. MeCP2 gene mutation analysis in autistic boys with developmental regression. *Psychiatr Genet* 17:113.
39. Archer, H. L., S. D. Whatley, J. C. Evans, D. Ravine, P. Huppke, A. Kerr, D. Bunyan, B. Kerr, E. Sweeney, S. J. Davies, W. Reardon, J. Horn, K. D. MacDermot, R. A. Smith, A. Magee, A. Donaldson, Y. Crow, G. Hermon, Z. Miedzybrodzka, D. N. Cooper, L. Lazarou, R. Butler, J. Sampson, D. T. Pilz, F. Laccone, and A. J. Clarke. 2006. Gross rearrangements of the MECP2 gene are found in both classical and atypical Rett syndrome patients. *J Med Genet* 43:451.
40. Tao, J., H. Van Esch, M. Hagedorn-Greiwe, K. Hoffmann, B. Moser, M. Raynaud, J. Sperner, J. P. Fryns, E. Schwinger, J. Gecz, H. H. Ropers, and V. M. Kalscheuer. 2004. Mutations in the X-linked cyclin-dependent kinase-like 5 (CDKL5/STK9) gene are associated with severe neurodevelopmental retardation. *Am J Hum Genet* 75:1149.
41. Weaving, L. S., J. Christodoulou, S. L. Williamson, K. L. Friend, O. L. McKenzie, H. Archer, J. Evans, A. Clarke, G. J. Pelka, P. P. Tam, C. Watson, H. Lahooti, C. J. Ellaway, B. Bennetts, H. Leonard, and J. Gecz. 2004. Mutations of CDKL5 cause a severe neurodevelopmental disorder with infantile spasms and mental retardation. *Am J Hum Genet* 75:1079.
42. Scala, E., F. Ariani, F. Mari, R. Caselli, C. Pescucci, I. Longo, I. Meloni, D. Giachino, M. Bruttini, G. Hayek, M. Zappella, and A. Renieri. 2005. CDKL5/STK9 is mutated in Rett syndrome variant with infantile spasms. *J Med Genet* 42:103.
43. Evans, J. C., H. L. Archer, J. P. Colley, K. Ravn, J. B. Nielsen, A. Kerr, E. Williams, J. Christodoulou, J. Gecz, P. E. Jardine, M. J. Wright, D. T. Pilz, L. Lazarou, D. N. Cooper, J. R. Sampson, R. Butler, S. D. Whatley, and A. J. Clarke. 2005. Early onset seizures and Rett-like features associated with mutations in CDKL5. *Eur J Hum Genet* 13:1113.
44. Archer, H. L., J. Evans, S. Edwards, J. Colley, R. Newbury-Ecob, F. O'Callaghan, M. Huyton, M. O'Regan, J. Tolmie, J. Sampson, A. Clarke, and J. Osborne. 2006. CDKL5 mutations cause infantile spasms, early onset seizures, and severe mental retardation in female patients. *J Med Genet* 43:729.
45. Archer, H. L., J. C. Evans, D. S. Millar, P. W. Thompson, A. M. Kerr, H. Leonard, J. Christodoulou, D. Ravine, L. Lazarou, L. Grove, C. Verity, S. D. Whatley, D. T. Pilz, J. R. Sampson, and A. J. Clarke. 2006. NTNG1 mutations are a rare cause of Rett syndrome. *Am J Med Genet A* 140:691.
46. Borg, I., K. Freude, S. Kubart, K. Hoffmann, C. Menzel, F. Laccone, H. Firth, M. A. Ferguson-Smith, N. Tommerup, H. H. Ropers, D. Sargan, and V. M. Kalscheuer. 2005. Disruption of Netrin G1 by a balanced chromosome translocation in a girl with Rett syndrome. *Eur J Hum Genet* 13:921.
47. Gibson, J. H., S. L. Williamson, S. Arbuckle, and J. Christodoulou. 2005. X chromosome inactivation patterns in brain in Rett syndrome: implications for the disease phenotype. *Brain Dev* 27:266.
48. Hoffbuhr, K. C., L. M. Moses, M. A. Jerdonek, S. Naidu, and E. P. Hoffman. 2002. Associations between MeCP2 mutations, X-chromosome inactivation, and phenotype. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 8:99.

49. Shahbazian, M. D., Y. Sun, and H. Y. Zoghbi. 2002. Balanced X chromosome inactivation patterns in the Rett syndrome brain. *Am J Med Genet* 111:164.
50. Charman, T., T. C. Neilson, V. Mash, H. Archer, M. T. Gardiner, G. P. Knudsen, A. McDonnell, J. Perry, S. D. Whatley, D. J. Bunyan, K. Ravn, R. H. Mount, R. P. Hastings, M. Hulten, K. H. Orstavik, S. Reilly, H. Cass, A. Clarke, A. M. Kerr, and M. E. Bailey. 2005. Dimensional phenotypic analysis and functional categorisation of mutations reveal novel genotype-phenotype associations in Rett syndrome. *Eur J Hum Genet* 13:1121.
51. Lyon, M. F. 1961. Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). *Nature* 190:372.
52. Ishii, T., Y. Makita, A. Ogawa, S. Amamiya, M. Yamamoto, A. Miyamoto, and J. Oki. 2001. The role of different X-inactivation pattern on the variable clinical phenotype with Rett syndrome. *Brain Dev* 23 Suppl 1:S161.
53. Hoffbuhr, K., J. M. Devaney, B. LaFleur, N. Sirianni, C. Scacheri, J. Giron, J. Schuette, J. Innis, M. Marino, M. Philippart, V. Narayanan, R. Umansky, D. Kronn, E. P. Hoffman, and S. Naidu. 2001. MeCP2 mutations in children with and without the phenotype of Rett syndrome. *Neurology* 56:1486.
54. Balmer, D., J. Arredondo, R. C. Samaco, and J. M. LaSalle. 2002. MECP2 mutations in Rett syndrome adversely affect lymphocyte growth, but do not affect imprinted gene expression in blood or brain. *Hum Genet* 110:545.
55. Zoghbi, H. Y., A. K. Percy, R. J. Schultz, and C. Fill. 1990. Patterns of X chromosome inactivation in the Rett syndrome. *Brain Dev* 12:131.
56. LaSalle, J. M., J. Goldstine, D. Balmer, and C. M. Greco. 2001. Quantitative localization of heterogeneous methyl-CpG-binding protein 2 (MeCP2) expression phenotypes in normal and Rett syndrome brain by laser scanning cytometry. *Hum Mol Genet* 10:1729.
57. Amir, R. E., I. B. Van den Veyver, R. Schultz, D. M. Malicki, C. Q. Tran, E. J. Dahle, A. Philippi, L. Timar, A. K. Percy, K. J. Motil, O. Lichtarge, E. O. Smith, D. G. Glaze, and H. Y. Zoghbi. 2000. Influence of mutation type and X chromosome inactivation on Rett syndrome phenotypes. *Ann Neurol* 47:670.
58. Villard, L., A. Kpebe, C. Cardoso, P. J. Chelly, P. M. Tardieu, and M. Fontes. 2000. Two affected boys in a Rett syndrome family: clinical and molecular findings. *Neurology* 55:1188.
59. Tate, P., W. Skarnes, and A. Bird. 1996. The methyl-CpG binding protein MeCP2 is essential for embryonic development in the mouse. *Nat Genet* 12:205.
60. Chen, R. Z., S. Akbarian, M. Tudor, and R. Jaenisch. 2001. Deficiency of methyl-CpG binding protein-2 in CNS neurons results in a Rett-like phenotype in mice. *Nat Genet* 27:327.
61. Guy, J., B. Hendrich, M. Holmes, J. E. Martin, and A. Bird. 2001. A mouse *Mecp2*-null mutation causes neurological symptoms that mimic Rett syndrome. *Nat Genet* 27:322.
62. Kishi, N., and J. D. Macklis. 2004. MECP2 is progressively expressed in post-migratory neurons and is involved in neuronal maturation rather than cell fate decisions. *Mol Cell Neurosci* 27:306.
63. Pelka, G. J., C. M. Watson, T. Radziewicz, M. Hayward, H. Lahooti, J. Christodoulou, and P. P. Tam. 2006. *Mecp2* deficiency is associated with learning and cognitive deficits and altered gene activity in the hippocampal region of mice. *Brain* 129:887.
64. Gemelli, T., O. Berton, E. D. Nelson, L. I. Perrotti, R. Jaenisch, and L. M. Monteggia. 2006. Postnatal loss of methyl-CpG binding protein 2 in the forebrain is sufficient to mediate behavioral aspects of Rett syndrome in mice. *Biol Psychiatry* 59:468.

65. Shahbazian, M., J. Young, L. Yuva-Paylor, C. Spencer, B. Antalffy, J. Noebels, D. Armstrong, R. Paylor, and H. Zoghbi. 2002. Mice with truncated MeCP2 recapitulate many Rett syndrome features and display hyperacetylation of histone H3. *Neuron* 35:243.
66. Moretti, P., J. A. Bouwknecht, R. Teague, R. Paylor, and H. Y. Zoghbi. 2005. Abnormalities of social interactions and home-cage behavior in a mouse model of Rett syndrome. *Hum Mol Genet* 14:205.
67. Moretti, P., J. M. Levenson, F. Battaglia, R. Atkinson, R. Teague, B. Antalffy, D. Armstrong, O. Arancio, J. D. Sweatt, and H. Y. Zoghbi. 2006. Learning and memory and synaptic plasticity are impaired in a mouse model of Rett syndrome. *J Neurosci* 26:319.
68. Luikenhuis, S., E. Giacometti, C. F. Beard, and R. Jaenisch. 2004. Expression of MeCP2 in postmitotic neurons rescues Rett syndrome in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:6033.
69. Giacometti, E., S. Luikenhuis, C. Beard, and R. Jaenisch. 2007. Partial rescue of MeCP2 deficiency by postnatal activation of MeCP2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:1931.
70. Guy, J., J. Gan, J. Selfridge, S. Cobb, and A. Bird. 2007. Reversal of neurological defects in a mouse model of Rett syndrome. *Science* 315:1143.
71. Shahbazian, M. D., B. Antalffy, D. L. Armstrong, and H. Y. Zoghbi. 2002. Insight into Rett syndrome: MeCP2 levels display tissue- and cell-specific differences and correlate with neuronal maturation. *Hum Mol Genet* 11:115.
72. Jung, B. P., D. G. Jugloff, G. Zhang, R. Logan, S. Brown, and J. H. Eubanks. 2003. The expression of methyl CpG binding factor MeCP2 correlates with cellular differentiation in the developing rat brain and in cultured cells. *J Neurobiol* 55:86.
73. Cohen, D. R., V. Matarazzo, A. M. Palmer, Y. Tu, O. H. Jeon, J. Pevsner, and G. V. Ronnett. 2003. Expression of MeCP2 in olfactory receptor neurons is developmentally regulated and occurs before synaptogenesis. *Mol Cell Neurosci* 22:417.
74. Matarazzo, V., D. Cohen, A. M. Palmer, P. J. Simpson, B. Khokhar, S. J. Pan, and G. V. Ronnett. 2004. The transcriptional repressor *Mecp2* regulates terminal neuronal differentiation. *Mol Cell Neurosci* 27:44.
75. Matarazzo, V., and G. V. Ronnett. 2004. Temporal and regional differences in the olfactory proteome as a consequence of MeCP2 deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:7763.
76. Dani, V. S., Q. Chang, A. Maffei, G. G. Turrigiano, R. Jaenisch, and S. B. Nelson. 2005. Reduced cortical activity due to a shift in the balance between excitation and inhibition in a mouse model of Rett syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:12560.
77. Asaka, Y., D. G. Jugloff, L. Zhang, J. H. Eubanks, and R. M. Fitzsimonds. 2006. Hippocampal synaptic plasticity is impaired in the *Mecp2*-null mouse model of Rett syndrome. *Neurobiol Dis* 21:217.
78. Nelson, E. D., E. T. Kavalali, and L. M. Monteggia. 2006. MeCP2-dependent transcriptional repression regulates excitatory neurotransmission. *Curr Biol* 16:710.
79. Zucker, R. S. 2005. Minis: whence and wherefore? *Neuron* 45:482.
80. McKinney, R. A., M. Capogna, R. Durr, B. H. Gähwiler, and S. M. Thompson. 1999. Miniature synaptic events maintain dendritic spines via AMPA receptor activation. *Nat Neurosci* 2:44.
81. Sutton, M. A., H. T. Ito, P. Cressy, C. Kempf, J. C. Woo, and E. M. Schuman. 2006. Miniature neurotransmission stabilizes synaptic function via tonic suppression of local dendritic protein synthesis. *Cell* 125:785.
82. Cook, D. L., P. C. Schwindt, L. A. Grande, and W. J. Spain. 2003. Synaptic depression in the localization of sound. *Nature* 421:66.

83. Chung, S., X. Li, and S. B. Nelson. 2002. Short-term depression at thalamocortical synapses contributes to rapid adaptation of cortical sensory responses in vivo. *Neuron* 34:437.
84. Stearns, N. A., L. R. Schaevitz, H. Bowling, N. Nag, U. V. Berger, and J. Berger-Sweeney. 2007. Behavioral and anatomical abnormalities in *Mecp2* mutant mice: A model for Rett syndrome. *Neuroscience*.
85. Lewis, J. D., R. R. Meehan, W. J. Henzel, I. Maurer-Fogy, P. Jeppesen, F. Klein, and A. Bird. 1992. Purification, sequence, and cellular localization of a novel chromosomal protein that binds to methylated DNA. *Cell* 69:905.
86. Meehan, R. R., J. D. Lewis, and A. P. Bird. 1992. Characterization of MeCP2, a vertebrate DNA binding protein with affinity for methylated DNA. *Nucleic Acids Res* 20:5085.
87. Quaderi, N. A., R. R. Meehan, P. H. Tate, S. H. Cross, A. P. Bird, A. Chatterjee, G. E. Herman, and S. D. Brown. 1994. Genetic and physical mapping of a gene encoding a methyl CpG binding protein, *Mecp2*, to the mouse X chromosome. *Genomics* 22:648.
88. D'Esposito, M., N. A. Quaderi, A. Ciccodicola, P. Bruni, T. Esposito, M. D'Urso, and S. D. Brown. 1996. Isolation, physical mapping, and northern analysis of the X-linked human gene encoding methyl CpG-binding protein, MECP2. *Mamm Genome* 7:533.
89. Adler, D. A., N. A. Quaderi, S. D. Brown, V. M. Chapman, J. Moore, P. Tate, and C. M. Disteché. 1995. The X-linked methylated DNA binding protein, *Mecp2*, is subject to X inactivation in the mouse. *Mamm Genome* 6:491.
90. Coy, J. F., Z. Sedlacek, D. Bachner, H. Delius, and A. Poustka. 1999. A complex pattern of evolutionary conservation and alternative polyadenylation within the long 3'-untranslated region of the methyl-CpG-binding protein 2 gene (*MeCP2*) suggests a regulatory role in gene expression. *Hum Mol Genet* 8:1253.
91. Reichwald, K., J. Thiesen, T. Wiehe, J. Weitzel, W. A. Poustka, A. Rosenthal, M. Platzner, W. H. Stratling, and P. Kioschis. 2000. Comparative sequence analysis of the MECP2-locus in human and mouse reveals new transcribed regions. *Mamm Genome* 11:182.
92. Mnatzakanian, G. N., H. Lohi, I. Munteanu, S. E. Alfred, T. Yamada, P. J. MacLeod, J. R. Jones, S. W. Scherer, N. C. Schanen, M. J. Friez, J. B. Vincent, and B. A. Minassian. 2004. A previously unidentified MECP2 open reading frame defines a new protein isoform relevant to Rett syndrome. *Nat Genet* 36:339.
93. Kriaucionis, S., and A. Bird. 2004. The major form of MeCP2 has a novel N-terminus generated by alternative splicing. *Nucleic Acids Res* 32:1818.
94. Hendrich, B., and A. Bird. 1998. Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. *Mol Cell Biol* 18:6538.
95. Nan, X., R. R. Meehan, and A. Bird. 1993. Dissection of the methyl-CpG binding domain from the chromosomal protein MeCP2. *Nucleic Acids Res* 21:4886.
96. Klose, R. J., S. A. Sarraf, L. Schmiedeberg, S. M. McDermott, I. Stancheva, and A. P. Bird. 2005. DNA binding selectivity of MeCP2 due to a requirement for A/T sequences adjacent to methyl-CpG. *Mol Cell* 19:667.
97. Wakefield, R. I., B. O. Smith, X. Nan, A. Free, A. Soteriou, D. Uhrin, A. P. Bird, and P. N. Barlow. 1999. The solution structure of the domain from MeCP2 that binds to methylated DNA. *J Mol Biol* 291:1055.
98. Nan, X., P. Tate, E. Li, and A. Bird. 1996. DNA methylation specifies chromosomal localization of MeCP2. *Mol Cell Biol* 16:414.

99. Nan, X., F. J. Campoy, and A. Bird. 1997. MeCP2 is a transcriptional repressor with abundant binding sites in genomic chromatin. *Cell* 88:471.
100. Nan, X., H. H. Ng, C. A. Johnson, C. D. Laherty, B. M. Turner, R. N. Eisenman, and A. Bird. 1998. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* 393:386.
101. Jones, P. L., G. J. Veenstra, P. A. Wade, D. Vermaak, S. U. Kass, N. Landsberger, J. Strouboulis, and A. P. Wolffe. 1998. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet* 19:187.
102. Kaludov, N. K., and A. P. Wolffe. 2000. MeCP2 driven transcriptional repression in vitro: selectivity for methylated DNA, action at a distance and contacts with the basal transcription machinery. *Nucleic Acids Res* 28:1921.
103. Buschdorf, J. P., and W. H. Stratling. 2004. A WW domain binding region in methyl-CpG-binding protein MeCP2: impact on Rett syndrome. *J Mol Med* 82:135.
104. Akbarian, S., R. Z. Chen, J. Gribnau, T. P. Rasmussen, H. Fong, R. Jaenisch, and E. G. Jones. 2001. Expression pattern of the Rett syndrome gene MeCP2 in primate prefrontal cortex. *Neurobiol Dis* 8:784.
105. Cassel, S., M. O. Revel, C. Kelche, and J. Zwiller. 2004. Expression of the methyl-CpG-binding protein MeCP2 in rat brain. An ontogenetic study. *Neurobiol Dis* 15:206.
106. Mullaney, B. C., M. V. Johnston, and M. E. Blue. 2004. Developmental expression of methyl-CpG binding protein 2 is dynamically regulated in the rodent brain. *Neuroscience* 123:939.
107. Adachi, M., E. W. Keefer, and F. S. Jones. 2005. A segment of the Mecp2 promoter is sufficient to drive expression in neurons. *Hum Mol Genet* 14:3709.
108. Liu, J., and U. Francke. 2006. Identification of cis-regulatory elements for MECP2 expression. *Hum Mol Genet* 15:1769.
109. Kokura, K., S. C. Kaul, R. Wadhwa, T. Nomura, M. M. Khan, T. Shinagawa, T. Yasukawa, C. Colmenares, and S. Ishii. 2001. The Ski protein family is required for MeCP2-mediated transcriptional repression. *J Biol Chem* 276:34115.
110. Kaufmann, W. E., M. H. Jarrar, J. S. Wang, Y. J. Lee, S. Reddy, G. Bibat, and S. Naidu. 2005. Histone modifications in Rett syndrome lymphocytes: a preliminary evaluation. *Brain Dev* 27:331.
111. Wan, M., K. Zhao, S. S. Lee, and U. Francke. 2001. MECP2 truncating mutations cause histone H4 hyperacetylation in Rett syndrome. *Hum Mol Genet* 10:1085.
112. Yu, F., J. Thiesen, and W. H. Stratling. 2000. Histone deacetylase-independent transcriptional repression by methyl-CpG-binding protein 2. *Nucleic Acids Res* 28:2201.
113. Kouzarides, T. 2002. Histone methylation in transcriptional control. *Curr Opin Genet Dev* 12:198.
114. Fuks, F., P. J. Hurd, D. Wolf, X. Nan, A. P. Bird, and T. Kouzarides. 2003. The methyl-CpG-binding protein MeCP2 links DNA methylation to histone methylation. *J Biol Chem* 278:4035.
115. Fuks, F., P. J. Hurd, R. Deplus, and T. Kouzarides. 2003. The DNA methyltransferases associate with HP1 and the SUV39H1 histone methyltransferase. *Nucleic Acids Res* 31:2305.
116. von Kries, J. P., H. Buhrmester, and W. H. Stratling. 1991. A matrix/scaffold attachment region binding protein: identification, purification, and mode of binding. *Cell* 64:123.
117. Kudo, S. 1998. Methyl-CpG-binding protein MeCP2 represses Sp1-activated transcription of the human leukosialin gene when the promoter is methylated. *Mol Cell Biol* 18:5492.

118. Georgel, P. T., R. A. Horowitz-Scherer, N. Adkins, C. L. Woodcock, P. A. Wade, and J. C. Hansen. 2003. Chromatin compaction by human MeCP2. Assembly of novel secondary chromatin structures in the absence of DNA methylation. *J Biol Chem* 278:32181.
119. Nikitina, T., X. Shi, R. P. Ghosh, R. A. Horowitz-Scherer, J. C. Hansen, and C. L. Woodcock. 2007. Multiple modes of interaction between the methylated DNA binding protein MeCP2 and chromatin. *Mol Cell Biol* 27:864.
120. Nikitina, T., R. P. Ghosh, R. A. Horowitz-Scherer, J. C. Hansen, S. A. Grigoryev, and C. L. Woodcock. 2007. MeCP2-chromatin interactions include the formation of chromatosome-like structures and are altered in mutations causing Rett syndrome. *J Biol Chem*.
121. Horike, S., S. Cai, M. Miyano, J. F. Cheng, and T. Kohwi-Shigematsu. 2005. Loss of silent-chromatin looping and impaired imprinting of DLX5 in Rett syndrome. *Nat Genet* 37:31.
122. Young, J. I., E. P. Hong, J. C. Castle, J. Crespo-Barreto, A. B. Bowman, M. F. Rose, D. Kang, R. Richman, J. M. Johnson, S. Berget, and H. Y. Zoghbi. 2005. Regulation of RNA splicing by the methylation-dependent transcriptional repressor methyl-CpG binding protein 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:17551.
123. Kimura, H., and K. Shiota. 2003. Methyl-CpG-binding protein, MeCP2, is a target molecule for maintenance DNA methyltransferase, Dnmt1. *J Biol Chem* 278:4806.
124. Willard, H. F., and B. D. Hendrich. 1999. Breaking the silence in Rett syndrome. *Nat Genet* 23:127.
125. Ballestar, E., S. Ropero, M. Alaminos, J. Armstrong, F. Setien, R. Agrelo, M. F. Fraga, M. Herranz, S. Avila, M. Pineda, E. Monros, and M. Esteller. 2005. The impact of MECP2 mutations in the expression patterns of Rett syndrome patients. *Hum Genet* 116:91.
126. Traynor, J., P. Agarwal, L. Lazzeroni, and U. Francke. 2002. Gene expression patterns vary in clonal cell cultures from Rett syndrome females with eight different MECP2 mutations. *BMC Med Genet* 3:12.
127. Antequera, F., J. Boyes, and A. Bird. 1990. High levels of de novo methylation and altered chromatin structure at CpG islands in cell lines. *Cell* 62:503.
128. Colantuoni, C., O. H. Jeon, K. Hyder, A. Chenchik, A. H. Khimani, V. Narayanan, E. P. Hoffman, W. E. Kaufmann, S. Naidu, and J. Pevsner. 2001. Gene expression profiling in postmortem Rett Syndrome brain: differential gene expression and patient classification. *Neurobiol Dis* 8:847.
129. Tudor, M., S. Akbarian, R. Z. Chen, and R. Jaenisch. 2002. Transcriptional profiling of a mouse model for Rett syndrome reveals subtle transcriptional changes in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:15536.
130. Barlow, D. P. 1995. Gametic imprinting in mammals. *Science* 270:1610.
131. Kitsberg, D., S. Selig, M. Brandeis, I. Simon, I. Keshet, D. J. Driscoll, R. D. Nicholls, and H. Cedar. 1993. Allele-specific replication timing of imprinted gene regions. *Nature* 364:459.
132. Lewis, A., and W. Reik. 2006. How imprinting centres work. *Cytogenet Genome Res* 113:81.
133. Pauler, F. M., and D. P. Barlow. 2006. Imprinting mechanisms--it only takes two. *Genes Dev* 20:1203.
134. Fournier, C., Y. Goto, E. Ballestar, K. Delaval, A. M. Hever, M. Esteller, and R. Feil. 2002. Allele-specific histone lysine methylation marks regulatory regions at imprinted mouse genes. *Embo J* 21:6560.
135. Gregory, R. I., T. E. Randall, C. A. Johnson, S. Khosla, I. Hatada, L. P. O'Neill, B. M. Turner, and R. Feil. 2001. DNA methylation is linked to deacetylation of histone H3, but not H4, on the imprinted genes Snrpn and U2af1-rs1. *Mol Cell Biol* 21:5426.
136. Drewell, R. A., C. J. Goddard, J. O. Thomas, and M. A. Surani. 2002. Methylation-dependent silencing at the H19 imprinting control region by MeCP2. *Nucleic Acids Res* 30:1139.

137. Bapat, S., and S. Galande. 2005. Association by guilt: identification of DLX5 as a target for MeCP2 provides a molecular link between genomic imprinting and Rett syndrome. *Bioessays* 27:676.
138. Itaba-Matsumoto, N., S. Maegawa, H. Yamagata, I. Kondo, M. Oshimura, and E. Nanba. 2007. Imprinting status of paternally imprinted DLX5 gene in Japanese patients with Rett syndrome. *Brain Dev.*
139. Okita, C., M. Meguro, H. Hoshiya, M. Haruta, Y. K. Sakamoto, and M. Oshimura. 2003. A new imprinted cluster on the human chromosome 7q21-q31, identified by human-mouse monochromosomal hybrids. *Genomics* 81:556.
140. Samaco, R. C., A. Hogart, and J. M. LaSalle. 2005. Epigenetic overlap in autism-spectrum neurodevelopmental disorders: MECP2 deficiency causes reduced expression of UBE3A and GABRB3. *Hum Mol Genet* 14:483.
141. Pirker, S., C. Schwarzer, A. Wieselthaler, W. Sieghart, and G. Sperk. 2000. GABA(A) receptors: immunocytochemical distribution of 13 subunits in the adult rat brain. *Neuroscience* 101:815.
142. Georges, M., C. Charlier, and N. Cockett. 2003. The callipyge locus: evidence for the trans interaction of reciprocally imprinted genes. *Trends Genet* 19:248.
143. Herman, H., M. Lu, M. Anggraini, A. Sikora, Y. Chang, B. J. Yoon, and P. D. Soloway. 2003. Trans allele methylation and paramutation-like effects in mice. *Nat Genet* 34:199.
144. Thatcher, K. N., S. Peddada, D. H. Yasui, and J. M. LaSalle. 2005. Homologous pairing of 15q11-13 imprinted domains in brain is developmentally regulated but deficient in Rett and autism samples. *Hum Mol Genet* 14:785.
145. Chen, W. G., Q. Chang, Y. Lin, A. Meissner, A. E. West, E. C. Griffith, R. Jaenisch, and M. E. Greenberg. 2003. Derepression of BDNF transcription involves calcium-dependent phosphorylation of MeCP2. *Science* 302:885.
146. Martinowich, K., D. Hattori, H. Wu, S. Fouse, F. He, Y. Hu, G. Fan, and Y. E. Sun. 2003. DNA methylation-related chromatin remodeling in activity-dependent BDNF gene regulation. *Science* 302:890.
147. Lo, D. C. 1995. Neurotrophic factors and synaptic plasticity. *Neuron* 15:979.
148. Lom, B., and S. Cohen-Cory. 1999. Brain-derived neurotrophic factor differentially regulates retinal ganglion cell dendritic and axonal arborization in vivo. *J Neurosci* 19:9928.
149. Cohen-Cory, S., and B. Lom. 2004. Neurotrophic regulation of retinal ganglion cell synaptic connectivity: from axons and dendrites to synapses. *Int J Dev Biol* 48:947.
150. Timmusk, T., K. Palm, M. Metsis, T. Reintam, V. Paalme, M. Saarma, and H. Persson. 1993. Multiple promoters direct tissue-specific expression of the rat BDNF gene. *Neuron* 10:475.
151. Tao, X., S. Finkbeiner, D. B. Arnold, A. J. Shaywitz, and M. E. Greenberg. 1998. Ca²⁺ influx regulates BDNF transcription by a CREB family transcription factor-dependent mechanism. *Neuron* 20:709.
152. Chen, W. G., A. E. West, X. Tao, G. Corfas, M. N. Szentirmay, M. Sawadogo, C. Vinson, and M. E. Greenberg. 2003. Upstream stimulatory factors are mediators of Ca²⁺-responsive transcription in neurons. *J Neurosci* 23:2572.
153. Zhou, Z., E. J. Hong, S. Cohen, W. N. Zhao, H. Y. Ho, L. Schmidt, W. G. Chen, Y. Lin, E. Savner, E. C. Griffith, L. Hu, J. A. Steen, C. J. Weitz, and M. E. Greenberg. 2006. Brain-specific phosphorylation of MeCP2 regulates activity-dependent Bdnf transcription, dendritic growth, and spine maturation. *Neuron* 52:255.
154. Chang, Q., G. Khare, V. Dani, S. Nelson, and R. Jaenisch. 2006. The disease progression of Mecp2 mutant mice is affected by the level of BDNF expression. *Neuron* 49:341.

155. Wang, H., S. A. Chan, M. Ogier, D. Hellard, Q. Wang, C. Smith, and D. M. Katz. 2006. Dysregulation of brain-derived neurotrophic factor expression and neurosecretory function in *Mecp2* null mice. *J Neurosci* 26:10911.
156. McGill, B. E., S. F. Bundle, M. B. Yaylaoglu, J. P. Carson, C. Thaller, and H. Y. Zoghbi. 2006. Enhanced anxiety and stress-induced corticosterone release are associated with increased *Crh* expression in a mouse model of Rett syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:18267.
157. Nuber, U. A., S. Kriaucionis, T. C. Rolloff, J. Guy, J. Selfridge, C. Steinhoff, R. Schulz, B. Lipkowitz, H. H. Ropers, M. C. Holmes, and A. Bird. 2005. Up-regulation of glucocorticoid-regulated genes in a mouse model of Rett syndrome. *Hum Mol Genet* 14:2247.
158. Lang, F., and P. Cohen. 2001. Regulation and physiological roles of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase isoforms. *Sci STKE* 2001:RE17.
159. Reynolds, P. D., Y. Ruan, D. F. Smith, and J. G. Scammell. 1999. Glucocorticoid resistance in the squirrel monkey is associated with overexpression of the immunophilin FKBP51. *J Clin Endocrinol Metab* 84:663.
160. De Kloet, E. R., P. Rosenfeld, J. A. Van Eekelen, W. Sutanto, and S. Levine. 1988. Stress, glucocorticoids and development. *Prog Brain Res* 73:101.
161. Watson, P., G. Black, S. Ramsden, M. Barrow, M. Super, B. Kerr, and J. Clayton-Smith. 2001. Angelman syndrome phenotype associated with mutations in *MECP2*, a gene encoding a methyl CpG binding protein. *J Med Genet* 38:224.
162. Klauck, S. M., S. Lindsay, K. S. Beyer, M. Splitt, J. Burn, and A. Poustka. 2002. A mutation hot spot for nonspecific X-linked mental retardation in the *MECP2* gene causes the PPM-X syndrome. *Am J Hum Genet* 70:1034.
163. Carney, R. M., C. M. Wolpert, S. A. Ravan, M. Shahbazian, A. Ashley-Koch, M. L. Cuccaro, J. M. Vance, and M. A. Pericak-Vance. 2003. Identification of *MeCP2* mutations in a series of females with autistic disorder. *Pediatr Neurol* 28:205.
164. Imessaoudene, B., J. P. Bonnefont, G. Royer, V. Cormier-Daire, S. Lyonnet, G. Lyon, A. Munnich, and J. Amiel. 2001. *MECP2* mutation in non-fatal, non-progressive encephalopathy in a male. *J Med Genet* 38:171.
165. Ariani, F., F. Mari, C. Pescucci, I. Longo, M. Bruttini, I. Meloni, G. Hayek, R. Rocchi, M. Zappella, and A. Renieri. 2004. Real-time quantitative PCR as a routine method for screening large rearrangements in Rett syndrome: Report of one case of *MECP2* deletion and one case of *MECP2* duplication. *Hum Mutat* 24:172.
166. Meins, M., J. Lehmann, F. Gerresheim, J. Herchenbach, M. Hagedorn, K. Hameister, and J. T. Epplen. 2005. Submicroscopic duplication in Xq28 causes increased expression of the *MECP2* gene in a boy with severe mental retardation and features of Rett syndrome. *J Med Genet* 42:e12.
167. Lugtenberg, D., A. P. de Brouwer, T. Kleefstra, A. R. Oudakker, S. G. Frints, C. T. Schrandt-Stumpel, J. P. Fryns, L. R. Jensen, J. Chelly, C. Moraine, G. Turner, J. A. Veltman, B. C. Hamel, B. B. de Vries, H. van Bokhoven, and H. G. Yntema. 2006. Chromosomal copy number changes in patients with non-syndromic X linked mental retardation detected by array CGH. *J Med Genet* 43:362.
168. Van Esch, H., M. Bauters, J. Ignatius, M. Jansen, M. Raynaud, K. Hollanders, D. Lugtenberg, T. Bienvenu, L. R. Jensen, J. Gecz, C. Moraine, P. Marynen, J. P. Fryns, and G. Froyen. 2005. Duplication of the *MECP2* region is a frequent cause of severe mental retardation and progressive neurological symptoms in males. *Am J Hum Genet* 77:442.

169. del Gaudio, D., P. Fang, F. Scaglia, P. A. Ward, W. J. Craigen, D. G. Glaze, J. L. Neul, A. Patel, J. A. Lee, M. Irons, S. A. Berry, A. A. Pursley, T. A. Grebe, D. Freedenberg, R. A. Martin, G. E. Hsich, J. R. Khera, N. R. Friedman, H. Y. Zoghbi, C. M. Eng, J. R. Lupski, A. L. Beaudet, S. W. Cheung, and B. B. Roa. 2006. Increased MECP2 gene copy number as the result of genomic duplication in neurodevelopmentally delayed males. *Genet Med* 8:784.
170. Collins, A. L., J. M. Levenson, A. P. Vilaythong, R. Richman, D. L. Armstrong, J. L. Noebels, J. David Sweatt, and H. Y. Zoghbi. 2004. Mild overexpression of MeCP2 causes a progressive neurological disorder in mice. *Hum Mol Genet* 13:2679.
171. Makedonski, K., L. Abuhatzira, Y. Kaufman, A. Razin, and R. Shemer. 2005. MeCP2 deficiency in Rett syndrome causes epigenetic aberrations at the PWS/AS imprinting center that affects UBE3A expression. *Hum Mol Genet* 14:1049.
172. Jordan, C., and U. Francke. 2006. Ube3a expression is not altered in Mecp2 mutant mice. *Hum Mol Genet* 15:2210.
173. Natarajan, K., H. Li, R. A. Mariuzza, and D. H. Margulies. 1999. MHC class I molecules, structure and function. *Rev Immunogenet* 1:32.
174. Madden, D. R. 1995. The three-dimensional structure of peptide-MHC complexes. *Annu Rev Immunol* 13:587.
175. Groothuis, T., and J. Neefjes. 2005. The ins and outs of intracellular peptides and antigen presentation by MHC class I molecules. *Curr Top Microbiol Immunol* 300:127.
176. Koch, J., and R. Tampe. 2006. The macromolecular peptide-loading complex in MHC class I-dependent antigen presentation. *Cell Mol Life Sci* 63:653.
177. Lehner, P. J., and P. Cresswell. 2004. Recent developments in MHC-class-I-mediated antigen presentation. *Curr Opin Immunol* 16:82.
178. Kumanovics, A., T. Takada, and K. F. Lindahl. 2003. Genomic organization of the mammalian MHC. *Annu Rev Immunol* 21:629.
179. O'Callaghan, C. A., and J. I. Bell. 1998. Structure and function of the human MHC class Ib molecules HLA-E, HLA-F and HLA-G. *Immunol Rev* 163:129.
180. Singer, D. S., and R. Ehrlich. 1988. Identification of regulatory elements associated with a class I MHC gene. *Curr Top Microbiol Immunol* 137:148.
181. Maguire, J. E., W. I. Frels, J. C. Richardson, J. D. Weissman, and D. S. Singer. 1992. In vivo function of regulatory DNA sequence elements of a major histocompatibility complex class I gene. *Mol Cell Biol* 12:3078.
182. Butler, J. E., and J. T. Kadonaga. 2002. The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression. *Genes Dev* 16:2583.
183. Berk, A. J. 1999. Activation of RNA polymerase II transcription. *Curr Opin Cell Biol* 11:330.
184. Smale, S. T. 2001. Core promoters: active contributors to combinatorial gene regulation. *Genes Dev* 15:2503.
185. Howcroft, T. K., A. Raval, J. D. Weissman, A. Geronne, and D. S. Singer. 2003. Distinct transcriptional pathways regulate basal and activated major histocompatibility complex class I expression. *Mol Cell Biol* 23:3377.
186. van den Elsen, P. J., S. J. Gobin, M. C. van Eggermond, and A. Peijnenburg. 1998. Regulation of MHC class I and II gene transcription: differences and similarities. *Immunogenetics* 48:208.

187. Gobin, S. J., P. Biesta, and P. J. Van den Elsen. 2003. Regulation of human beta 2-microglobulin transactivation in hematopoietic cells. *Blood* 101:3058.
188. Johnson, D. R. 2003. Locus-specific constitutive and cytokine-induced HLA class I gene expression. *J Immunol* 170:1894.
189. Gobin, S. J., V. Keijsers, M. van Zutphen, and P. J. van den Elsen. 1998. The role of enhancer A in the locus-specific transactivation of classical and nonclassical HLA class I genes by nuclear factor kappa B. *J Immunol* 161:2276.
190. Gobin, S. J., M. van Zutphen, A. M. Woltman, and P. J. van den Elsen. 1999. Transactivation of classical and nonclassical HLA class I genes through the IFN-stimulated response element. *J Immunol* 163:1428.
191. Gobin, S. J., A. Peijnenburg, M. van Eggermond, M. van Zutphen, R. van den Berg, and P. J. van den Elsen. 1998. The RFX complex is crucial for the constitutive and CIITA-mediated transactivation of MHC class I and beta2-microglobulin genes. *Immunity* 9:531.
192. Gobin, S. J., M. van Zutphen, S. D. Westerheide, J. M. Boss, and P. J. van den Elsen. 2001. The MHC-specific enhanceosome and its role in MHC class I and beta(2)-microglobulin gene transactivation. *J Immunol* 167:5175.
193. Gobin, S. J., A. Peijnenburg, V. Keijsers, and P. J. van den Elsen. 1997. Site alpha is crucial for two routes of IFN gamma-induced MHC class I transactivation: the ISRE-mediated route and a novel pathway involving CIITA. *Immunity* 6:601.
194. Martin, B. K., K. C. Chin, J. C. Olsen, C. A. Skinner, A. Dey, K. Ozato, and J. P. Ting. 1997. Induction of MHC class I expression by the MHC class II transactivator CIITA. *Immunity* 6:591.
195. Howcroft, T. K., C. Murphy, J. D. Weissman, S. J. Huber, M. Sawadogo, and D. S. Singer. 1999. Upstream stimulatory factor regulates major histocompatibility complex class I gene expression: the U2DeltaE4 splice variant abrogates E-box activity. *Mol Cell Biol* 19:4788.
196. Raval, A., T. K. Howcroft, J. D. Weissman, S. Kirshner, X. S. Zhu, K. Yokoyama, J. Ting, and D. S. Singer. 2001. Transcriptional coactivator, CIITA, is an acetyltransferase that bypasses a promoter requirement for TAF(II)250. *Mol Cell* 7:105.
197. Spilianakis, C., J. Papamatheakis, and A. Kretsovali. 2000. Acetylation by PCAF enhances CIITA nuclear accumulation and transactivation of major histocompatibility complex class II genes. *Mol Cell Biol* 20:8489.
198. Brockmann, D., O. Lehmkuhler, U. Schmucker, and H. Esche. 2001. The histone acetyltransferase activity of PCAF cooperates with the brahma/SWI2-related protein BRG-1 in the activation of the enhancer A of the MHC class I promoter. *Gene* 277:111.
199. Mudhasani, R., and J. D. Fontes. 2002. The class II transactivator requires brahma-related gene 1 to activate transcription of major histocompatibility complex class II genes. *Mol Cell Biol* 22:5019.
200. Germain, R. N. 2002. T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. *Nat Rev Immunol* 2:309.
201. Takahama, Y. 2006. Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. *Nat Rev Immunol* 6:127.
202. Miosge, L., and R. Zamoyska. 2007. Signalling in T-cell development: is it all location, location, location? *Curr Opin Immunol* 19:194.
203. Santana, M. A., and F. Esquivel-Guadarrama. 2006. Cell biology of T cell activation and differentiation. *Int Rev Cytol* 250:217.

204. Williams, M. A., and M. J. Bevan. 2007. Effector and memory CTL differentiation. *Annu Rev Immunol* 25:171.
205. Gasser, S., and D. H. Raulet. 2006. Activation and self-tolerance of natural killer cells. *Immunol Rev* 214:130.
206. Raulet, D. H., and R. E. Vance. 2006. Self-tolerance of natural killer cells. *Nat Rev Immunol* 6:520.
207. Raulet, D. H. 2006. Missing self recognition and self tolerance of natural killer (NK) cells. *Semin Immunol* 18:145.
208. Dorfman, J. R., and D. H. Raulet. 1996. Major histocompatibility complex genes determine natural killer cell tolerance. *Eur J Immunol* 26:151.
209. Lodoen, M. B., and L. L. Lanier. 2006. Natural killer cells as an initial defense against pathogens. *Curr Opin Immunol* 18:391.
210. Rall, G. F., L. Mucke, and M. B. Oldstone. 1995. Consequences of cytotoxic T lymphocyte interaction with major histocompatibility complex class I-expressing neurons in vivo. *J Exp Med* 182:1201.
211. Joly, E., L. Mucke, and M. B. Oldstone. 1991. Viral persistence in neurons explained by lack of major histocompatibility class I expression. *Science* 253:1283.
212. Joly, E., and M. B. Oldstone. 1992. Neuronal cells are deficient in loading peptides onto MHC class I molecules. *Neuron* 8:1185.
213. Lampson, L. A., and C. A. Fisher. 1984. Weak HLA and beta 2-microglobulin expression of neuronal cell lines can be modulated by interferon. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:6476.
214. Lampson, L. A. 1995. Interpreting MHC class I expression and class I/class II reciprocity in the CNS: reconciling divergent findings. *Microsc Res Tech* 32:267.
215. Maehlen, J., H. D. Schroder, L. Klareskog, T. Olsson, and K. Kristensson. 1988. Axotomy induces MHC class I antigen expression on rat nerve cells. *Neurosci Lett* 92:8.
216. Olsson, T., J. Maehlen, A. Love, L. Klareskog, E. Norrby, and K. Kristensson. 1988. Measles virus infection causes expression of class I and class II MHC antigens in rat brain. *Ann N Y Acad Sci* 540:486.
217. Redwine, J. M., M. J. Buchmeier, and C. F. Evans. 2001. In vivo expression of major histocompatibility complex molecules on oligodendrocytes and neurons during viral infection. *Am J Pathol* 159:1219.
218. Neumann, H., H. Schmidt, A. Cavalie, D. Jenne, and H. Wekerle. 1997. Major histocompatibility complex (MHC) class I gene expression in single neurons of the central nervous system: differential regulation by interferon (IFN)-gamma and tumor necrosis factor (TNF)-alpha. *J Exp Med* 185:305.
219. Neumann, H., A. Cavalie, D. E. Jenne, and H. Wekerle. 1995. Induction of MHC class I genes in neurons. *Science* 269:549.
220. Fujimaki, H., N. Hikawa, M. Nagoya, T. Nagata, and M. Minami. 1996. IFN-gamma induces expression of MHC class I molecules in adult mouse dorsal root ganglion neurones. *Neuroreport* 7:2951.
221. Corriveau, R. A., G. S. Huh, and C. J. Shatz. 1998. Regulation of class I MHC gene expression in the developing and mature CNS by neural activity. *Neuron* 21:505.
222. Huh, G. S., L. M. Boulanger, H. Du, P. A. Riquelme, T. M. Brotz, and C. J. Shatz. 2000. Functional requirement for class I MHC in CNS development and plasticity. *Science* 290:2155.
223. Loconto, J., F. Papes, E. Chang, L. Stowers, E. P. Jones, T. Takada, A. Kumanovics, K. Fischer Lindahl, and C. Dulac. 2003. Functional expression of murine V2R pheromone receptors involves selective association with the M10 and M1 families of MHC class Ib molecules. *Cell* 112:607.

224. Ishii, T., J. Hirota, and P. Mombaerts. 2003. Combinatorial coexpression of neural and immune multigene families in mouse vomeronasal sensory neurons. *Curr Biol* 13:394.
225. Linda, H., H. Hammarberg, S. Cullheim, A. Levinovitz, M. Khademi, and T. Olsson. 1998. Expression of MHC class I and beta2-microglobulin in rat spinal motoneurons: regulatory influences by IFN-gamma and axotomy. *Exp Neurol* 150:282.
226. Lidman, O., T. Olsson, and F. Piehl. 1999. Expression of nonclassical MHC class I (RT1-U) in certain neuronal populations of the central nervous system. *Eur J Neurosci* 11:4468.
227. Linda, H., H. Hammarberg, F. Piehl, M. Khademi, and T. Olsson. 1999. Expression of MHC class I heavy chain and beta2-microglobulin in rat brainstem motoneurons and nigral dopaminergic neurons. *J Neuroimmunol* 101:76.
228. Goddard, C. A., D. A. Butts, and C. J. Shatz. 2007. Regulation of CNS synapses by neuronal MHC class I. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:6828.
229. Dulac, C. 2000. Sensory coding of pheromone signals in mammals. *Curr Opin Neurobiol* 10:511.
230. Leinders-Zufall, T., P. Brennan, P. Widmayer, P. C. S, A. Maul-Pavicic, M. Jager, X. H. Li, H. Breer, F. Zufall, and T. Boehm. 2004. MHC class I peptides as chemosensory signals in the vomeronasal organ. *Science* 306:1033.
231. Boehm, T., and F. Zufall. 2006. MHC peptides and the sensory evaluation of genotype. *Trends Neurosci* 29:100.
232. Thompson, R. N., R. McMillon, A. Napier, and K. S. Wekesa. 2007. Pregnancy block by MHC class I peptides is mediated via the production of inositol 1,4,5-trisphosphate in the mouse vomeronasal organ. *J Exp Biol* 210:1406.
233. Peddada, S., D. H. Yasui, and J. M. LaSalle. 2006. Inhibitors of differentiation (ID1, ID2, ID3 and ID4) genes are neuronal targets of MeCP2 that are elevated in Rett syndrome. *Hum Mol Genet* 15:2003.
234. Suzuki, M., T. Yamada, F. Kihara-Negishi, T. Sakurai, and T. Oikawa. 2003. Direct association between PU.1 and MeCP2 that recruits mSin3A-HDAC complex for PU.1-mediated transcriptional repression. *Oncogene* 22:8688.
235. Warren, L. A., and E. V. Rothenberg. 2003. Regulatory coding of lymphoid lineage choice by hematopoietic transcription factors. *Curr Opin Immunol* 15:166.
236. Rothenberg, E. V., and T. Taghon. 2005. Molecular genetics of T cell development. *Annu Rev Immunol* 23:601.
237. David-Fung, E. S., M. A. Yui, M. Morales, H. Wang, T. Taghon, R. A. Diamond, and E. V. Rothenberg. 2006. Progression of regulatory gene expression states in fetal and adult pro-T-cell development. *Immunol Rev* 209:212.
238. Tong, Y., T. Aune, and M. Boothby. 2005. T-bet antagonizes mSin3a recruitment and transactivates a fully methylated IFN-gamma promoter via a conserved T-box half-site. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:2034.
239. Fiumara, A., A. Sciotto, R. Barone, G. D'Asero, S. Munda, E. Parano, and L. Pavone. 1999. Peripheral lymphocyte subsets and other immune aspects in Rett syndrome. *Pediatr Neurol* 21:619.
240. Herold, M. J., K. G. McPherson, and H. M. Reichardt. 2006. Glucocorticoids in T cell apoptosis and function. *Cell Mol Life Sci* 63:60.
241. Brewer, J. A., O. Kanagawa, B. P. Sleckman, and L. J. Muglia. 2002. Thymocyte apoptosis induced by T cell activation is mediated by glucocorticoids in vivo. *J Immunol* 169:1837.

242. Tuckermann, J. P., A. Kleiman, K. G. McPherson, and H. M. Reichardt. 2005. Molecular mechanisms of glucocorticoids in the control of inflammation and lymphocyte apoptosis. *Crit Rev Clin Lab Sci* 42:71.
243. Wrona, D. 2006. Neural-immune interactions: an integrative view of the bidirectional relationship between the brain and immune systems. *J Neuroimmunol* 172:38.
244. Mori, H., R. Tanaka, S. Yoshida, K. Ono, R. Yamanaka, N. Hara, and N. Takeda. 1993. Immunological analysis of the rats with anterior hypothalamic lesions. *J Neuroimmunol* 48:45.
245. Utsuyama, M., S. Kobayashi, and K. Hirokawa. 1997. Induction of thymic hyperplasia and suppression of splenic T cells by lesioning of the anterior hypothalamus in aging Wistar rats. *J Neuroimmunol* 77:174.
246. Tyrey, L., and A. V. Nalbandov. 1972. Influence of anterior hypothalamic lesions on circulating antibody titers in the rat. *Am J Physiol* 222:179.
247. Stein, M., S. Keller, and S. Schleifer. 1981. The hypothalamus and the immune response. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis* 59:45.
248. Devi, R. S., R. M. Sivaprakash, and A. Namasivayam. 2004. Rat hippocampus and primary immune response. *Indian J Physiol Pharmacol* 48:329.
249. Cross, R. J., W. R. Markesbery, W. H. Brooks, and T. L. Roszman. 1980. Hypothalamic-immune interactions. I. The acute effect of anterior hypothalamic lesions on the immune response. *Brain Res* 196:79.
250. Devi, R. S., and A. Namasivayam. 1996. Regional specificity seen within hypothalamus in neuroimmunomodulation. *Indian J Physiol Pharmacol* 40:70.
251. Jankovic, B. D., K. Isakovic, J. Ivanus, and L. Rakic. 1973. Immune response and lymphatic tissue reaction in brain-lesioned rats. *Adv Exp Med Biol* 29:661.
252. Tsuboi, H., H. Miyazawa, M. Wenner, H. Imori, and N. Kawamura. 2001. Lesions in lateral hypothalamic areas increase splenocyte apoptosis. *Neuroimmunomodulation* 9:1.
253. Carson, M. J., and J. G. Sutcliffe. 1999. Balancing function vs. self defense: the CNS as an active regulator of immune responses. *J Neurosci Res* 55:1.
254. Carson, M. J., J. M. Doose, B. Melchior, C. D. Schmid, and C. C. Ploix. 2006. CNS immune privilege: hiding in plain sight. *Immunol Rev* 213:48.
255. Steinman, L. 2004. Elaborate interactions between the immune and nervous systems. *Nat Immunol* 5:575.
256. Merrill, J. E., and G. M. Jonakait. 1995. Interactions of the nervous and immune systems in development, normal brain homeostasis, and disease. *Faseb J* 9:611.
257. Ziv, Y., N. Ron, O. Butovsky, G. Landa, E. Sudai, N. Greenberg, H. Cohen, J. Kipnis, and M. Schwartz. 2006. Immune cells contribute to the maintenance of neurogenesis and spatial learning abilities in adulthood. *Nat Neurosci* 9:268.
258. Perry, V. H., T. A. Newman, and C. Cunningham. 2003. The impact of systemic infection on the progression of neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurosci* 4:103.
259. Frankel, A. D., and C. O. Pabo. 1988. Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell* 55:1189.
260. Green, M., and P. M. Loewenstein. 1988. Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein. *Cell* 55:1179.
261. Derossi, D., A. H. Joliot, G. Chassaing, and A. Prochiantz. 1994. The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J Biol Chem* 269:10444.

262. Chatelin, L., M. Volovitch, A. H. Joliot, F. Perez, and A. Prochiantz. 1996. Transcription factor *hoxa-5* is taken up by cells in culture and conveyed to their nuclei. *Mech Dev* 55:111.
263. Gehring, W. J., Y. Q. Qian, M. Billeter, K. Furukubo-Tokunaga, A. F. Schier, D. Resendez-Perez, M. Affolter, G. Otting, and K. Wuthrich. 1994. Homeodomain-DNA recognition. *Cell* 78:211.
264. Brunet, I., A. A. Di Nardo, L. Sonnier, M. Beurdeley, and A. Prochiantz. 2007. The topological role of homeoproteins in the developing central nervous system. *Trends Neurosci* 30:260.
265. Joliot, A., A. Maizel, D. Rosenberg, A. Trembleau, S. Dupas, M. Volovitch, and A. Prochiantz. 1998. Identification of a signal sequence necessary for the unconventional secretion of Engrailed homeoprotein. *Curr Biol* 8:856.
266. Maizel, A., O. Bensaude, A. Prochiantz, and A. Joliot. 1999. A short region of its homeodomain is necessary for engrailed nuclear export and secretion. *Development* 126:3183.
267. Joliot, A., A. Trembleau, G. Raposo, S. Calvet, M. Volovitch, and A. Prochiantz. 1997. Association of Engrailed homeoproteins with vesicles presenting caveolae-like properties. *Development* 124:1865.
268. Maizel, A., M. Tassetto, O. Filhol, C. Cochet, A. Prochiantz, and A. Joliot. 2002. Engrailed homeoprotein secretion is a regulated process. *Development* 129:3545.
269. Derossi, D., S. Calvet, A. Trembleau, A. Brunissen, G. Chassaing, and A. Prochiantz. 1996. Cell internalization of the third helix of the Antennapedia homeodomain is receptor-independent. *J Biol Chem* 271:18188.
270. Berlose, J. P., O. Convert, D. Derossi, A. Brunissen, and G. Chassaing. 1996. Conformational and associative behaviours of the third helix of antennapedia homeodomain in membrane-mimetic environments. *Eur J Biochem* 242:372.
271. Christiaens, B., S. Symoens, S. Verheyden, Y. Engelborghs, A. Joliot, A. Prochiantz, J. Vandekerckhove, M. Rosseneu, and B. Vanloo. 2002. Tryptophan fluorescence study of the interaction of penetratin peptides with model membranes. *Eur J Biochem* 269:2918.
272. Christiaens, B., J. Grooten, M. Reusens, A. Joliot, M. Goethals, J. Vandekerckhove, A. Prochiantz, and M. Rosseneu. 2004. Membrane interaction and cellular internalization of penetratin peptides. *Eur J Biochem* 271:1187.
273. Prochiantz, A., and A. Joliot. 2003. Can transcription factors function as cell-cell signalling molecules? *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:814.
274. Prochiantz, A. 2000. Messenger proteins: homeoproteins, TAT and others. *Curr Opin Cell Biol* 12:400.
275. Rustom, A., R. Saffrich, I. Markovic, P. Walther, and H. H. Gerdes. 2004. Nanotubular highways for intercellular organelle transport. *Science* 303:1007.
276. Karlsson, A., R. Karlsson, M. Karlsson, A. S. Cans, A. Stromberg, F. Ryttsen, and O. Orwar. 2001. Networks of nanotubes and containers. *Nature* 409:150.
277. Onfelt, B., S. Nedvetzki, K. Yanagi, and D. M. Davis. 2004. Cutting edge: Membrane nanotubes connect immune cells. *J Immunol* 173:1511.
278. Onfelt, B., M. A. Purbhoo, S. Nedvetzki, S. Sowinski, and D. M. Davis. 2005. Long-distance calls between cells connected by tunneling nanotubules. *Sci STKE* 2005:pe55.
279. Watkins, S. C., and R. D. Salter. 2005. Functional connectivity between immune cells mediated by tunneling nanotubules. *Immunity* 23:309.

280. Onfelt, B., S. Nedvetzki, R. K. Benninger, M. A. Purbhoo, S. Sowinski, A. N. Hume, M. C. Seabra, M. A. Neil, P. M. French, and D. M. Davis. 2006. Structurally distinct membrane nanotubes between human macrophages support long-distance vesicular traffic or surfing of bacteria. *J Immunol* 177:8476.
281. Gerdes, H. H., N. V. Bukoreshtliev, and J. F. Barroso. 2007. Tunneling nanotubes: a new route for the exchange of components between animal cells. *FEBS Lett* 581:2194.
282. Fevrier, B., and G. Raposo. 2004. Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages. *Curr Opin Cell Biol* 16:415.
283. van Niel, G., I. Porto-Carreiro, S. Simoes, and G. Raposo. 2006. Exosomes: a common pathway for a specialized function. *J Biochem (Tokyo)* 140:13.
284. Raposo, G., H. W. Nijman, W. Stoorvogel, R. Liejendekker, C. V. Harding, C. J. Melief, and H. J. Geuze. 1996. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med* 183:1161.
285. Denzer, K., M. van Eijk, M. J. Kleijmeer, E. Jakobson, C. de Groot, and H. J. Geuze. 2000. Follicular dendritic cells carry MHC class II-expressing microvesicles at their surface. *J Immunol* 165:1259.
286. Clayton, A., A. Turkes, S. Dewitt, R. Steadman, M. D. Mason, and M. B. Hallett. 2004. Adhesion and signaling by B cell-derived exosomes: the role of integrins. *Faseb J* 18:977.
287. Faure, J., G. Lachenal, M. Court, J. Hirrlinger, C. Chatellard-Causse, B. Blot, J. Grange, G. Schoehn, Y. Goldberg, V. Boyer, F. Kirchhoff, G. Raposo, J. Garin, and R. Sadoul. 2006. Exosomes are released by cultured cortical neurones. *Mol Cell Neurosci* 31:642.
288. Fevrier, B., D. Vilette, F. Archer, D. Loew, W. Faigle, M. Vidal, H. Laude, and G. Raposo. 2004. Cells release prions in association with exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:9683.
289. Porto-Carreiro, I., B. Fevrier, S. Paquet, D. Vilette, and G. Raposo. 2005. Prions and exosomes: from PrPc trafficking to PrPsc propagation. *Blood Cells Mol Dis* 35:143.
290. Braunschweig, D., T. Simcox, R. C. Samaco, and J. M. LaSalle. 2004. X-Chromosome inactivation ratios affect wild-type MeCP2 expression within mosaic Rett syndrome and *Mecp2*^{-/+} mouse brain. *Hum Mol Genet* 13:1275.
291. Young, J. I., and H. Y. Zoghbi. 2004. X-chromosome inactivation patterns are unbalanced and affect the phenotypic outcome in a mouse model of rett syndrome. *Am J Hum Genet* 74:511.

ANNEXE



Methodology

Open Access

Design of an improved set of oligonucleotide primers for genotyping MeCP2^{tm1.1Bird} KO mice by PCR

Julie Miralvès[†], Eddy Magdeleine[†] and Etienne Joly^{*}

Address: Equipe de Neuro-Immuno-Génétique Moléculaire, IPBS, UMR CNRS 5089, 205 route de Narbonne, 31077 Toulouse Cedex, France

Email: Julie Miralvès - julie.miralves@ipbs.fr; Eddy Magdeleine - eddy.magdeleine@ipbs.fr; Etienne Joly* - atn@cict.fr

* Corresponding author †Equal contributors

Published: 31 August 2007

Received: 6 June 2007

Molecular Neurodegeneration 2007, **2**:16 doi:10.1186/1750-1326-2-16

Accepted: 31 August 2007

This article is available from: <http://www.molecularneurodegeneration.com/content/2/1/16>

© 2007 Miralvès et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Background: The strain of MeCP2^{tm1.1Bird} mice is a broadly used model for Rett syndrome. Because males carrying the invalidated MeCP2 locus are sterile, this strain has to be maintained in a heterozygous state. All animals therefore have to be genotyped at every generation to discriminate those carrying the invalidated allele (+/- females and y/- males) from those that do not. This is conveniently carried out by PCR on tail genomic DNA but because the primer pairs described initially for this purpose yield very similar size DNA bands on the WT and the KO alleles, this requires to carry out two independent PCR reactions on tail DNA preparations from all animals.

Results: After cloning and sequencing the PCR fragment amplified on the KO allele, we tested several sets of primers that were designed to yield PCR fragments of different sizes on the KO and WT alleles.

Conclusion: We have thus identified a set of three primers that allows for efficient genotyping of the animals by a single PCR reaction. Furthermore, using of this set of primers also resolves a recurrent problem related to the tendency of one of the initial primers to give rise to a non specific band because of its capacity to anneal at both ends of a repeated genomic element which we have identified as MurvyLTR.

Background

Rett syndrome (RTT) is a severe form of mental retardation which affects mostly girls. RTT is caused by dominant spontaneous mutations in the X-linked gene *MECP2* [1]. Several lines of mice carrying invalidated *Mecp2* gene have been generated [2-4], which serve as very useful models to decipher the function(s) of MeCP2 and to try to understand the pathogenesis of RTT. Although hemizygote male mice carrying an invalidated *Mecp2* gene (y/-) are viable, they suffer from a more severe form of the disease than the heterozygote females (+/-) and are sterile. Female mice, on the other hand, develop clinical signs later than

the males and remain fertile for several months, albeit with a somewhat limited breeding efficiency [5]. Because the males are sterile, one must maintain this mouse strain by crossing heterozygous females with wild type (WT) males. The offspring therefore must be systematically screened by PCR genotyping. A genotyping protocol which was initially devised by Brian Hendrich and Jacky Guy, who also generated these mice [2], is available on the web site of the Jackson Laboratory, where this strain of mice is maintained and distributed to many labs worldwide. This protocol calls for two separate PCR reactions to amplify either a 415 bp fragment on the WT allele with the

P5-P7 primer pair, or a 425 bp fragment on the disrupted allele with the P5-P6 primer pair. Because of their very similar sizes, these bands have to be run separately on an agarose gel. The primers we used for our study, which were suggested by the laboratory of Professor Adrian Bird, are longer than those found on the Jackson Laboratory site by a few nucleotides (see materials and methods).

Genotyping of males with this protocol should yield a PCR product with either one pair of primer or the other (P5-P6 for the KO, P5-P7 for the WT). A further unexpected drawback we experienced with the oligonucleotides we used was that genotyping of males frequently gave rise to bands in both sets of PCR reactions, with the unexpected band being slightly more diffuse and higher than the other band. Because the maintenance of these MeCP2 KO mice is already very time consuming and cumbersome, we felt that it would be very useful to be able to genotype the mice via a single PCR reaction. We have therefore devised an optimised genotyping protocol by testing several primer combinations, which is more specific than the original one and yields DNA fragments on the WT and KO alleles that can easily be distinguished in a single lane on an agarose gel.

Results and Discussion

Design of the optimised P3 primer set

Although the cloning strategy used to generate the mice is clearly described in the original paper [2], we were unsure of the exact DNA sequence of the disrupted allele. With a view to devise a new set of primers for the genotyping of MeCP2^{tm1.1Bird} mice, we therefore cloned the PCR fragments generated by the P5-P6 and P5-P7 primer pairs into the T overhang pDrive vector (Qiagen) and sequenced them. These DNA sequences (em:AM691835 and em:AM691836), which were extended by a few tens of nucleotides on either side by identifying the corresponding genomic regions by performing Blast searches, were then submitted to the Primer3 and Gene Fisher online WEB servers for the design of optimised PCR primers. We then picked the best hits proposed by each, and ordered all six oligonucleotides (table 1).

To identify those that worked more efficiently and reliably, these primers were then used with various protocols in all the possible eight combinations. This led us to choose all three primers suggested by the P3 web server. The conditions to perform the diagnostic PCRs in a single tube were then further optimised for variables such as annealing temperature, concentrations of primers, number of cycles and length of elongation time, with a view to obtain bands of comparable intensities on heterozygote females. This finalised protocol is provided in the methods section.

The typical result of a 1.5% agarose gel to analyse the PCR reactions obtained with these conditions on all four genotypes (y/- ; y/+ ; +/- ; +/+) is shown on Fig 1, showing that the 411 bp WT band can be clearly distinguished from the 458 bp KO band, and that both bands are amplified to a comparable extent in heterozygote females. Compared to the results obtained on the same DNAs with the P5-P6 and P5-P7 primer pairs, a further advantage of this set of primers is that at least one band is generated with all four genotypes, thereby cancelling the need to ascertain that an absence of band in a lane is not due to a failed PCR reaction (for this purpose, the Jackson Laboratory recommends using an additional primer pair as an internal control, which amplifies a 312 bp fragment on the IL-2 gene).

Characterisation of the undesirable 'ghost' bands

As alluded to earlier, we have also found that genotyping of males with the P5-P6 and P5-P7 sets of primers often tends to yield DNA bands in both PCR reactions. In our hands, this has occurred more frequently than one time out of two. When they arise, the non-specific bands are usually slightly higher and sometimes more diffuse than the bona fide bands. An example of such non-specific bands can be seen for the y/+ male with the P5-P6 pair, for the y/- male with the P5-P7 primer pair, and probably contributes to the upper part of the broad and intense band seen in the lane of the y/+ male with the same P5-P7 pair.

Attempts at sequencing these PCR products directly yielded no signal with the P6 or P7 primers, and unreadable sequences with the P5 primer. This observation found its explanation when we carried out secondary PCR amplifications with only one of the three primers in the reaction, starting from 1 µl of the initial PCR, diluted 1000 fold. These PCRs carried out with a single primer

Table 1: Size of DNA fragments obtained by PCR with the novel oligonucleotides tested in this study.

	P3 RV CCACCCT CCAGTTTG GTTTA	GF RV GTTTTGTT CCCCACC CTCCA
GF KO FW ACTTTGTCCTGCTGCCTCCA	475	486
P3 KO FW CCATGCGATAAGCTTGATGA	458	469
P3 WT FW GACCCCTTGGGACTGAAGTT	411	421
GF WT FW TCGGACCCCTTGGGACTGA	413	424

These oligonucleotides were chosen by submitting sequences AM691835 and AM691836 to the P3 [8] and Gene Fisher [9] primer-design web servers.

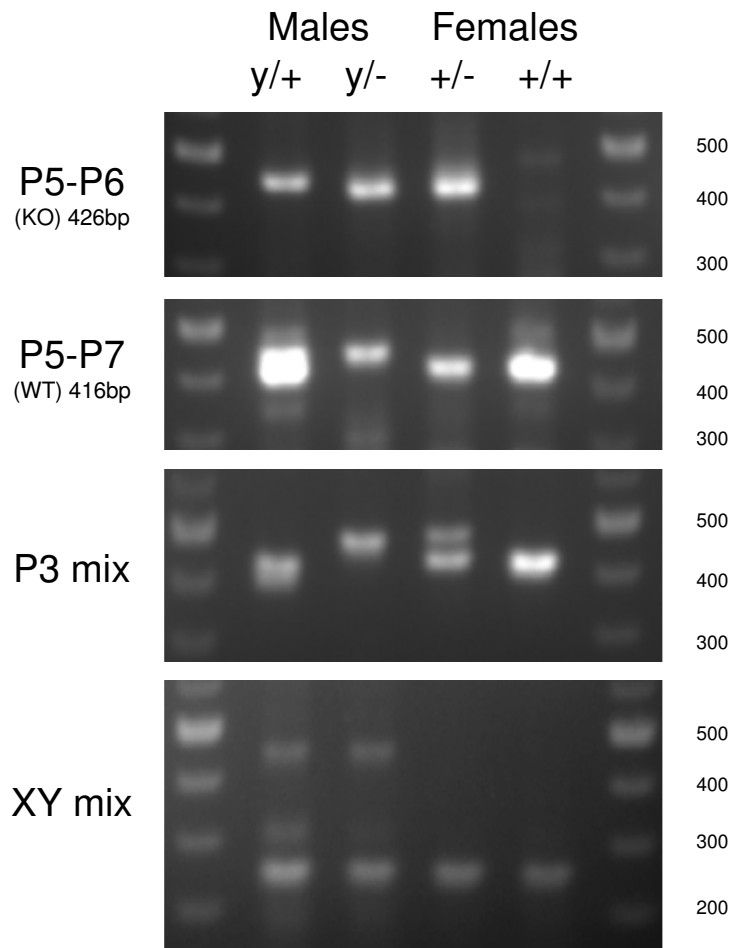


Figure 1

Electrophoretic analysis of genotyping PCR products. Genomic tail DNAs were prepared as detailed in the methods sections. 20 ng of the same DNA preparations of the four genotypes (KO male: y/- ; WT male: y/+; Heterozygote female: +/- ; WT female: +/+) were submitted to the different PCR amplification protocols detailed in the methods section, before loading on a 1.5% agarose gel.

consistently yielded high amounts of DNA when they were performed with primer P5, and not with the two others. Six plasmid clones obtained after inserting this PCR fragment into PCR-TOPO were submitted to automated sequencing. This revealed that they all contained the P5 primer at either end, surrounding inserts that were very closely related, but not identical, to one another (95–99 % identity). Blast searches performed on the nr NCBI database identified over one hundred different hits ranging from 99 % to 90 % identity for each of these sequences. Quite remarkably, these hits were almost all BAC sequences mapping to the Y chromosome. This suggested that the sequences carried by the cloned inserts actually corresponded to repetitive genomic DNA sequence present specifically on the mouse Y chromosome. This was confirmed by a search with the CENSOR web server [6], which identified this DNA as a MurvyLTR repetitive element (for MURine RetroVirus Y). MurvyLTRs are known to be present in dozens of copies on the Y chromosome of certain mouse species and not others [6]. This provides an explanation for the fact that we never obtained this ghost band in the P5-P6 PCRs from WT females.

The homology of the P5 primer with the Y chromosome sequences is, however, sufficiently low to be missed by blast searches either on the whole genome, or simply on the corresponding BAC sequences. Undisrupted pairing of the 3' end of P5 primer to the sequences carried by the Y chromosome BAC sequences identified by blast occurs only over 11 consecutive nucleotides on one side, and 6 or 7 nucleotides on the other (final nucleotides corresponding for example to positions 163994 and 163580 on BAC RP24-233K2 (acc: gb|AC147265.2), to 171119 and 170710 on BAC clone RP24-120L13(acc: gb|AC182036.2), and to 61 and 484 of the MurvyLTR sequence from the Repbase database). The three extra nucleotides (AAG) present at the 3' end of the P5 primer we used compared to the one found in the protocol provided by the Jackson laboratory thus probably contributed very significantly to the undesirable amplification of these 'ghost' bands. Our observations underline a potential problem that can derive from the capacity of certain oligonucleotides to anneal, even imperfectly, to DNA sequences that are repeated many times in the genome.

Conclusion

We hope that the new set of primers we have designed will prove useful to the many laboratories that work with the strain of MeCP2^{tm1.1Bird} KO mice.

Methods

Mice

MeCP2^{tm1.1Bird} +/- female mice were provided by Brian Hendrich from the ISCR, Edinburgh, UK, and mated with

C57BL/6 wild-type male mice purchased from the Centre de Recherche et d'Élevage Janvier, France. All experiments involving animals were performed in compliance with the relevant laws and institutional guidelines.

Tissue Biopsy and DNA extraction

Mice born from MeCP2^{tm1.1Bird} +/- female and C57BL/6 wild-type male mate were weaned at 3 weeks of age, at which times the distal 1 cm of tail was excised with a sterile razor blade. Tail biopsies were placed in 1,5 ml microcentrifuge tubes and digested overnight at 55 °C with 600 µl of tail digestion TNES buffer (400 mM NaCl, 100 mM EDTA, 0.6 % SDS, 10 mM Tris, pH 7.5) containing 35 µg proteinase K (Promega). 166,7 µl NaCl 6M were added and samples shaken vigorously for 15 sec prior to 14000 × g centrifugation for 5 min at room temperature. DNA was precipitated from the aqueous phase with one volume of ice-cold 95 % ethanol. Pellets were washed with one volume of 70 % ethanol and rapidly dried at room temperature. The pellets were then dissolved in 100 µl TE buffer, warmed at 65 °C for at least 10 min and quantified by OD₂₆₀. When they were not used immediately, samples were stored under ethanol at -20 °C.

Primers: All primers were ordered from Sigma.

P5 primer : 5'-TGGTAAAGACCCATGTGACCCAAG-3'

P6 primer : 5'-TCCACCTAGCCTGCCTGTACTT-3'

P7 primer : 5'-GGCTTGCCACATGACAAGAC-3'

The residues shown in bold correspond to the additional nucleotides in the primers we used compared to those recommended in the protocol provided on the web site of the Jackson Laboratory.

P3 WT FW : 5'-GACCCCTTGGGACTGAAGTT-3'

P3 KO FW: 5'-CCATGCGATAAGCTTGATGA-3'

P3 RV : 5'-CCACCCTCCAGTTTGGTTTA-3'

GF WT FW : 5'-TCGGACCCCTTGGGACTGA-3'

GF KO FW : 5'-ACTTTGTCCTGCTGCCTCCA-3'

GF RV : 5'-GTTTTGTTCCCCACCCTCCA-3'

The sizes expected from the various combinations of these six primers are listed in table 1.

Sexing primers [7]

Sry (441 bp, Y chromosome):

5'-TCATGAGACTGCCAACCACAG-3'

5'-CATGACCACCACCACCACCAA-3'

Myog (245 bp, X chromosome):

5'-TTACGTCCATCGTGGACAGC-3',

5'-TGGGCTGGGTGTTAGTCTTA-3'.

PCR

The PCR reactions were all performed in a final volume of 20 µl containing approximately 20 ng tail DNA. The PCR cocktail was made up to give the following final concentration when added to sample solution: 1X NEB PCR Reaction Buffer, 2,5 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs, 1 µM primers mix and 1 U Taq DNA Polymerase (NEB).

PCR conditions for P5-P6 amplification (with 500 nM of each primer) were as follows: denaturation at 94°C for 2 min followed by 30 cycles of 94°C for 30 s, annealing at 64°C for 30 s and extension at 72°C for 1 min, followed by a final extension step at 72°C for 5 min and the reactions were then held at 4°C until analysis.

PCR conditions for P5-P7 (with 500 nM of each primer) were as follows: denaturation at 94°C for 2 min followed by 30 cycles of 94°C for 30 s, annealing at 60°C for 30 s and extension at 72°C for 30 s, followed by a final extension step at 72°C for 5 min and the reactions were then held at 4°C until analysis.

PCR conditions for XY amplification were identical to those used for the P5-P7 pair, but with 250 nM of each of the four primers.

PCR conditions for P3 amplification (with 500 nM of P3 KO FW, 250 nM of P3 WT FW and 250 nM of P3 RV) were as follows: denaturation at 95°C for 2 min followed by 35 cycles of 95°C for 30 s, annealing at 64°C for 30 s and extension at 72°C for 40 s, followed by a final extension step at 72°C for 7 min and the reactions were then held at 4°C until analysis.

PCR products were all analysed by 1,5 % agarose gel electrophoresis in 1X TAE buffer, stained with ethidium bromide and photographed with Biorad gel doc XR using Quantity One 4.6.2 basic software. The molecular weight marker used was 100 bp DNA Ladder (New England Biolabs Inc).

PCR product purification, cloning and sequencing

The expected 415 bp P5-P7 and 426 bp P5-P6 amplification products were extracted and purified from a 1,5 % agarose gel using the QIAquick gel extraction kit (Qiagen).

They were afterwards cloned into pDrive Cloning vector following the recommended QIAGEN PCR cloning kit protocol and amplified by transformation into competent DH5-α bacteria. The recovered plasmids were then sequenced by the MilleGen company (Toulouse) using the T7 promoter primer.

The unexpected "ghost" P5-P6 or P5-P7 amplification products were re-amplified in secondary PCR reactions containing either both oligonucleotides or just the P5 primer. The resulting bands were then extracted and purified from a 1,5 % agarose gel using the QIAquick gel extraction kit (Qiagen), before cloning into the pCR 2.1-TOPO vector following the instructions of the TOPO TA Cloning kit (Invitrogen) and amplified by transformation into highly efficient TOP10 bacteria (Invitrogen). The recovered plasmids were then sequenced by the MilleGen company (Toulouse) using the M13 reverse primer.

Software

On-line web servers used in this study: Primer3 [8]; GeneFisher [9]; Blast [10]; CENSOR and Repbase [11].

Abbreviations

MeCP2- Methyl Cytosine binding Protein 2.

PCR- Polymerase Chain Reaction.

KO- Knock Out (mouse with invalidated gene).

WT- Wild Type.

bp- Base pair.

IL-2- Interleukin 2.

BAC- Bacterial Artificial Chromosome.

G- Guanidine.

C- Cytidine.

LTR- Long Terminal Repeat.

Competing interests

The author(s) declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

JM and EM performed the experiments, EJ supervised the work and wrote the paper.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge helpful conversations with Denis Hudrisier and Thierry Heidmann, and also to the anonymous reviewer for her/his very useful suggestions and comments. We wish to thank all people who con-

tributed to providing software for free use either on web servers or for downloading. This work was funded mostly by Association Française du Syndrome de Rett (AFSR), as well as core funds from CNRS, salaries were from FRM and MRT for JM, ITAV for EM and INSERM for EJ.

References

1. Amir RE, Van den Veyver IB, Wan M, Tran CQ, Francke U, Zoghbi HY: **Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2.** *Nat Genet* 1999, **23(2)**:185-188.
2. Guy J, Hendrich B, Holmes M, Martin JE, Bird A: **A mouse Mecp2-null mutation causes neurological symptoms that mimic Rett syndrome.** *Nat Genet* 2001, **27(3)**:322-326.
3. Chen RZ, Akbarian S, Tudor M, Jaenisch R: **Deficiency of methyl-CpG binding protein-2 in CNS neurons results in a Rett-like phenotype in mice.** *Nat Genet* 2001, **27(3)**:327-331.
4. Shahbazian M, Young J, Yuva-Paylor L, Spencer C, Antalffy B, Noebels J, Armstrong D, Paylor R, Zoghbi H: **Mice with truncated MeCP2 recapitulate many Rett syndrome features and display hyperacetylation of histone H3.** *Neuron* 2002, **35(2)**:243-254.
5. Jugloff DG, Logan R, Eubanks JH: **Breeding and maintenance of an Mecp2-deficient mouse model of Rett syndrome.** *J Neurosci Methods* 2006, **154(1-2)**:89-95.
6. Jurka J, Kapitonov VV, Pavlicek A, Klonowski P, Kohany O, Walichewicz J: **Rebase Update, a database of eukaryotic repetitive elements.** *Cytogenet Genome Res* 2005, **110(1-4)**:462-467.
7. Koopman P, Gubbay J, Vivian N, Goodfellow P, Lovell-Badge R: **Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry.** *Nature* 1991, **351(6322)**:117-121.
8. **Primer3** [http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi]
9. **GeneFisher** [<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/genefisher/>]
10. **Blast** [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>]
11. **CENSOR and Repbase** [<http://www.girinst.org/>]

Publish with **BioMed Central** and every scientist can read your work free of charge

"BioMed Central will be the most significant development for disseminating the results of biomedical research in our lifetime."

Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

Your research papers will be:

- available free of charge to the entire biomedical community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

Submit your manuscript here:
http://www.biomedcentral.com/info/publishing_adv.asp



Julie MIRALVÈS

EXPLORATION OF THE MECP2 IMMUNO-MODULATORY FUNCTIONS AND OF ITS INTERCELLULAR TRANSFER

Advisor : D^r Etienne JOLY

Mutations in the X-linked MECP2 gene are the cause of the Rett Syndrome (RTT), a progressive neurodevelopmental disorder leading to important neurological deficiencies. To date, despite the identification of MECP2 mutations as the central cause for RTT, the molecular basis for the pathogenesis of the syndrome still remains to be clearly elucidated. MeCP2 (Methyl-CpG-binding protein 2) has been shown to harbour a transcriptional repression activity, to be involved in RNA splicing regulation and to take part in the chromatin architecture. MeCP2 is therefore involved at many levels of genes' regulation.

MHC class I molecules are required in the brain for the establishment and maintenance of neuronal connections during development, in plastic remodelling and in neuronal signalling in specific brain areas. But at the same time, overall MHC expression is also tightly repressed in the mature central nervous system, which contributes to its immune privileged status. We hypothesized that MeCP2, the expression of is under strict temporal and spatial regulation in the brain, could contribute to repressing MHC expression in the brain.

We have actually found that, in transiently transfected cells, those that express very high levels of MeCP2 do indeed show a specific down-modulation of cell-surface basal and inducible expression of MHC class I molecules. But further experiments on two models related to Rett syndrome lead us to conclude that this repression is unlikely to be implicated in the pathogenesis of Rett syndrome. Nevertheless, an immunoregulatory function of MeCP2 appears to be involved in the periphery for the normal development of the immune system since MeCP2^{tm1.1Bird -/y} mice present significant quantitative and qualitative defaults of their thymic populations. Lastly, we show that, when MeCP2 is expressed by the N2A cells in culture, it transfers very rapidly and efficiently to the nucleus of adjacent cells. This transfer is apparently cell type and species specific and seems to be a neuronal property. Our work sheds light on new immuno-modulatory properties of MeCP2 and on its intercellular transfer propensity which could likely have important implications in designing therapies for RTT patients.

Julie MIRALVÈS

EXPLORATION DES RÔLES IMMUNO-MODULATEURS DE MECP2 ET DE SON TRANSFERT INTERCELLULAIRE

Directeur de Thèse : D^r Etienne JOLY

Soutenue le 19 octobre 2007 à l'Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, Toulouse.

Ces travaux ont consisté à évaluer l'hypothèse d'une régulation des gènes du CMH de classe I dans le système nerveux central par MeCP2, répresseur transcriptionnel dont les mutations sont responsables du syndrome de Rett. Un modèle de transfection transitoire nous a permis de mettre en évidence que la surexpression de MeCP2 conduit à une réduction spécifique de l'expression basale et inductible des molécules de CMH de classe I en surface cellulaire. Cependant, cette répression ne semble pas être impliquée dans la pathogenèse du syndrome de Rett. En revanche, MeCP2 semblerait être dotée de fonctions immuno-modulatrices en périphérie. Enfin, ces travaux de thèse ont également aboutit à découvrir la capacité de MeCP2 à être transmise très efficacement entre cellules adjacentes au sein de populations neuronales selon un mode espèce et tissu-spécifique. Ces travaux pourraient déboucher sur un nouvel éclairage des mécanismes physiopathologiques impliqués dans le syndrome de Rett.

Mots clés : MeCP2, Syndrome de Rett, Complexe Majeur d'Histocompatibilité, Régulation transcriptionnelle, Transfert intercellulaire.

Discipline : Neuro-Immunologie

Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, CNRS UMR5089
205 Route de Narbonne, 31077 Toulouse.