

Université de Liège



GIGA-Research

Faculté de Médecine
Département des
Sciences Biomédicales

La phénylcétonurie : étude de la myélinisation
du système nerveux central et contribution à la
thérapie génique

Génétique Humaine
Professeur V. Bours

Mémoire de
Thèse soumis par
Schoemans Renaud
En vue de l'obtention du grade de
Docteur en Sciences Biomédicales et Pharmaceutiques

Année académique
2009 - 2010

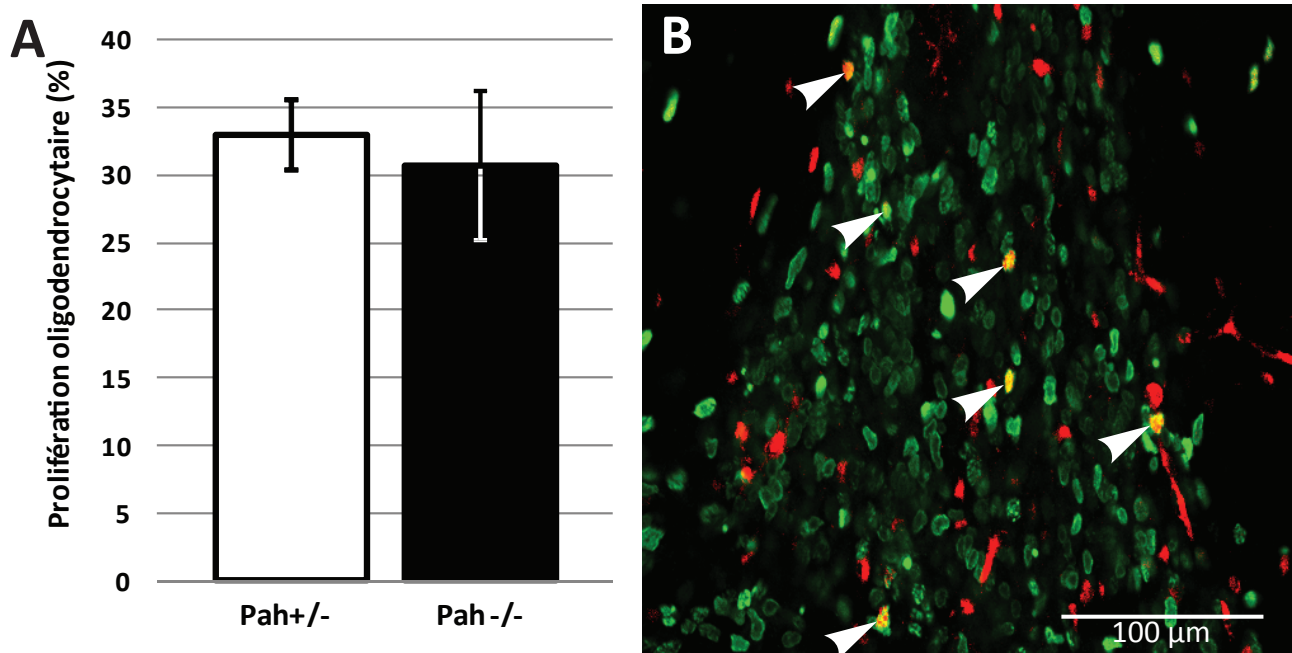


Figure R 1 : **A.** Taux de prolifération oligodendrocytaire dans la zone sous ventriculaire dorso latérale (ZSVDL) chez la souris BTBR $Pah^{enu2/J}$ hétérozygote (Pah+/-) et double mutante (Pah-/-) à l'âge de 8 jours. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules exprimant le marqueur oligodendrocytaire Olig2 et ayant incorporé la 5-bromo-2-déoxyuridine (BrdU) après 24h d'exposition par rapport au nombre total de cellules Olig2 positives de la zone. **B.** Immunomarquage d'une coupe de cerveau comprenant la ZSVDL d'un animal BTBR $Pah^{enu2/J}$. Les marquages anti-Olig2 (rouge) et anti-BrdU (vert) ont été réalisés. Les flèches indiquent les cellules doublement positives.

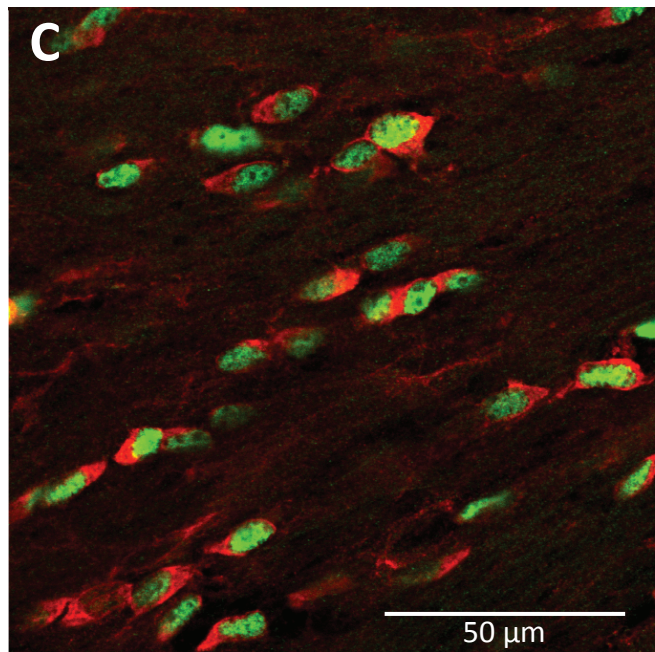
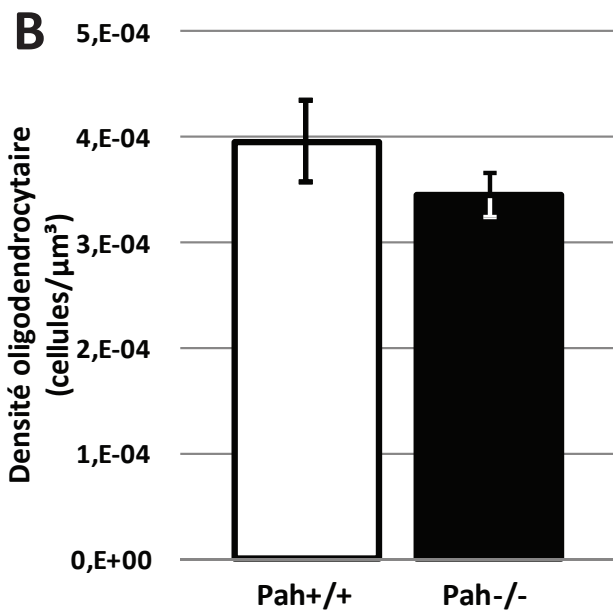
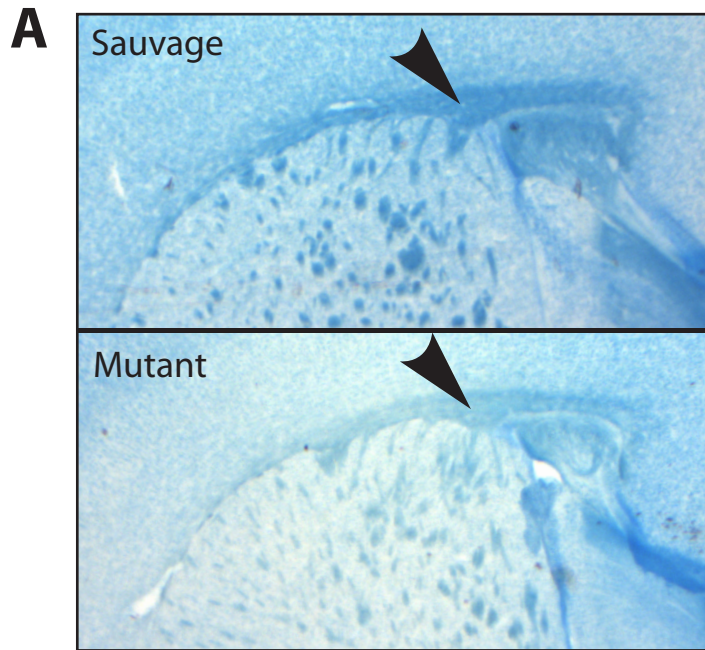


Figure R 2 : **A.** Coloration histologique des lipides au bleu luxol montrant une coloration plus pâle du corps calleux (flèches) chez l'animal BTBR Pah^{enu2}/J mutant (-/-) que chez un animal sauvage de la même lignée (+/+). **B.** Densité oligodendrocytaire mesurée dans le corps calleux d'animaux BTBR Pah^{enu2}/J de génotype sauvage (Pah+/+) et double mutant (Pah-/-) âgés de deux mois. Les données représentent la densité en oligodendrocytes matures, exprimant les marqueurs Olig2 et CC-1. **C.** Immunomarquage d'une coupe coronale de cerveau d'animal BTBR Pah^{enu2}/J passant par le corps calleux. Les marquages anti-Olig2 (vert) et CC-1 (rouge) ont été réalisés. La plupart des cellules expriment les deux marqueurs et peuvent dès lors être identifiées comme des oligodendrocytes matures.

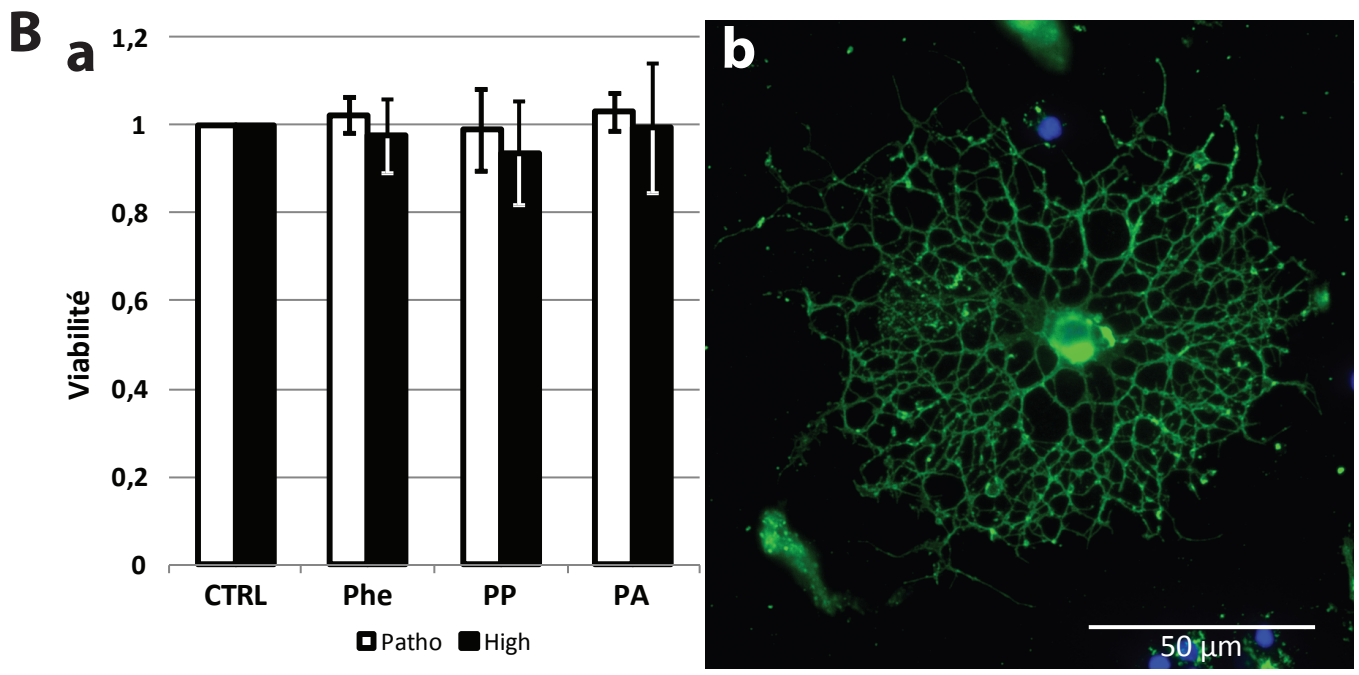
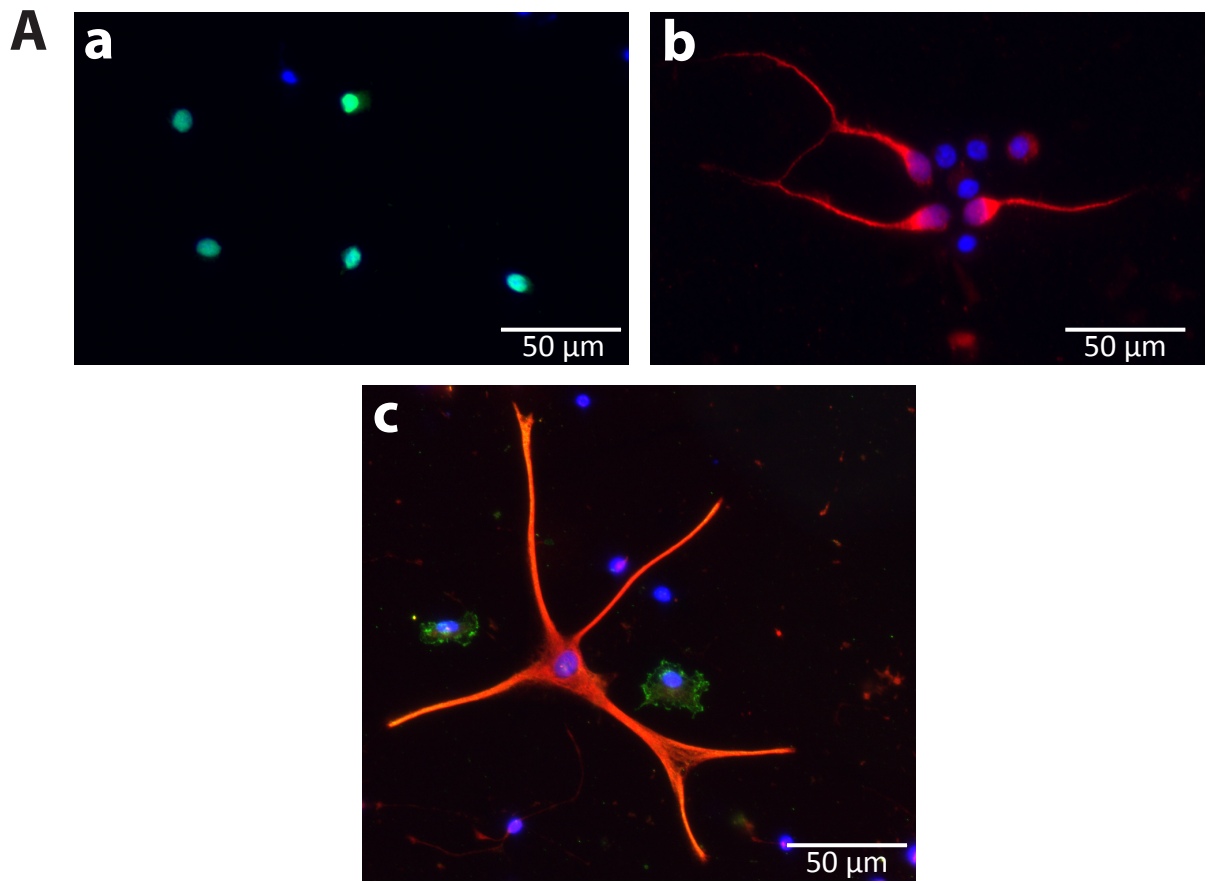


Figure R 3 : Population cellulaire enrichie en oligodendrocytes. **A.** Marquages réalisés après 48h de culture *in vitro*. **a.** Marquage anti-Olig2 (vert). **b.** Marquage anti-SMI 31 et 32 (rouge). **c.** Marquages anti-GFAP (rouge) et anti-OX42 (vert). Pour chaque image, les noyaux ont été marqués par Hoetsch (bleu). **B. a.** Test de viabilité d'une population cellulaire enrichie en oligodendrocytes réalisé après 6 jours d'exposition à la Phe, PP et PA à des concentrations pathologiques (Patho) et suprapathologiques (High). Ces concentrations sont respectivement de 1,6/5 mM, 2,2/22 µM, 7,4/74 µM pour la Phe, PP et PA. **b.** Marquage anti-O4 réalisé 48h après isolement.

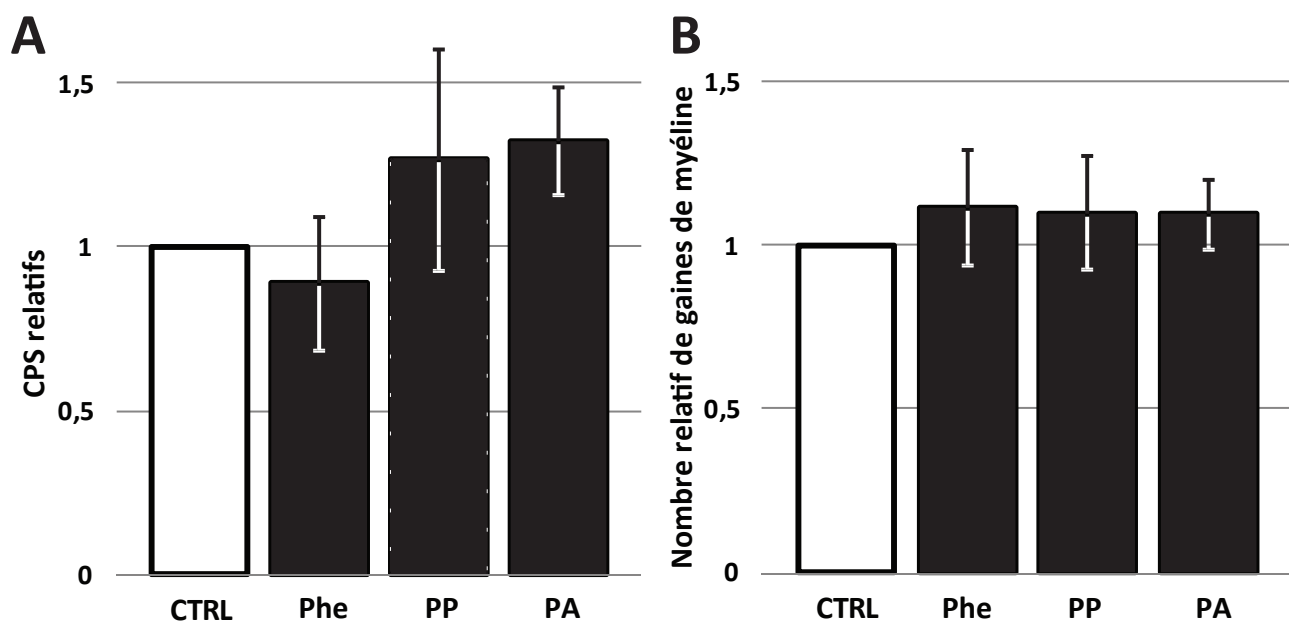


Figure R 4 : **A.** Essai quantifiant l'activité β -galactosidase dans des échantillons provenant de cocultures myélinisantes. Le degré de maturation des oligodendrocytes présents dans les cocultures a été évalué par quantification du degré de transactivation du promoteur MBP via une analyse luminométrique de l'activité β -galactosidase. Les résultats sont exprimés en terme de coups par seconde (CPS) comparés à la condition contrôle correspondante. **B.** Dénombrement par analyse optique humaine du nombre de segments de gaines de myéline positifs en marquage anti-PLP au sein de cocultures myélinisantes. Les résultats sont exprimés en tant que ratios des comptages obtenus des cultures exposées à la Phe (5 mM), PP (22 μ M) ou PA (74 μ M) comparés à ceux des échantillons contrôles correspondants. $P > 0,05$.

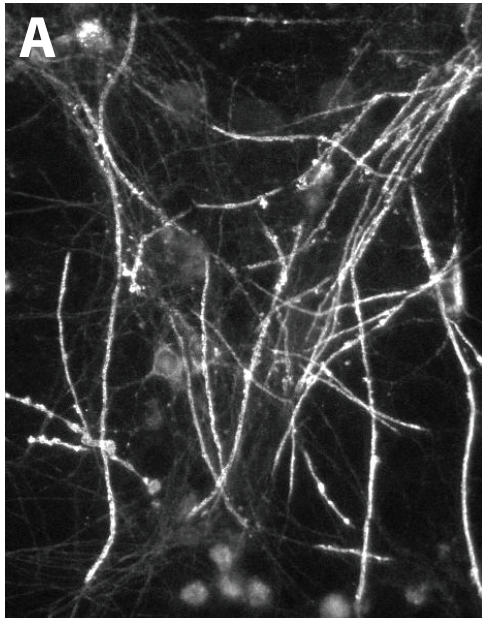
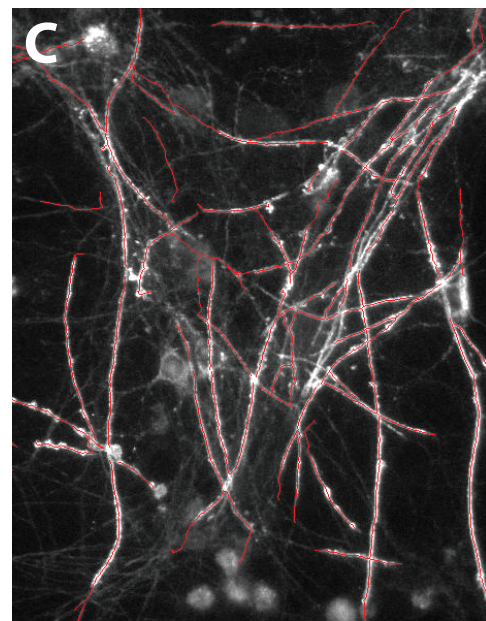


Figure R 5 : Illustration de la méthode bioinformatique de quantification des gaines de myéline. **A.** Le signal du marquage PLP (*i.e.* la myéline) est analysé par l'algorithme bioinformatique qui reconnaît les structures s'apparentant à des gaines de myéline et effectue un tracé de celles-ci (**B**). Ce tracé permet de dénombrer les gaines et d'évaluer leur longueur. **C.** La superposition du signal PLP (**A**) et du tracé (**B**) permet d'évaluer la pertinence de l'analyse bioinformatique.



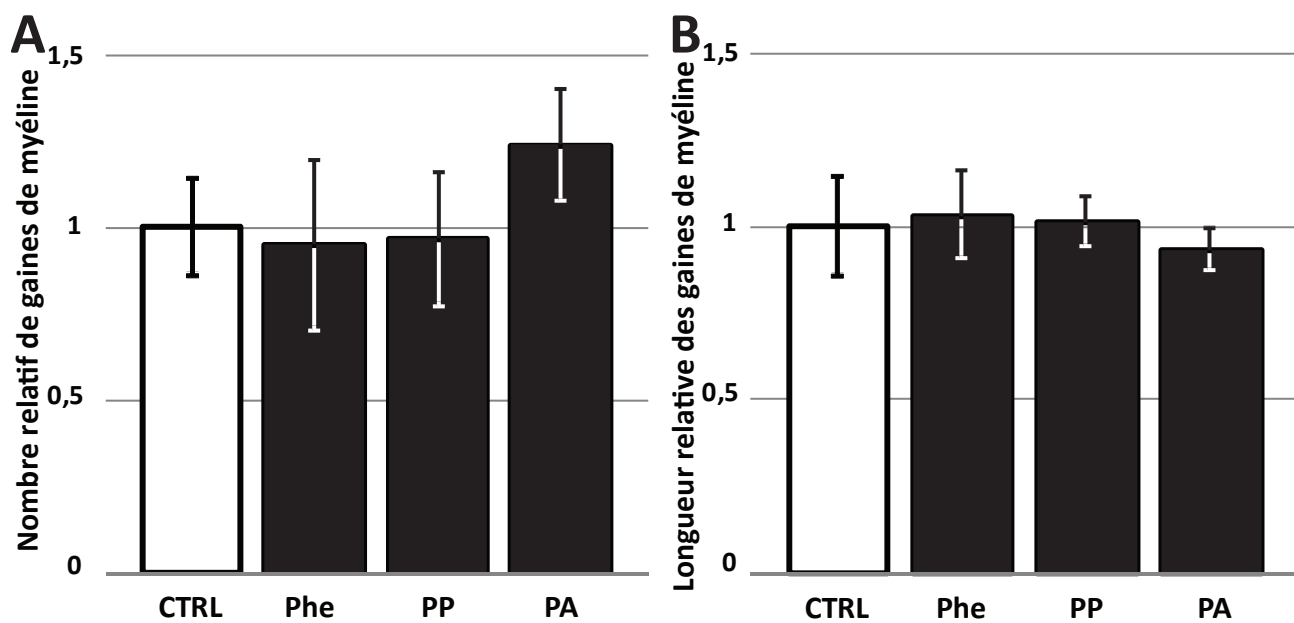


Figure R6 : Analyse bioinformatique des cocultures myélinisantes. **A.** Dénombrement des gaines de myéline sur la totalité de la surface de cocultures myélinisantes. **B.** Evaluation de la longueur moyenne des gaines de myéline à partir des mêmes échantillons. Les résultats sont exprimés en tant que ratios des scores obtenus des cultures exposées à la Phe (5 mM), PP (22 μ M) ou PA (74 μ M) comparés à ceux des échantillons contrôles correspondants. $P > 0,05$.