

Thesis, FRANZEN Rachelle

Auteur : Shehzad, Sadaf

Promoteur(s) : Lakaye, Bernard; Nguyen, Laurent

Faculté : Faculté de Médecine

Diplôme : Master en sciences biomédicales, à finalité approfondie

Année académique : 2025-2026

URI/URL : <http://hdl.handle.net/2268.2/25968>

Avertissement à l'attention des usagers :

Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative"(BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.

Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.

Etude de l'implication de la kinase CILK1 dans l'oligodendrogenèse

Laboratoire de régulation moléculaire de la neurogenèse

Sadaf SHEHZAD

Mémoire présenté en vue de l'obtention du
grade de Master en Sciences Biomédicales

2025-2026

Promoteur : Bernard LAKAYE
Co-promoteur : Pr. Laurent NGUYEN

Remerciements

Arrivée à terme de ce master, je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à ma formation.

Je tiens tout d'abord à remercier mon promoteur *Monsieur **Bernard LAKAYE*** de m'avoir donné l'opportunité de faire mon stage au sein du GIGA Neurosciences, Université de Liège. Je tiens à vous remercier pour votre encadrement tout au long de mon stage, votre accompagnement, vos conseils et remarques et surtout pour votre bonne humeur au quotidien. Et grâce à vous, j'aime de nouveau les neurosciences.

Je remercie également ***Bernard COUMANS***, technologue de laboratoire du labo NGUYEN, d'avoir répondu à mes questions lors de mes expériences et de m'avoir aidée quand j'en avais besoin. Un merci au personnel du GIGA pour leur gentillesse et leur bonne humeur. Et je n'oublie pas les doctorantes ***Manon, Coralie, Léa*** et ***Sylvia*** qui étaient toujours présentes quand j'avais des questions.

Je tiens particulièrement à remercier mes amies de passerelle ***Léa, Lola*** et ***Lisa***. Vous êtes de belles rencontres que je chérirai à jamais, sans vous ces années de master n'auraient pas été les mêmes. Merci d'avoir rendu nos moments de galère moins difficiles.

Je remercie de tout cœur mes amies ***Hamna, Maha, Youssra, Sadia*** et ***Soumaya*** d'avoir toujours cru en moi, d'avoir été présentes dans mes moments de doute et de m'avoir toujours encouragée. Ce parcours n'a pas toujours été facile, mais vos conseils et discussions ont toujours eu un réel impact sur moi et m'ont beaucoup aidée.

Enfin, je remercie mes parents, ma sœur et mon frère qui m'ont toujours soutenue et encouragée pendant mes études.

A tous ceux qui liront ce mémoire, j'espère que vous prendrez plaisir à sa lecture.

Table des matières

Introduction.....	1
1. Les épilepsies : définition et classification.....	1
2. L'épilepsie myoclonique juvénile (EMJ)	1
2.1. Phénotypes cognitifs et comportementaux	2
2.2. Neuroimagerie et anomalies cérébrales	3
2.3. Neuroimagerie précoce ou en l'absence de médication	4
2.4. La génétique de l'EMJ.....	4
3. La « Ciliogenesis Associated Kinase 1 »	5
3.1. Implication dans différentes pathologies	5
3.2. Structure et régulation de l'activité kinase.....	5
3.3. Cibles et partenaires.....	6
3.4. Participation à l'homéostasie du cil primaire	8
3.5. Expression tissulaire et cellulaire	9
3.6. Contribution au développement du cerveau	10
4. Le développement du cortex cérébral.....	11
4.1. Les neurones et la neurogenèse.....	12
4.2. Les oligodendrocytes et l'oligodendrogenèse	13
Hypothèses et objectifs.....	17
Matériel et méthodes.....	18
1. Modèle expérimental	18
1.1. Souris CILK1 knockout (KO).....	18
1.2. Souris Sox10-GFP-DTA	18
2. Détermination du génotype des souris par PCR.....	18
2.1. Extraction de l'ADN	18
2.2. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR).....	19
3. Prélèvement tissulaire	19
4. Immunohistochimie sur cerveau embryonnaire	20

4.1. Préparation des coupes de cerveau	20
4.2 Immunohistochimie.....	20
5. Extraction des protéines totales et analyse par Western blot	21
5.1. Extraction des protéines et quantification	21
5.2. Western blot.....	21
6. Analyse de populations cellulaires de cerveau embryonnaire par cytométrie en flux	22
6.1. Préparation de la suspension cellulaire.....	22
6.2. Immunomarquage	23
7. Fluorescence-activated nuclei sorting (FANS)	23
7.1. Dissociation tissulaire et fixation	23
7.2. Isolement des noyaux.....	23
7.3. Marquage des noyaux	24
7.4. Cytométrie en flux des populations nucléaires	24
8. Culture primaire d'OPC et différenciation en oligodendrocyte	24
8.1. Traitement des supports de culture	24
8.2. Isolement des OPCs	25
8.3. Culture et différenciation cellulaire	26
9. Analyse d'OPCs et d'OLs en culture par immunofluorescence.....	27
10. Analyse statistique.....	27
Résultats	29
1. Identification des souris CILK1 -/- et procédure de dissection.....	29
1.1. Génotypage	29
1.2. Répartition des embryons et stratégie expérimentale	29
2. Influence de CILK1 sur la neurogenèse et l'oligodendrogenèse corticale	30
2.1. Critères histologiques d'identification des régions rostro-caudales	30
2.2. Mesure de l'épaisseur corticale.....	30
2.3. Procédure pour le comptage automatisé.....	31
2.4. Mesure de la densité corticale en cellules Olig2+ et Ctip2+.....	31

3. Influence de CILK1 sur l'oligodendrogenèse hippocampique.....	32
4. Contribution de CILK1 à la neurogenèse et l'oligodendrogenèse du prosencéphale.....	33
4.1. Analyse du niveau d'expression des marqueurs Olig2, Ctip2 et Nkx2.1 par Western blot.....	33
4.2. Comptage des OPCs par FACS.....	34
4.3. Comptage des populations cellulaires par marquage des noyaux	34
5. Culture et différenciation cellulaire des OPCs	35
5.1. Méthodes d'isolement des OPCs.....	36
5.2. Culture et différenciation des OPCs	36
5.2.2. Après centrifugation différentielle	38
Discussion et perspectives.....	39
Bibliographie.....	45

Liste d'abréviations

¹H-MRS	Spectroscopie par résonance magnétique du proton
AEP	zone entopédonculaire antérieure
APC	<i>Adenomatous polyposis coli</i>
BSA	Albumine de sérum bovin
CDK	<i>Cyclin dependant kinase 20</i>
CDK20	<i>Cyclin dependant kinase 20</i>
CGE	Eminences ganglionnaires caudale
CILK1	<i>Ciliogenesis associated kinase 1</i>
cIN	Interneurone cortical inhibiteur
CLK	CDC-like kinases
CNP	2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase
ECO	Syndrome Endocrino-cérébro-ostéodysplasique
EMJ	Epilepsie myoclonique juvénile
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FANS	<i>Fluorescence-activated nuclei sorting</i>
FGF	Facteur de croissance des fibroblastes
GABA	Acide amino-butérique
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
Gli1	<i>Glioma-associated oncogene family zinc finger 1</i>
GSK3β	<i>Glycogen synthase kinase 3β</i>
IFT	Transport intraflagellaire
IRM	Imagerie par résonance magnétique
KLC3	Chaîne légère 3 de la kinésine
LGE	Eminence ganglionnaire latérale
MACS	<i>Magnetic-activated cell sorting</i>
MAK	<i>Male germ cell-associated kinase</i>
MBP	<i>Myelin basic protein</i>
MGE	Eminences ganglionnaires médiale
MOG	<i>Myelin oligodendrocyte glycoprotein</i>
MOK	<i>MAPK/MAK/MRK-overlapping kinase</i>
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>

NAA	N-acétylaspartate
OL	Oligodendrocyte
Olig2	<i>Oligodendrocyte transcription factor 2</i>
OPC	<i>Oligodendrocyte Precursor Cell</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PBS-T	Pbs-triton x-100 0,2%
PDGFRα	<i>Platelet-derived growth factor receptor alpha</i>
PLP	<i>Proteolipid protein</i>
PN	Neurone de projection excitateur
PS	Pénicilline/streptomycine
PTCH1	<i>Patched 1</i>
RCK	<i>Ros Cross-hybridizing Kinase</i>
RGCs	Cellules gliales radiaires
SDCCAG8	<i>Serologically defined colon cancer antigen 8</i>
SHH	Sonic Hedgehog
Smo	Smoothened
SNC	Système nerveux central
SOX10	Sry-box
SRP	Polydactilie à côtes courtes
T3	3,3',5-Triiodo-L-thyronine
TBS-T	<i>Tris-buffered-saline-tween</i>
TEP ou PET-Scan	Tomographie par Emission de Positons

Les IAs *ChatGPT -5.5* et *Google Gemini 1.5 Pro* ont été utilisées comme outils pour corriger la grammaire, l'orthographe, la syntaxe, améliorer la tournure des phrases, pour faciliter la compréhension des articles consultés ainsi que pour la correction et la traduction du résumé en anglais.

Résumé

L'épilepsie myoclonique juvénile (EMJ) est une épilepsie génétique apparaissant à l'adolescence, période caractérisée par la poursuite de la maturation cérébrale et de la myélinisation chez l'Homme. Parmi les gènes associés à cette maladie, CILK1 constitue un candidat d'intérêt en raison de son expression croissante lors de la différenciation des progéniteurs oligodendrocytaires (OPCs) en oligodendrocytes matures.

Ce travail visait à déterminer le rôle de CILK1 dans la production et la prolifération des OPCs ainsi qu'à développer des méthodes permettant d'étudier son implication dans l'oligodendrogenèse. L'analyse de souris dépourvues de CILK1 (KO) a montré une diminution généralisée de l'épaisseur corticale, suggérant une altération de la neurogenèse. En revanche, l'oligodendrogenèse corticale apparaît relativement préservée malgré des variations régionales de la densité des cellules Olig2+. Ces résultats ne semblent pas pouvoir être expliqués uniquement par une perturbation de la voie SHH, pourtant essentielle au développement des oligodendrocytes. D'autres voies de signalisation, notamment celles impliquant les facteurs FGF, pourraient être concernées. À l'inverse, une diminution importante des cellules Olig2+ est observée dans l'hippocampe et plusieurs structures associées, indiquant un rôle plus marqué de CILK1 dans ces régions.

L'étude du prosencéphale a combiné différentes approches. Les analyses par western blot ont révélé une augmentation de l'expression de Ctip2 et une légère diminution de Nkx2.1, suggérant des altérations du développement de certaines populations neuronales. Aucune modification significative d'Olig2 n'a cependant été détectée par cette méthode. La cytométrie en flux sur noyaux (FANS) a mis en évidence une réduction du nombre de neurones et d'OPCs chez les souris KO, confirmant l'existence de défauts du développement cérébral.

Enfin, plusieurs méthodes d'isolement d'OPCs ont été comparées. Le tri cellulaire par FACS s'est révélé le plus performant en termes de pureté et de viabilité. Des protocoles fiables de culture, de prolifération et de différenciation des OPCs ont également été établis. Ces travaux ont par ailleurs montré que certaines cellules Olig2+ correspondent probablement à des astrocytes, soulignant la nécessité d'utiliser des marqueurs complémentaires pour mieux caractériser les populations cellulaires étudiées.

En conclusion, notre étude suggère que CILK1 joue un rôle important dans le développement cérébral en modulant la réponse de différentes populations de progéniteurs aux morphogènes, tout en fournissant de nouveaux outils pour approfondir l'étude de son implication dans l'oligodendrogenèse.

Abstract

Juvenile myoclonic epilepsy (JME) is a genetic generalized epilepsy that emerges during adolescence, a developmental period characterized in Human by ongoing brain maturation and myelination. Among the genes associated with this disorder, CILK1 is of particular interest because its expression increases during the differentiation of oligodendrocyte progenitor cells (OPCs) into mature oligodendrocytes.

The aim of this study was to investigate the role of CILK1 in OPC production and proliferation, while also developing methods to assess its involvement in oligodendrogenesis. Analysis of CILK1 knockout (KO) mice revealed a generalized reduction in cortical thickness, suggesting impaired neurogenesis. In contrast, cortical oligodendrogenesis appeared largely preserved, although regional variations in the density of Olig2-positive cells were observed. These findings cannot be fully explained by alterations in the SHH signaling pathway alone, despite its well-established role in oligodendrocyte development. Other signaling pathways, particularly those involving fibroblast growth factors (FGFs), may also contribute. In contrast, a marked reduction in Olig2-positive cells was detected in the hippocampus and related structures, indicating a more prominent role for CILK1 in these regions.

Several complementary approaches were used to investigate forebrain development. Western blot analyses revealed increased expression of Ctip2 and a slight decrease in Nkx2.1 expression, suggesting alterations in the development of specific neuronal populations. However, no significant changes in Olig2 expression were detected using this method. Flow cytometry analysis of isolated nuclei (FANS) demonstrated a reduction in both neuronal and OPC populations in KO mice, further supporting the presence of developmental abnormalities.

Finally, different OPC isolation methods were compared. Fluorescence-activated cell sorting (FACS) proved to be the most effective technique in terms of cell purity and viability. Reliable protocols for OPC culture, proliferation, and differentiation were also established. These experiments further revealed that a proportion of Olig2-expressing cells are likely astrocytes, highlighting the need for additional markers to accurately characterize the cellular populations under investigation.

Overall, this preliminary study suggests that CILK1 plays an important role in brain development by modulating the response of various progenitor populations to developmental morphogens. In addition, the establishment of primary OPC cultures provides valuable tools for future investigations into the role of CILK1 in oligodendrogenesis.

Introduction

Introduction

1. Les épilepsies : définition et classification

L'épilepsie est une affection chronique du système nerveux central qui se caractérise par la répétition de crises d'épilepsie. Une crise d'épilepsie est l'expression clinique d'un dysfonctionnement d'une population de neurones déchargeant de manière anormale dite paroxystique. Les symptômes observés lors d'une crise varient selon la localisation de la zone cérébrale à l'origine des décharges ¹.

La ligue internationale contre l'épilepsie (ILAE) a établi une classification des syndromes épileptiques sur base de différents critères. Sur base de critères électroencéphalographiques, ils sont divisés en deux grandes catégories : les épilepsies partielles et les épilepsies généralisées ².

Les épilepsies focales prennent naissance dans une région limitée du cortex d'un seul hémisphère cérébral, communément appelé foyer ou zone épileptogène. En fonction de la localisation de ce foyer, les manifestations cliniques seront différentes : motrices, sensibles, sensorielles, végétatives, affectives. Les épilepsies partielles peuvent rester confinées à la zone épileptogène ou s'étendre à un ou aux deux hémisphères cérébraux, conduisant à une généralisation secondaire ¹.

Les épilepsies généralisées affectent les aires corticales et sous corticales des deux hémisphères cérébraux simultanément. Elles peuvent être soit de type « convulsives », s'accompagnant de signes cliniques moteurs (toniques, cloniques, tonico-cloniques, atoniques ou myocloniques) et généralement d'une perte de connaissance, soit de type « non convulsives », caractérisées par une suspension brève de la conscience ¹.

Les syndromes épileptiques peuvent être également classés selon leur étiologie. On distingue de cette manière les épilepsies d'origine symptomatique résultant d'une lésion (suite à une maladie ou un traumatisme) et les épilepsies d'origine génétique ².

L'épilepsie myoclonique juvénile (EMJ), est la principale forme d'épilepsie généralisée génétique (GGE), qui comprend trois autres syndromes : l'épilepsie-absence de l'enfant (CAE), l'épilepsie-absence juvénile (JAE) et l'épilepsie avec crises tonico-cloniques généralisées (GTCS)¹.

2. L'épilepsie myoclonique juvénile (EMJ)

Trois types de crises peuvent être observés chez les patients atteints d'EMJ³ :

- 1) Les secousses myocloniques (SM). Elles constituent la condition sine qua non de ce syndrome. Elles se traduisent par de brèves contractions musculaires bilatérales et arythmiques qui prédominent au niveau des membres supérieurs.

- 2) Les crises tonico-cloniques généralisées (GTCS), également appelées « grand mal impulsif », sont présentes chez 80 à 95 % des patients. Elles comportent deux phases : une phase tonique caractérisée par une perte de conscience avec rigidité de l'ensemble des membres, et une phase clonique consistant en des secousses rythmiques et soutenues des dits membres.
- 3) Les crises d'absence qui concernent 10 à 40 % des patients. Ces crises correspondent à une interruption soudaine et brève (moins de 15 secondes) de l'activité, dont les patients n'ont généralement pas conscience.

L'EMJ est traditionnellement considérée comme une maladie de la puberté puisque les symptômes apparaissent principalement entre 12 et 18 ans ($15 \pm 3,5$ ans) ³.

Conformément à la définition l'ILAE, la privation de sommeil précipite les crises dans plus de 50 % des cas mais d'autres facteurs tels que le stress ou la consommation d'alcool peuvent également les provoquer ⁴.

Le traitement des patients souffrant d'EMJ est relativement efficace, avec environ 60-75 % d'entre eux devenant libres de crises. Cependant, dans la majorité des cas (60–80 %) des rechutes surviennent après l'arrêt de la médication antiépileptique. L'acide valproïque est considéré comme le traitement de première intention en raison de sa grande efficacité. Toutefois, son effet tératogène lors d'une exposition *in utero* le rend inutilisable pour les femmes enceintes ce qui a encouragé le développement et l'utilisation d'autres molécules pouvant être prescrites pendant la grossesse, tels que le lévétiracétam, le topiramate, la lamotrigine ou la zonisamide. Signalons qu'une pharmacorésistance survient chez environ 30% des patients³.

2.1. Phénotypes cognitifs et comportementaux

Au-delà de ces aspects épileptiques typiques, les patients atteints d'EMJ présentent également certains déficits cognitifs et des troubles des traits de personnalité. Globalement, les patients ne montrent pas de différence significative du quotient intellectuel (QI). Cependant, ils nécessitent davantage de répétitions pour l'apprentissage et présentent des déficits de l'attention ainsi qu'au niveau de certaines fonctions exécutives telles que la planification, la flexibilité cognitive ou la fluence verbale³.

D'autre part, bien que l'EMJ ne soit pas définie comme un trouble psychiatrique, les patients présentent une plus grande propension à l'anxiété, à la dépression ou à d'autres troubles de l'humeur. Ils ont aussi tendance à être émotionnellement instables, avec une légère tendance à manifester une personnalité impulsive³.

2.2. Neuroimagerie et anomalies cérébrales

L'imagerie médicale de routine de l'EMJ est habituellement considérée comme normale. Néanmoins, le développement de méthodes de neuroimagerie quantitative a depuis lors révélé l'existence de nombreuses variations dans le cerveau des patients EMJ, mais les bases cellulaires et/ou moléculaires responsables de ces variations sont difficilement identifiables³.

2.2.1. Anomalies structurelles

L'imagerie par résonance magnétique (IRM) est une technique de choix pour mesurer des variations au niveau de la substance grise et de la substance blanche du cerveau, respectivement associés au corps des cellules (neurones, gliales, dendrites) et aux axones myélinisés³.

La majorité des études rapportent une diminution du volume de la substance grise du thalamus chez les patients atteints d'EMJ. En revanche, une augmentation du volume de la substance grise dans le cortex frontal est généralement observée sauf au niveau de l'aire motrice supplémentaire (AMS) où une diminution a été constatée³.

Quant à la substance blanche, l'imagerie par tenseur de diffusion (DTI) révèle aussi diverses anomalies. Plusieurs études ont mis en évidence des atrophies et des altérations structurelles du corps calleux. De plus, des anomalies des fibres extracorticales ont été constatées dans des faisceaux reliant les lobes frontal, occipital, pariétal et temporal de ces patients³.

2.2.2. Altérations moléculaires

La spectroscopie par résonance magnétique du proton (¹H-MRS) permet de détecter et de mesurer les quantités de différents métabolites dans un tissu. Les résultats les plus cohérents, rapportés dans six études distinctes, révèlent une diminution du taux de NAA ou du rapport NAA/créatine dans le thalamus³. Le NAA est un indice *in vivo* de l'intégrité de l'axone et de la myéline, principalement parce qu'il est synthétisé dans les neurones et dégradé dans les oligodendrocytes, reflétant directement la santé métabolique de l'unité neurone-glie³.

Les études basées sur la Tomographie par Emission de Positons (PET-Scan) ont révélé des altérations au niveau du système dopaminergique dans différentes structures cérébrales dont le putamen et la substance noire. Ces modifications pourraient être associées aux myoclonies et/ou au phénotype cognitif rapporté chez ces patients³.

2.2.3. Altérations fonctionnelles

La présence de nombreuses anomalies structurelles, bien que souvent subtiles, suggère l'existence d'altérations de l'activité fonctionnelle dans le cerveau de ces patients. L'analyse de la synchronisation des fluctuations de l'activité sanguine (signal BOLD) entre différentes régions permet d'établir une

connectivité fonctionnelle (CF) cérébrale. À l'état de repos, ce type d'étude a révélé une augmentation significative de la CF dans les régions impliquées dans les fonctions cognitives et exécutives, dans des régions sous-corticales, ainsi que dans le cortex moteur primaire³.

2.3. Neuroimagerie précoce ou en l'absence de médication

Comme les résultats présentés ci-dessus concernaient tous des études transversales, il demeure la question de savoir si ces variations ne peuvent résulter de la répétition de crises ou d'une médication prolongée puisqu'il est bien établi que le valproate peut induire des modifications épigénétiques³.

Deux études réalisées au début de l'apparition des crises chez des individus nouvellement diagnostiqués ont révélé que les différences de volume de matière grise et les anomalies de la substance blanche observés ne résultent pas des crises chroniques ou du traitement par des médicaments antiépileptiques mais plutôt de processus antérieurs à l'apparition des crises³.

Enfin, une étude a comparé pendant 2 ans des enfants EMJ diagnostiqués au cours des 12 derniers mois et un groupe témoin. Si des différences comportementales existaient dès le départ entre les deux groupes et qu'ils se sont tous deux améliorés au fil du temps, le groupe EMJ n'a pas rattrapé le groupe contrôle. D'autre part l'IRM cérébrale a révélé des anomalies dans le développement structural, caractérisées par une atténuation du déclin du volume cortical lié à l'âge, suite principalement à une dysmaturation de l'épaisseur corticale³.

2.4. La génétique de l'EMJ

Les études menées par Lennox sur des jumeaux ont été les premières à révéler l'importance de la génétique dans les épilepsies³. Ces premières observations ont ensuite été confirmées par d'autres recherches démontrant une forte concordance des GGE chez les paires de jumeaux monozygotes (MZ) par rapport aux jumeaux dizygotes (DZ), confirmant clairement la primauté des facteurs génétiques pour ces syndromes³.

Bien qu'établie comme une épilepsie d'origine génétique, la recherche des gènes impliqués dans l'EMJ s'est révélé être un véritable défi. Les études « liaisons entre gènes » ou linkage ont identifié 16 locus chromosomiques associés à des formes mendéliennes de cette épilepsie³. Pour six de ces locus, le gène muté a été identifié, il s'agit de la sous-unité alpha1 du récepteur GABA_A (GABRA1), de la sous unité delta de ce même récepteur (GABRD), de la protéine contenant un domaine *EF-hand* (EFHC1), la protéine 2 contenant un bromodomaine (BRD2), un récepteur sensible au calcium (CaSR) et la kinase des cellules de l'intestin (ICK) maintenant renommée « kinase 1 associée à la ciliogenèse » (CILK1). Toutefois, aucun d'entre eux n'est spécifiquement défini comme un « gène majeur de susceptibilité », c'est-à-dire muté chez une large proportion de patients atteints d'EMJ³.

Il est désormais proposé qu'une grande partie des épilepsies génétiques ne résulte pas de la mutation d'un seul gène, mais plutôt de mutations polygéniques. Autrement dit, une mutation isolée n'est pas suffisante pour provoquer des crises, mais, en combinaison avec d'autres variations génétiques, elle peut conduire à des syndromes ou des traits épileptiques⁵.

3. La « Ciliogenesis Associated Kinase 1 »

3.1. Implication dans différentes pathologies

Comme nous venons de l'expliquer, des études génétiques portant sur l'EMJ ont identifié CILK1 comme un gène muté dans certaines familles. Sur les six mutations identifiées dans ces familles, cinq sont des mutations faux sens et une est mutation non-sens éliminant le dernier acide aminé de la protéine. Ces mutations se répartissent tout le long de la protéine (Figure 1). Signalons que toutes ces mutations sont retrouvées uniquement à l'état hétérozygote dans les familles analysées⁶.

Auparavant, trois mutations faux sens homozygotes avaient été identifiées chez quelques embryons souffrant de syndromes dénommés Endocrino-Cérébro-Ostéodysplasique (ECO) et polydactylie à côtes courtes (SRP)^{7,8}. Ces syndromes font partie des « ciliopathies » et se caractérisent par des anomalies congénitales multiples touchant le système endocrinien, cérébral et squelettique. L'atteinte squelettique comprend une micromélie, une polydactylie et des anomalies crâniofaciales (fente palatine et labiale). L'atteinte endocrinienne comprend une hypoplasie des glandes surrénales et de l'hypophyse et des organes génitaux ambigus. L'atteinte cérébrale comprend une hydrocéphalie ventriculaire, une holoprosencéphalie et une agénésie du corps calleux. Des anomalies sont aussi observées au niveau des reins, du cœur, du pancréas et des intestins^{7,8}. Comme illustré sur la Figure 1, ces trois mutations se concentrent dans la partie N-terminale de la protéine et deux d'entre elles (E80K et R272Q) affectent clairement l'activité kinase.

3.2. Structure et régulation de l'activité kinase

La « *Ciliogenesis Associated Kinase 1* » (CILK1), anciennement appelée *Intestinal cell kinase*, est une sérine/thréonine kinase de 632 acides aminés appartenant au sous-groupe *Ros Cross-hybridizing Kinase* (RCK) du kinome humain, qui inclut également la « *Male germ cell-associated kinase* » (MAK) et la « *MAPK/MAK/MRK-overlapping kinase* » (MOK). Au niveau structural, elle comprend deux domaines

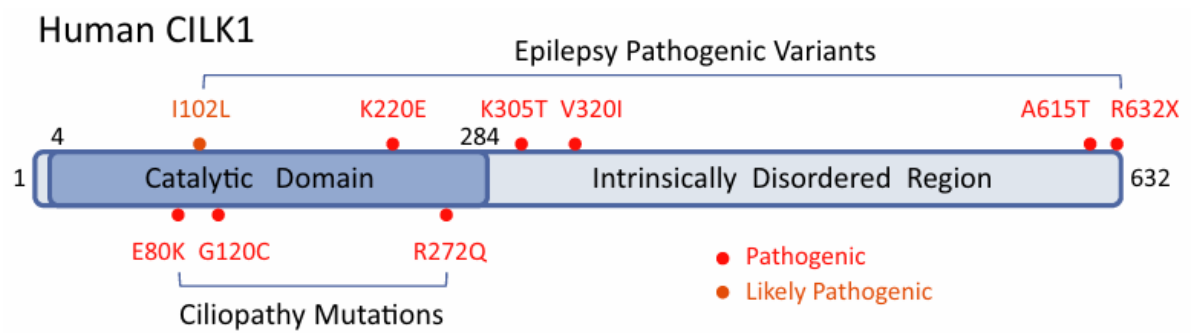


Figure 1 : Structure des domaines de la protéine CILK1 humaine et localisation des variants pathogènes identifiés dans les ciliopathies et l'épilepsie humaine (Figure tirée de Fu et al., 2019)⁹.

La protéine CILK1 humaine comporte deux domaines : le domaine catalytique du côté N-terminal (4–284 aa) et du côté C-terminal (285–632 aa), une région intrinsèquement désordonnée impliquée dans l'interaction avec les substrats

(Figure 1). Le domaine catalytique, englobant la moitié N-terminale de la protéine (résidus 1-284), présente une forte similarité avec les autres RCK et des similarités significatives avec plusieurs MAPK, notamment par la présence d'un motif TDY dans la boucle d'activation¹⁰. En revanche, son domaine C-terminal (résidus 285-632) diverge fortement même au sein des membres du sous-groupe RCK. En réalité, le côté C-terminal de CILK1 est une région désordonnée intrinsèquement, elle n'a donc pas une structure tridimensionnelle bien définie mais possède des motifs linéaires courts permettant des interactions d'autres protéines, déterminant de la sorte la spécificité des substrats reconnus par la kinase¹¹. Les travaux publiés récemment ont démontré que cette région contribue à la liaison aux substrats et la localisation subcellulaire de CILK1¹². Signalons la présence d'un « sous-domaine » localisé entre les résidus 254 et 284 permettant la localisation nucléaire et essentiel *in vitro* pour l'activité catalytique contre un substrat « standard » tel que la *Myelin Basic Protein*¹³. En effet, les mutants R272Q et E80K montrent une modification de la distribution cellulaire de la protéine, le premier étant majoritairement cytosolique et le second principalement nucléaire après surexpression en cellules HEK293⁸.

L'activité de CILK1 est régulée par phosphorylation de résidus appartenant au motif TDY, caractéristique des MAPKs, localisé dans la boucle d'activation de l'enzyme¹⁰ (Figure 2). La phosphorylation du résidu T¹⁵⁷ par la *cyclin dependant kinase 20* (CDK20) active CILK1, tandis que la déphosphorylation de ce même résidu par la phosphatase 5 (PP5), notamment en réponse au stress oxydatif, l'inactive¹⁴. L'activation complète de l'enzyme nécessite l'autophosphorylation du résidu Y¹⁵⁹ de ce motif¹⁴. Enfin, CILK1 peut être partiellement inactivée par la phosphorylation du résidu conservé Y¹⁵, médiée par le récepteur FGFR3 responsable de la signalisation du facteur de croissance des fibroblastes (FGF)¹⁵. Signalons qu'il a été démontré que l'autophosphorylation du résidu T¹⁵⁹ est diminuée de 70% chez le mutant R272Q et qu'elle est absente chez le mutant E80K⁸.

3.3. Cibles et partenaires

En tant que kinase, CILK1 peut phosphoryler et/ou interagir avec diverses protéines et ainsi moduler plusieurs voies de signalisation cellulaire. La séquence consensus de phosphorylation des substrats de CILK1 est [R]–[P]–[X]–[S/T] – [P/A/S/T], avec une préférence marquée pour l'arginine en position -3 et la proline en position -2⁹. A ce jour 5 cibles et 2 partenaires ont été identifiées (Figure 2).

Le premier substrat de CILK1 identifié est Scythe, aussi connu sous le nom de Bag6/Bat3¹⁴. Il s'agit d'une protéine chaperonne impliquée dans la régulation de la biogenèse et la dégradation des protéines¹⁶ et dont il a été montré qu'elle participait à l'autophagie¹⁷. CILK1 phosphoryle Scythe sur le

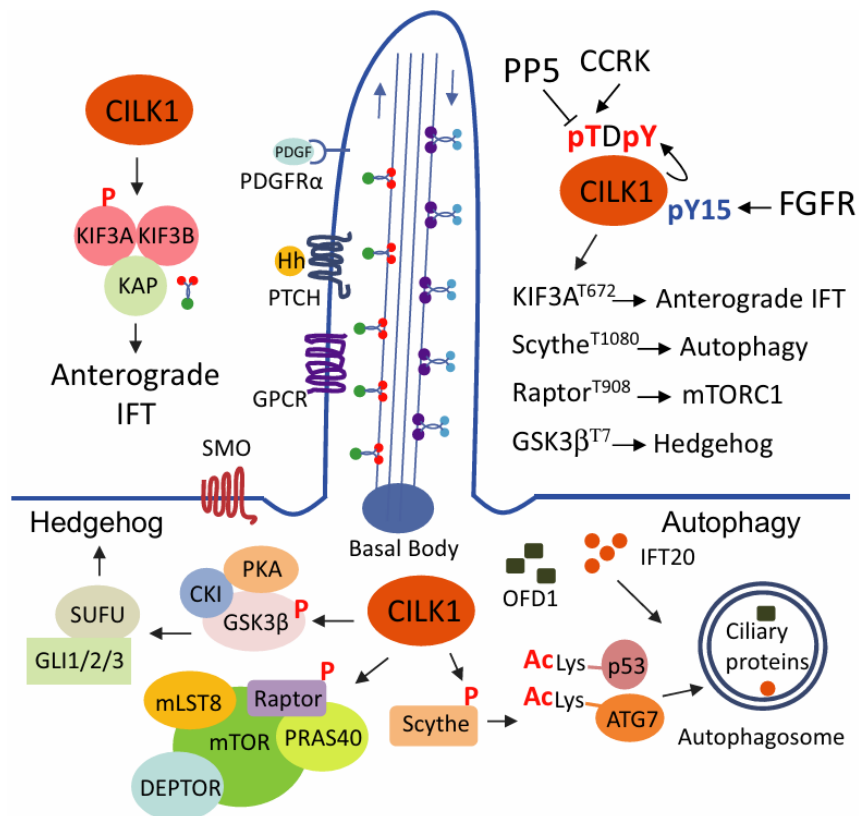


Figure 2 : Modèle fonctionnel hypothétique du contrôle de la signalisation par CILK1 (Figure tirée de Fu 2019)⁹.

L'activité de CILK1 peut être régulée par la phosphorylation du motif TDY et du site régulateur conservé Y15. CILK1 est localisée dans le cil primaire, qui constitue un environnement cellulaire unique avec une concentration plus élevée de seconds messagers tels que le calcium et l'AMP cyclique, ainsi que de nombreuses voies de signalisation comme HH, PDGFR- α , TGF- β et WNT. La manière dont CILK1 est régulée à la hausse et à la baisse dans cet environnement de signalisation particulier reste largement inconnue. Quatre substrats candidats (KIF3A, Scythe, Raptor et GSK-3 β) de CILK1 ont été identifiés et pourraient potentiellement médier les effets de CILK1 sur la structure, la signalisation et la fonction des cils. La manière dont ces substrats médient les effets de CILK1 sur la morphologie et la fonction des cils reste encore mal définie.

résidu thréonine 1080¹⁴. Toutefois, l'impact de cette phosphorylation sur les propriétés cellulaires de Scythe nécessite des investigations supplémentaires.

La kinésine KIF3A contient également une séquence consensus de phosphorylation reconnue par CILK1. Cette protéine forme des hétérodimères avec Kif3B qui interviennent dans le transport intraflagellaire (IFT) au sein du cil primaire¹⁸. L'IFT est un processus de transport bidirectionnel assuré par des kinésines pour le transport antérograde et par la dynéine pour le transport rétrograde. L'IFT antérograde est essentiel pour la formation et le maintien de la structure du cil primaire¹⁹. Ces éléments suggèrent ainsi un rôle pour cette kinase dans la régulation du transport intraciliaire¹².

La troisième cible de CILK1 est Raptor. Cette protéine fait partie du complexe mTOR 1 (mTORC1) et agit comme une protéine adaptatrice qui recrute les substrats vers *Mammalian target of rapamycin* (mTOR)²⁰. Ce complexe intègre des signaux nutritifs, hormonaux et énergétiques régulant la synthèse protéique et par conséquent la croissance et la prolifération cellulaire²¹. Il a été montré que CILK1 phosphoryle Raptor au niveau de la T⁹⁰⁸. Le remplacement de ce résidu par une alanine n'affecte pas l'assemblage du complexe mTORC1 mais entraîne une diminution significative de l'activité ainsi qu'une réduction de l'expression de ses cibles, telles que la cyclinD1 et c-Myc^{22,23}. Dans les cellules épithéliales intestinales, la prolifération et la progression de la phase G1 du cycle cellulaire sont perturbées en l'absence de CILK1²³. Ces recherches suggèrent que CILK1 pourrait réguler la prolifération et la progression du cycle cellulaire via mTORC1⁹.

La *Glycogen synthase kinase 3β* (GSK-3β) est une autre cible de CILK1. Cette kinase intervient dans plusieurs processus cellulaires, notamment la ciliogenèse et la voie de signalisation Sonic Hedgehog (SHH). L'analyse de la structure tridimensionnelle suggère un mécanisme inhibiteur intramoléculaire dans lequel l'extrémité N-terminale phosphorylée peut agir comme un pseudo-substrat compétitif, occupant la poche de liaison (chargée positivement) pour les substrats. En phosphorylant le résidu Thréonine en 7ème position, CILK1 augmente l'activité de GSK3-β et bloque l'inhibition résultant de la phosphorylation du résidu S⁹ par AKT²⁴. Ces observations suggèrent que CILK1 participe à la régulation de l'activité de la kinase GSK3-β.

Récemment il a été observé que CILK1 était fortement exprimé dans le cancer du sein et que cette protéine favorisait la prolifération et la chimiorésistance de ces cellules cancéreuses. Elle est aussi requise pour la chimiorésistance des cancers du poumon à petites cellules²⁵. La cible de CILK1 dans ces cellules cancéreuses est le résidu Thr²⁰² de la kinase ERK1. Ces observations suggèrent que CILK1 joue un rôle majeur dans certains cancers, notamment par son action sur la voie de signalisation Ras/Raf/MEK/ERK, dont l'implication dans la progression tumorale est bien établie²⁵.

Deux partenaires de CILK1 ont également été identifiés. Nous parlons ici de partenaires et non de cible car il n'a pas été démontré, ni recherché semble-t-il, que CILK1 soit capable de les phosphoryler. Le premier partenaire, identifié dans les cellules du rein est KLC3 (chaîne légère 3 de la kinésine), une kinésine qui favorise le transport du complexe IFT-B²⁶. En l'absence de CILK1 dans les cellules des tubes collecteurs rénaux, l'expression de KLC3 est augmentée ce qui conduit à une accumulation du complexe IFT-B à l'extrémité du cil primaire et à la formation de kystes rénaux²⁶. Le second est la protéine *Serologically defined colon cancer antigen 8* (SDCCAG8). Cette protéine est connue pour se localiser au niveau du centrosome et du corps basal des cils primaires via les 180 résidus de l'extrémité C-terminale²⁷. Cette région C-terminale est aussi impliquée dans l'interaction avec CILK1 mais aussi MAK. La diminution de son expression dans différentes lignées cellulaires diminue significativement le nombre de cellules ciliées et la longueur des cils primaires. Le phénotype des souris exprimant une forme tronquée de SDCCAG8 est fort semblable à celui rapporté chez les souris déficientes en CILK1²⁷.

3.4. Participation à l'homéostasie du cil primaire

Le cil primaire est une protrusion apicale de la cellule soutenue par des microtubules, présent chez la majorité des cellules eucaryotes. Il joue un rôle central dans la détection des signaux environnementaux et la transmission des signaux extracellulaires²⁸ grâce aux récepteurs (à tyrosine kinase ou encore couplés aux protéines G) et aux canaux ioniques localisés à sa surface²⁹. Ainsi, toute altération structurelle ou fonctionnelle du cil primaire perturbe ses fonctions sensorielles et de signalisation, entraînant généralement des défauts de l'homéostasie cellulaire. Ces dysfonctionnements sont à l'origine de diverses pathologies regroupées sous le terme de ciliopathies²⁹.

Parmi les acteurs clés impliqués dans la formation du cil primaire et/ou la régulation de son élongation figure la kinase CILK1. En effet toutes les études utilisant différentes approches pour moduler son action (knockdown, surexpression, knockin, knockout) confirment qu'elle influence certaines propriétés intrinsèques de cette organelle.

Ainsi, il a été démontré que le knockdown ou la surexpression des mutants inactifs R272Q et E80K dans la lignée NIH3T3 augmente la proportion de cellules ciliées. De plus les deux formes mutées s'accumulent à l'extrémité du cil et perdent l'effet morphologique observé avec la surexpression la protéine sauvage^{8,30}. Plus récemment, la surexpression des 6 formes mutées identifiées chez les patients EMJ dans la lignée NIH3T3 a montré qu'aucune ne produit l'effet de la protéine sauvage sur la longueur du cil et sur le pourcentage de cellules ciliées. De plus, la distribution le long du cil est également modifiée³¹.

En l'absence de CILK1, la longueur du cil primaire des cellules de glie radiaire du télencéphale à E15.5 et du cervelet à P4 est à minima raccourci voir absent, alors que celui des neurones corticaux à P60 n'est pas affecté¹⁸. De plus une diminution de l'expression de *Glioma-associated oncogene family zinc finger 1* (Gli1) est observée dans le cerveau des souris knockout à E15.5 et la localisation de la protéine *Smoothed* (Smo) est affectées dans les cils du tube neural à E10.5, révélant que l'absence de CILK1 interfère avec la signalisation SHH¹⁸. Dans un second modèle de souris knockout, il a été observé un allongement de la longueur des cils dans les bourgeons des membres à E11.5 et une voie signalisation SHH altérée³⁰. Les fibroblastes de patients porteurs de la mutation E80K présentent un cil allongé et l'expression de membres de la voie de signalisation SHH tels que Gli1 et *Patched 1* (PTCH1) est augmentée⁸. A l'inverse, chez les patients porteurs de la mutation R272Q, la ciliogenèse est diminuée tandis que la longueur du cil n'est pas affectée.

Chez la souris knockin porteuse de la mutation R272Q, le cil primaire dans les poumons embryonnaire est allongé et la signalisation SHH est perturbée³². Enfin, chez des fibroblastes de souris porteurs de la mutation A612T associée à l'EMJ, la proportion de cellules ciliées est augmentée, la longueur des cils est diminuée mais la signalisation SHH est facilitée²⁸. De façon très intéressante il est observé qu'un seul allèle muté (A612T) de CILK1 est suffisant pour renforcer l'activation de la voie SHH.

Sur base de ces résultats, un modèle hypothétique de régulation de l'homéostasie du cil primaire a été proposé. Dans ce modèle, CILK1 est localisé à l'extrémité du cil primaire et participe au processus de désassemblage/assemblage indispensable pour permettre un transport intraflagellaire optimal (Figure 3)³³.

3.5. Expression tissulaire et cellulaire

Lors de sa découverte, CILK1, alors appelée ICK (« *intestinal cell kinase* »), a fait l'objet d'analyses d'expression de l'ARNm par Northern blot dans les tissus de souris adulte. Ces analyses ont révélé une forte expression dans le côlon et les poumons, ainsi qu'une expression plus faible dans le cerveau, le cœur et les ovaires. Chez l'Homme, l'expression apparaît plus large, l'ARNm étant détecté dans le cœur, le cerveau, le placenta, le pancréas, le thymus, la prostate, les ovaires et l'intestin grêle³⁴.

Concernant le cerveau de jeune adulte, une étude par hybridation in situ révèle une forte expression de CILK1 dans des régions riches en cellules en prolifération, telles que les ventricules latéraux, le courant migratoire rostral, le gyrus denté de l'hippocampe ainsi que le cervelet et le cortex piriforme³⁵.

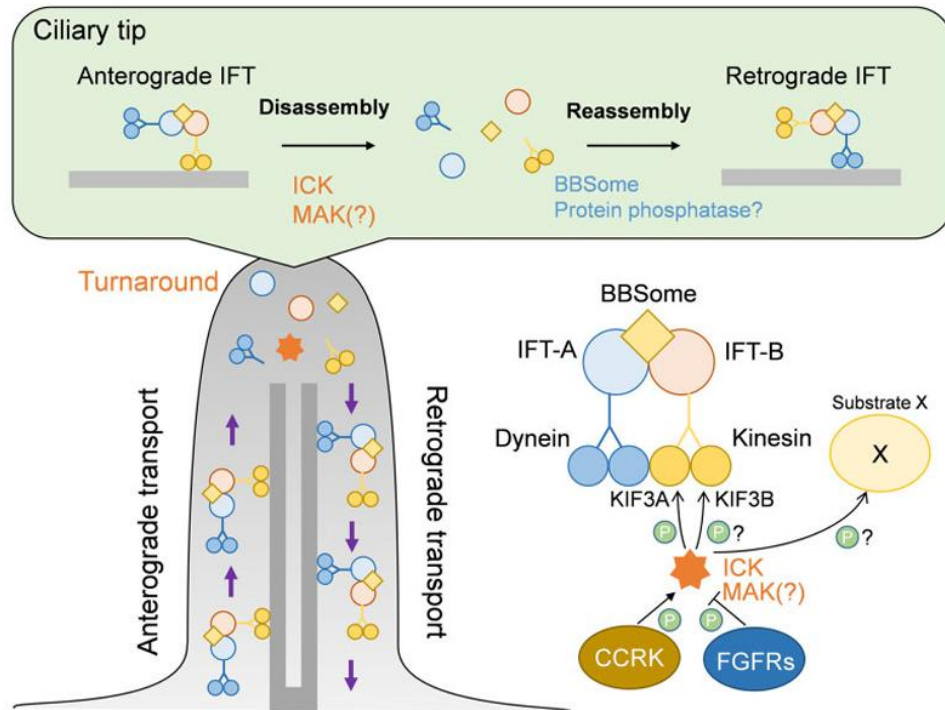


Figure 3 : Modèle hypothétique pour la régulation de l'inversion du transport intraflagellaire (IFT) à l'extrémité ciliaire par CILK1 (Figure tirée de Chaya 2021)³³.

Les trois complexes IFT-A, IFT-B et BBSome interviennent dans l'importation et l'exportation des protéines au niveau des cils. IFT-B assure le transport antérograde de la base vers l'extrémité, entraîné par le moteur kinésine, tandis que l'IFT-A assure le transport rétrograde de l'extrémité vers la base, entraîné par le moteur dynéine cytoplasmique. Le BBSome agit comme adaptateur. À l'extrémité ciliaire, les trains d'IFT sont désassemblés puis réassemblés en vue de leur demi-tour et de leur transport rétrograde grâce à l'action de différentes protéines dont CILK1.

Enfin, au stade embryonnaire E14.5, l'expression de l'ARNm et de la protéine est également rapportée dans le cerveau, expression semblant concerner les trois zones (VZ, IZ, CP) du cortex en développement^{6,36}.

Depuis lors, le développement du « *single cell RNA-seq* » a permis d'obtenir des informations d'une précision inégalée sur le profil d'expression des gènes dans les différents types cellulaires. De façon très intéressante, il a été mis en évidence que l'expression de CILK1 est fortement régulée dans la lignée oligodendrocytaire.

En 2016, une étude du transcriptome de cellules de la lignée oligodendrocytaire provenant de différentes régions du système nerveux central de souris, à des stades juvénile et adulte, a révélé l'existence de 12 populations cellulaires distinctes, soit bien davantage que les 4 stades de maturation classiquement décrits à partir de critères morphologiques et de différenciation comme nous le verrons au paragraphe 4.2.2³⁷. Comme le montre la Figure 4, l'expression de CILK1 augmente nettement lors du passage au stade « COP » et reste élevée dans les populations NFOL et MFOL. Les COP se distinguent des OPCs par une expression plus faible des marqueurs du cycle cellulaire, mais présentant en revanche des marqueurs associés à la migration³⁷.

Chez l'Homme, le même type d'analyse réalisé sur des cellules de la lignée oligodendrocytaire dérivées de cellules souches a permis de révéler que CILK1 fait partie de gènes caractérisant certains sous-clusters d'OPC et d'OL³⁸. Par ailleurs, une étude couvrant différentes étapes de la vie humaine (du stade fœtal à l'âge adulte) a identifié CILK1 dans une sous-population tardive d'OPC, sous-population la plus abondante au moment du pic de myélinisation et qui semble être le seul type de progéniteur présent chez l'adulte³⁹.

3.6. Contribution au développement du cerveau

Au niveau du système nerveux central, les deux modèles de souris knockout présentent une dilatation des ventricules associée à un amincissement cortical aux stades embryonnaires E15.5 et E18.5^{18,30}. Une diminution du nombre de cils primaires est observée à E10.5 dans le tube neural sans altération du *patterning* dorso-ventral. Cela est suivi, à E15.5 par une disparition quasi complète des cils primaires au niveau des ventricules cérébraux et d'une atrophie des bulbes olfactifs¹⁸. Par ailleurs, l'inactivation de CILK1 dans les neurones et la glie (souris Nestine-CKO) entraîne une réduction de la taille du cervelet et de l'hippocampe, en lien avec une diminution de la prolifération cellulaire¹⁸. D'autre part, une approche de mutagenèse somatique par transposon a identifié CILK1 comme un gène impliqué dans les malformations corticales, observation confirmée par des expériences de knockdown

du gène dans le cortex en développement⁴⁰. Enfin, la surexpression des variants pathogènes associés à l'EMJ ou au le syndrome ECO perturbe la division et la migration des progéniteurs neuronaux dans le cortex⁶. CILK1 apparaît donc comme un régulateur central du développement cérébral, impliqué à la fois dans la dynamique des cils primaires, la prolifération, la division et la migration des progéniteurs neuronaux. Son altération conduit à des anomalies structurelles majeures du cerveau et contribue à l'émergence de malformations corticales, soulignant son rôle clé dans les mécanismes neurodéveloppementaux.

4. Le développement du cortex cérébral

Le cortex cérébral, qui est la couche externe du cerveau, joue un rôle central dans le traitement et l'intégration de fonction complexes telles les fonctions motrices, sensorielles et cognitives. C'est une structure extrêmement élaborée du fait de son organisation qui découle de différenciation et de migrations spécifiques de plusieurs types cellulaires. Durant l'embryogenèse, les cellules naissent de progéniteurs bordant le tube neural puis les ventricules cérébraux et migrent dans le cortex pour atteindre leur destination finale. La migration cellulaire constitue une étape essentielle du développement cortical qui permet d'avoir une distribution spatiale et temporelle précise des cellules. Celles-ci vont ensuite coordonner leur maturation via une communication dynamique entre elles et former des circuits fonctionnels⁴¹.

Le cortex est constitué de deux grandes classes de cellules ; les neurones et les cellules gliales (Figure 5)⁴². Il existe deux types principaux de neurones ; les neurones de projection excitateurs (PN) et les interneurones corticaux inhibiteurs (cIN), chacun se subdivisant en plusieurs classes⁴³.

Les cellules gliales comprennent les astrocytes, la microglie et les oligodendrocytes. Les astrocytes assurent l'homéostasie du cerveau, ils coordonnent des processus physiologiques tels que le métabolisme énergétique, l'homéostasie ionique et la régulation du flux sanguin et régulent l'activité synaptique⁴⁴. Les oligodendrocytes sont responsables de la myélinisation des axones dans le SNC. Quant à la microglie, dont l'origine embryonnaire diffère de celles des autres cellules cérébrales, il s'agit de macrophages résidents du cerveau, qui à l'âge adulte assurent la défense immunitaire du cerveau. Durant le développement, la microglie régule la gliogenèse et la neurogenèse⁴⁵, contrôle l'invasion des cINs, phagocyte les débris cellulaires résultant de la mort neuronale programmée et participe au « *synaptic pruning* » qui élimine les synapses inactives⁴⁶.

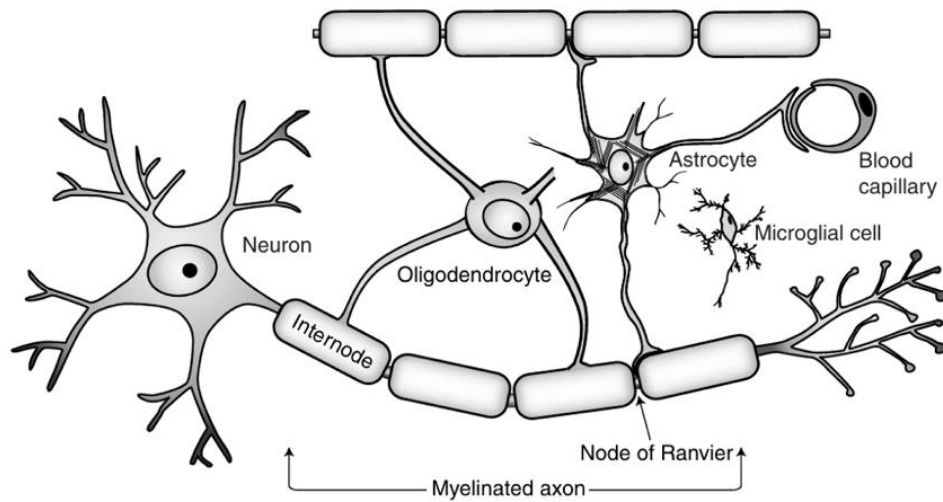


Figure 5 : Représentation schématique des différentes cellules composant le système nerveux central avec leurs caractéristiques morphologiques. (Figure tirée de White matter structure: a microscopist's view Julia M. Edgar and Ian R. Griffiths (2014)⁴²

4.1. Les neurones et la neurogenèse

La neurogenèse, débute précocement durant l'embryogenèse, à savoir vers E11 chez la souris. Dans le cerveau en développement, les cellules gliales radiaires (RGCs), qui dérivent des progéniteurs neuroépithéliaux jouent un rôle central en tant que cellules souches neurales : elles se divisent pour produire soit directement des neurones soit des progéniteurs intermédiaires qui généreront ensuite des neurones (Figure 6) ⁴⁷. Les neurones nouvellement générés migrent ensuite vers leur position finale dans le cortex, où ils s'organisent en couches corticales spécifiques et établissent des connexions synaptiques qui formeront les réseaux neuronaux fonctionnels ⁴³.

Comme nous l'avons expliqué, le cortex cérébral comprend deux types de neurones ; les PNs et les cINs. Ces deux populations neuronales se distinguent notamment par l'origine de leurs progéniteurs, leurs modalités de migration ainsi que par leur contribution fonctionnelle aux circuits corticaux. Les PNs migrent radialement le long des fibres radiaires tandis que les cINs atteignent le cortex par migration tangentielle (Figure 7)⁴³.

Dans le cortex, les neurones de projection sont générés à partir de progéniteurs situés au niveau de la zone ventriculaire (VZ) du pallium (Figure 7). Ce sont des neurones glutamatergiques qui vont assurer la transmission d'information sur de longues distances, ainsi reliant diverses régions du SNC ⁴³. Les neurones de projection constituent toutefois une population hétérogène comprenant plusieurs sous-types, notamment les neurones corticothalamiques, corticospinaux et callosaux, qui se distinguent par leurs cibles axonales et leurs profils moléculaires. Après leur naissance, ils migrent radialement le long des fibres radiaires pour atteindre la plaque corticale ⁴¹. Ce processus va permettre leur positionnement dans les différentes couches du cortex selon un processus « *inside-out* » car les premiers neurones nés vont occuper les couches profondes, tandis que les nouveaux vont migrer à travers ces couches pour former les couches superficielles (Figure 6).

Les interneurones corticaux (cIN) sont une population neuronale inhibitrice GABAergique. Ils sont générés dans le subpallium, à partir de progéniteurs localisés dans les éminences ganglionnaires médiale (MGE) et caudale (CGE) (Figure 7). Ces neurones représentent une population hétérogène, comprenant plusieurs sous-types définis par leurs propriétés moléculaires, morphologiques et électrophysiologiques.

Après leur génération, les cINs migrent tangentiellement sur de longues distances pour atteindre le néocortex. Ils adoptent ensuite une migration radiale pour s'intégrer dans les différentes couches corticales, basée sur leur sous-classe, leur origine et moment de génération⁴⁸.

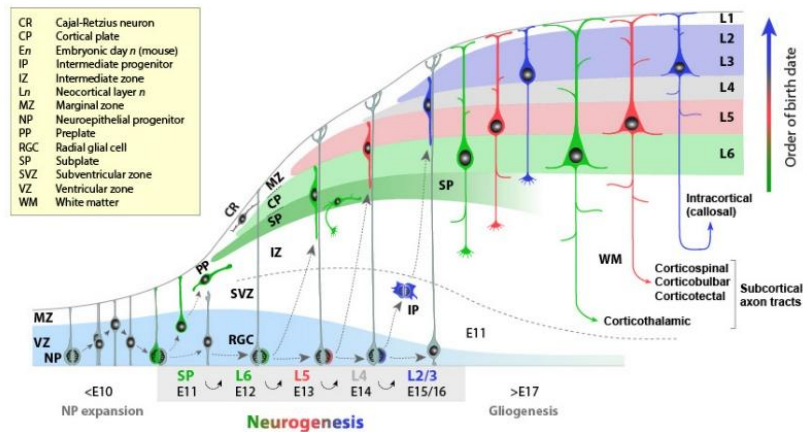


Figure 6 : Neurogenèse, migration neuronale et gliogenèse dans le cortex de souris (Figure tirée de Kwan 2012)⁴⁷

Avant le début de la neurogenèse, les progéniteurs neuronaux (NP) situés dans la zone ventriculaire (VZ ; en bleu) se divisent de manière symétrique afin d'élargir le pool de progéniteurs. Au cours du cycle cellulaire, ils subissent une migration nucléaire intercinétique (IKNM). À partir d'environ E11,5, les NP adoptent une morphologie de glie radiaire et commencent à se diviser de façon asymétrique pour générer des neurones. Ceux-ci migrent depuis les zones germinatives, guidés par les cellules gliales radiaires (RGC), afin d'atteindre les couches du manteau. Les premiers neurones de projection s'installent dans la préplaque (PP) pour former la plaque corticale (CP) naissante, qui donnera ensuite les couches (L) 2 à 6 du néocortex. Les neurones de la CP arrivant ultérieurement divisent alors la PP en zone marginale (MZ) et en sous-plaque (SP). Au fur et à mesure de la progression de la neurogenèse, différents sous-types de neurones de projection sont générés séquentiellement. Les neurones de la SP sont produits en premier, suivis de ceux des couches profondes (L6 et L5 ; en rouge), puis de ceux des couches superficielles (L4, L3 et L2 ; en vert). Certaines cellules filles des NP deviennent des cellules progénitrices intermédiaires (IPC). Elles migrent hors de la VZ et subissent des divisions neurogéniques symétriques dans la zone sous-ventriculaire (SVZ). Ce mode de neurogenèse contribue de manière importante à la production des neurones des couches superficielles. À la fin de la neurogenèse, vers E17,5, l'échafaudage radial est démantelé et les NP deviennent gliogéniques générant alors des astrocytes corticaux et de la zone sous-épendymaire (SEZ) ainsi qu'une couche de cellules épendymaires (EL). Abréviations : BV : vaisseau sanguin ; CR : neurone de Cajal-Retzius ; DL Pyr : neurone pyramidal des couches profondes ; IZ : zone intermédiaire ; UL Pyr : neurone pyramidal des couches superficielles ; WM : substance blanche.

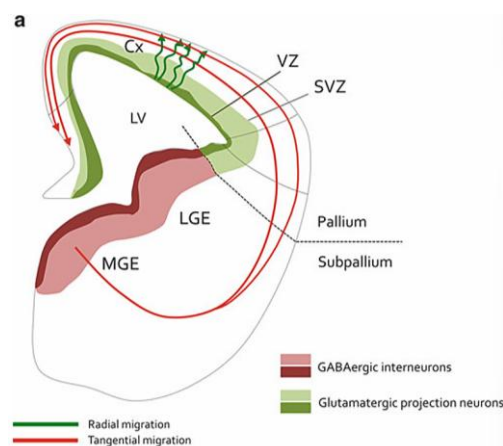


Figure 7. Migration neuronale dans le cortex en développement (Figure tirée de Godin & Nguyen 2014)⁴³

Schéma représentant une coupe transversale du cerveau antérieur d'un embryon de souris à E14,5. Les neurones de projection glutamatergiques naissent autour du ventricule latéral (LV) à partir de progéniteurs souches et corticaux situés dans les zones ventriculaire palliale (VZ, vert foncé) et sous-ventriculaire (SVZ, vert clair). Ils migrent radialement (flèches vertes sinueuses) pour s'intégrer à la plaque corticale du cortex (Cx). Les interneurones corticaux sont GABAergiques et proviennent des éminences ganglionnaires sous-palliales médiale (MGE) et caudale (CGE). Ils sont issus de cellules souches et progénitrices situées dans la zone ventriculaire (VZ) (rouge foncé) et la zone sous-ventriculaire (SVZ) (rouge clair). Ces neurones effectuent une migration tangentielle le long de divers chemins (rouge) pour s'intégrer dans la paroi corticale en développement.

Les interneurons jouent un rôle fondamental dans la régulation de l'activité neuronale en modulant l'excitabilité des neurones de projection. L'équilibre entre l'activité excitatrice des neurones de projection et l'activité inhibitrice des interneurons est essentiel pour le bon fonctionnement des circuits corticaux⁴¹.

4.2. Les oligodendrocytes et l'oligodendrogenèse

4.2.1. Les oligodendrocytes

Comme décrit précédemment, c'est après la neurogenèse corticale, aux environs de E17, que les RGCs du pallium se transforment pour permettre la gliogenèse qui génèrera la quasi-totalité des astrocytes et oligodendrocytes corticaux (Figure 6).

Les oligodendrocytes (OLs) sont des cellules gliales responsables de la myélinisation des axones dans le système nerveux central (SNC). Ils produisent la myéline, une gaine lipidique isolante qui entoure les axones et permet une conduction rapide de l'influx nerveux. Un seul oligodendrocyte est capable de myéliniser jusqu'à 50 axones à la fois ⁴⁹. La gaine de myéline est une structure lamellaire compacte constituée de 70% de lipides et de 30% de protéines structurelles telles que la *myelin basic protein* (MBP) et la *proteolipid protein* (PLP)⁵⁰. Les OLs ont la capacité d'ajuster l'épaisseur ou la longueur de la myéline ce qui permet de réguler la vitesse de propagation de l'information, un mécanisme essentiel notamment pour des processus cognitifs tels que l'apprentissage et la mémoire ⁵¹. Au-delà de ce rôle structural dans la formation de la myéline, les OLs exercent également plusieurs fonctions non-myélinisantes qui contribuent au maintien de l'intégrité et de l'activité neuronale. En effet, ils fournissent du lactate (produit par la glycolyse) à l'axone qu'il myélinise via un transporteur spécifique. Parallèlement, ils participent au maintien de la stabilité de la membrane axonale en assurant le transport de lipides et de cholestérol vers l'axone⁵².

Les OLs dérivent des *oligodendrocyte Precursor Cell* (OPC), eux-mêmes issus des RGCs. La particularité des OPCs est qu'une fraction d'entre-eux ne se différenciera pas et persistera dans le cerveau adulte, et représente 5 à 8% de la population cellulaire totale⁵³.

En plus de leur rôle de prolifération et maturation en oligodendrocytes, les OPCs ont de nombreux rôles dans le SNC. Ce sont de véritables cellules dynamiques et multitâches, dont les fonctions vont au-delà de leur rôle de progéniteurs, influençant les circuits neuronaux et la fonction cérébrale par divers mécanismes. Premièrement, les OPCs reçoivent des signaux synaptiques en libérant des facteurs qui influencent la densité neuronale, l'activité et la plasticité synaptique, modulant ainsi activement les circuits neuronaux. Ils participent également à l'élagage synaptique et au remodelage axonal,

contribuant à la structuration des connexions cérébrales⁵⁴. Ensuite, les OPCs guident la migration⁵⁵ et l'apoptose des interneurones⁵⁶.

4.2.2. L'oligodendrogenèse

Pendant le développement télencéphale, les oligodendrocytes sont générés en trois vagues successives qui apparaissent dans des régions anatomiques spécifiques (Figure 8).

Chez la souris, la première vague de production d'OPC est observée dès le stade embryonnaire E12.5 dans l'éminence ganglionnaire médiane (MGE) et la zone entopédonculaire antérieure (AEP) du télencéphale antérieur. Ces OPCs, issus de progéniteurs Nkx2.1+, vont migrer et ainsi peupler l'ensemble du télencéphale, y compris le cortex cérébral. Une deuxième vague apparaît ensuite vers E15.5, elle est issue des progéniteurs Gsh2+ de l'éminence ganglionnaire latérale (LGE) et l'éminence ganglionnaire caudale (CGE). Enfin, une troisième vague, dérivée de progéniteurs Emx1+ situés dans le pallium, apparaît autour de E17 et se poursuit durant la période postnatale précoce⁵⁷.

Bien que ces trois vagues soient spatialement et temporellement distinctes, elles contribuent toutes au pool final d'oligodendrocytes de l'adulte. Elles présentent par ailleurs une certaine capacité de compensation entre elles et ne semblent pas montrer de différences fonctionnelles. Il a été démontré que, lorsqu'une des trois populations d'OPCs est supprimée, le pool final d'oligodendrocytes reste inchangé et la souris ne présente aucune anomalie grossière⁵⁸.

Initialement, il avait été conclu qu'aucun OPC de la première vague (Nkx.2.1) ne persistait dans le télencéphale du nouveau-né, mais des études plus récentes démontrent qu'en réalité une petite population y survit et forme des clusters avec les interneurones⁵⁵.

4.2.3. Différenciation et maturation de la lignée oligodendrocytaire

Dans le télencéphale, la différenciation et la maturation des OPC en oligodendrocytes mature se déroule principalement aux âges postnataux. Au niveau du corps calleux, le faisceau de fibres nerveuses reliant les deux hémisphères cérébraux, les premiers axones marqués par la protéine basique de la myéline (MBP) sont observés à P7⁵⁹. Si les études transcriptomiques à l'échelle cellulaire ont considérablement affiné nos connaissances sur la différenciation de la lignée oligodendrocytaire, les techniques de culture primaire avaient aussi identifié depuis longtemps différents stades sur base de critères morphologiques et moléculaires (Figure 9). Signalons qu'il existe quelques variations concernant la dénomination de certains stades et leur nombre. Ainsi, certains auteurs parlent d'OL immature ou de pré-OL et il existe parfois une distinction entre les OLs matures et les OLs myélinisant.

Les facteurs de transcription *Oligodendrocyte Transcription Factor 2* (Olig2) et SRY-Box (SOX10), sont des marqueurs maintenus dans toute la lignée. Olig2 est un facteur précoce indispensable pour la

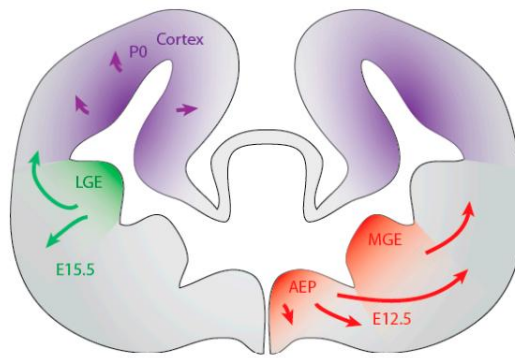


Figure 8 : Coupe transversale du télencéphale de souris indiquant les régions de la zone ventriculaire où sont générées les différentes vagues d'OPC (Figure tirée de Traiffort et al 2016)⁵⁷.

La première vague (E12.5, en rouge) apparaît dans la zone entopédunculaire antérieure (AEP) et l'éminence ganglionnaire médiane (MGE). La deuxième vague provient de l'éminence ganglionnaire latérale (LGE, vert) à E15,5. La dernière vague provient des précurseurs corticaux exprimant Emx1 (en violet) vers la naissance.

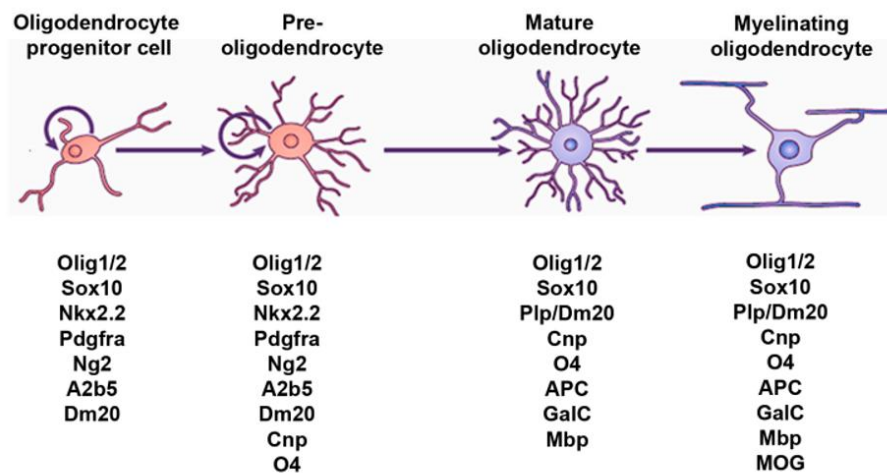


Figure 9 : Représentation schématique des stades de développement de la lignée OL.

Les caractéristiques morphologiques (en haut) et antigéniques (en bas) des OPC, des pré-OL, des OL matures et des OL myélinisants sont présentées. Signalons que la liste des marqueurs spécifiques à chaque stade est incomplète (Figure tirée de Traiffort et al. 2016)⁵⁷.

spécification de la lignée oligodendrocytaire car il oriente les progéniteurs neuro-épithéliaux vers un destin d'OPC⁶⁰. SOX10 est un facteur de différenciation et de maturation indispensable pour la spéciation en OPC et leur différenciation⁶¹.

Les OPCs, seules cellules de la lignée capable de proliférer, expriment spécifiquement le récepteur à tyrosine kinase *platelet-derived growth factor receptor alpha* (PDGFR α). Son activation par le PDGF-AA régule la prolifération, la migration et le maintien des OPCs dans un état indifférencié⁶². Son expression diminue pour disparaître dès que l'OPC se différencie en OL.

Au cours de la différenciation, les cellules vont exprimer notamment la 2',3'-cyclic nucléotide 3'-phosphodiesterase (CNP) et l'*Adenomatous Polyposis Coli* (APC). Au stade mature, l'OL commence à exprimer la *myelin basic protein* (Mbp), une protéine permettant la compaction de la myéline⁶³. Enfin, au stade final de différenciation, l'OL devient myélinisant et exprime la *myelin oligodendrocyte glycoprotein* (MOG), une protéine de structure présente sur la surface externe de la myéline⁴⁹.

4.2.4. La signalisation Sonic Hedgehog et l'oligodendrogenèse

Comme indiqué précédemment, les OPC précoces (de la première vague) sont générés à partir de la région ventrale du cerveau (POA et MGE) selon un mécanisme dépendant de SHH. Les souris mutantes nulles pour Nkx2.1, qui sont dépourvues du domaine d'expression télencéphalique de SHH, ne présentent aucun OPC dans la VZ du cerveau antérieur⁶⁴. Les études de gain et perte de fonction de SHH chez des souris transgéniques démontrent que ce morphogène est nécessaire et suffisant pour l'expression des gènes Olig1/2 *in vivo*⁶⁵. Concernant la troisième vague, il a été montré que l'ablation génétique de Smo ou, à l'inverse, l'expression du récepteur SmoM2 constitutivement actif dans les RGCs dorsales entraîne respectivement une forte diminution ou une augmentation de la production d'OPC/OLs dans le corps calleux⁶⁶. Par transgénèse conditionnelle, les sources de SHH ont pu être identifiées. Il a été démontré que les interneurons sont la source neuronale principale de SHH mais que le plexus choroïde est une source non-neuronale également essentielle⁶⁷. Une étude plus récente montre qu'à E16,5, les RGCs du néocortex murin commencent à générer des cellules progénitrices intermédiaires exprimant GSX2 (GSX2+). Un traçage de lignée *in vivo* a révélé que cette population de cellules progénitrices GSX2+ donne naissance non seulement aux interneurons du bulbe olfactif, mais également aux oligodendrocytes corticaux et aux astrocytes, suggérant ainsi qu'il s'agit d'une population tripotente. Il a de plus été montré que la signalisation SHH est à la fois nécessaire et suffisante pour la génération de ces cellules progénitrices GSX2+⁶⁸.

En revanche, concernant le rôle joué par SHH dans la différenciation et la myélinisation, des recherches supplémentaires sur l'implication de la voie SHH/SMO sont nécessaires. En effet, certains chercheurs ont indiqué qu'une augmentation de la signalisation SHH/SMO pourrait être une condition

préalable à la maturation des oligodendrocytes jusqu'au stade final de leur développement⁶⁹, tandis que d'autres au contraire, suggèrent que la signalisation SHH/SMO doit diminuer pour que l'oligodendrocyte achève sa différenciation⁷⁰.

Au cours de l'oligodendrogenèse, la voie de signalisation SHH joue un rôle régulateur fondamental⁵⁷. Le ligand SHH est un morphogène essentiel déterminant l'identité de la lignée oligodendrocytaire. Sur le plan moléculaire, la signalisation canonique a lieu au niveau du cil primaire : le ligand SHH se fixe sur son récepteur Ptch 1 levant ainsi la répression exercée sur Smo⁷¹. Cela va permettre la translocation des facteurs de transcription Gli vers le noyau qui va induire l'expression des gènes oligodendrocytaire tels que Olig2⁶⁵.

Dans le télencéphale ventral, la production des OPC est étroitement contrôlée par la voie SHH, plus spécifiquement par un gradient de SHH produit par le neuroépithélium du télencéphale^{57,58}. Cette signalisation coopère avec d'autres signalisations telles que la signalisation Pdgf et Fgf⁵⁷. Concernant la dernière vague d'OPC, la voie SHH est tout aussi essentielle. Son importance est démontrée par l'inactivation de Smo, un effecteur de la voie SHH, dans les OPCs dorsaux ce qui a entraîné une diminution de 90% de cellules Olig2 dans le néocortex embryonnaire. A ce stade, le ligand SHH est fourni aux OPCs dorsaux par de multiples sources telles que les interneurones migrants et le plexus choroïde⁶⁷.

Hypothèses et objectifs

Hypothèses et objectifs

L'EMJ est un type d'épilepsie se déclarant classiquement à l'adolescence, une période charnière où la myélinisation des circuits neuronaux se poursuit activement chez l'Homme contrairement aux autres espèces comme les rongeurs et les primates^{72,73}. Parmi les gènes impliqués, la kinase CILK1, apparaît comme un régulateur clé de la ciliogenèse et de la voie SHH, qui sont indispensables pour la prolifération et différenciation de la lignée oligodendrocytaire. Des données transcriptomiques montrent une forte augmentation de la transcription de CILK1 lors de la différenciation des OPCs, suggérant ainsi un rôle dans l'oligodendrogenèse. Ce projet vise donc à élucider l'implication spécifique de CILK1 dans l'oligodendrogenèse afin de préciser la physiopathologie de l'EMJ. Nous supposons que CILK1 agit à différents stades de l'oligodendrogenèse à savoir :

- 1. Période embryonnaire** : Dans le télencéphale, en agissant sur les RGCs ou d'autres progéniteurs intermédiaires, CILK1 régulerait la production des OPCs et le développement cérébral global.
- 2. Période postnatale** : L'augmentation massive de son expression lors de la transition des OPCs en COP suggérerait un rôle clé dans la différenciation des OPCs.

L'objectif de ce mémoire est donc d'étudier l'implication de CILK1 dans l'oligodendrogenèse durant la période embryonnaire. Pour tester ces hypothèses, le projet s'articule autour de deux objectifs expérimentaux majeurs :

Objectif 1 : Évaluer l'influence de CILK1 sur la production et la prolifération des OPCs *in vivo*. L'impact de l'absence de CILK1 sur les populations cellulaires à E18.5 sera évaluée par :

- Approches biochimiques et cytométriques : Quantification, par Western blot, de l'expression des facteurs de transcription Olig2 et Ctip2 dans le prosencéphale. Détermination des populations cellulaires ou nucléaires par cytométrie.
- Approche histologique : Mesure de l'épaisseur corticale et de la densité de neurones (Ctip2+) et des OPCs (Olig2+) par immunohistochimie pour évaluer l'impact sur la neurogenèse et l'oligodendrogenèse. Nous quantifierons également les cellules Olig2+ dans la structure hippocampique.

Objectif 2 : Isolement, culture et différenciation d'OPCs *in vitro* :

Afin d'étudier à l'avenir l'effet de l'absence de CILK1 *in vitro* dans l'oligodendrogenèse, nous mettrons au point un protocole de culture d'OPCs et de leur différenciation en oligodendrocytes. Trois méthodes d'isolement seront comparées (FACS, MACS et centrifugation différentielle) afin d'optimiser la purification des cellules.

Matériel et méthodes

Matériel et méthodes

1. Modèle expérimental

1.1. Souris CILK1 knockout (KO)

Les souris CILK1-KO (ou CILK1 -/-) sont obtenues par croisement de souris CILK1+/- . L'inactivation de l'allèle CILK1 a été réalisée en croisant une souris dont le gène CILK1 était floxé ¹⁸ avec une souris PGK-Cre qui exprime la Cre recombinase dans les cellules germinales ⁷⁴, ce qui a permis d'éliminer l'allèle floxé dans toutes les cellules. Les souris CILK1+/- sont maintenues sur un fond génétique « inbred » C57BL/6J. Ce modèle permet d'étudier, le développement cérébral en absence du gène CILK1 durant la période intra-utérine. Les femelles gestantes sont euthanasiées puis les embryons sont récupérés et leur cerveau est isolé et traité différemment selon la méthode d'analyse choisie.

1.2. Souris Sox10-GFP-DTA

Les souris Sox10-GFP-DTA, maintenues sur un fond swiss « *outbred* », comprennent dans leur génome, un « chromosome artificiel » dérivé du bactériophage P1 (appelé aussi PAC) comprenant, sous le contrôle du promoteur du gène Sox10, une cassette GFP-lox-stop-lox-DTA. Ceci permet d'exprimer la GFP dans toutes les cellules exprimant le gène Sox10 et par conséquent, de marquer spécifiquement les différents intermédiaires de la lignée oligodendrocytaire notamment au cours du développement.

2. Détermination du génotype des souris par PCR

2.1. Extraction de l'ADN

L'extraction de l'ADN génomique est réalisée à partir d'un morceau de tissu prélevé lors de la dissection ou du bouclage d'un souriceau (ce peut-être un fragment de queue chez les embryons et nouveaux nés, ou un punch auriculaire). Dans chaque tube contenant le morceau de tissu, sont ajoutés 300 µL du tampon TENS (Tris-HCl 100mM pH8,5 ; EDTA 5mM ; NaCl 200mM ; SDS 0,2%) et 5 µL de protéinase K (10mg/ml) (V3021, Promega). Les tubes sont mélangés puis incubés toute la nuit à 55 °C.

Le lendemain, après avoir homogénéisé manuellement les tubes, un volume de 300 µL d'isopropanol est ajouté, et le tout est mélangé par inversion. Les tubes sont centrifugés (Centrifugeuse Eppendorf 5424 R) pendant 15 min à 15 000 rpm à température ambiante. Le surnageant est éliminé puis 250 µL d'éthanol 70 % sont ajoutés pour éliminer les traces de la solution précédente. Les échantillons sont de nouveau centrifugés pendant 15 min à 15 000 rpm et le surnageant est éliminé. Enfin, l'ADN est remis en suspension dans 100 µL de tampon TE (Tris-HCl 10mM pH8 ; EDTA 1mM) puis les échantillons sont conservés à -20 °C jusqu'à utilisation.

2.2. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

Pour le génotypage des souris CILK1-KO, un set de trois amorces permettant de distinguer les allèles WT, floxé ou délété est utilisé. Les tailles attendues pour les différents allèles sont les suivantes : WT 234 pb, floxé 380 pb et délété 545 pb. Le jeu d'amorces est repris ci-dessous :

- ICK -31 (Amorce 1) : GTCTACCAGGGGAGGCATAAGAG T_m = 67 °C,
- ICK-51 (Amorce 2) : CTGTGATTGTCAGGCTCCACAACGCCT T_m = 74 °C,
- ICK-71-1 (Amorce 3) : TGCAGTCTTCAGCCTTTCCGTA T_m = 68 °C.

Pour le génotypage des souris Sox10-GFP-DTA, un jeu de deux amorces s'hybridant sur la cassette DTA est utilisé. La taille du fragment amplifié est de 250 pb. Les amorces sont les suivantes :

- DTA-forward (Amorce 1) : ATCCACTTTAGTGCAGAACCTTCGTCA T_m = 70°C,
- DTA-reverse (Amorce 2) : GAAAACTTTTCTTCGTACCACGGGACTAA T_m=68°C.

Un mélange PCR dont la composition indiquée dans le Tableau 1 est utilisé pour chaque échantillon. A ce mélange de 24µl est ajouté 1 µl d'ADN isolé comme décrit précédemment.

Les PCR sont réalisées sur le thermocycleur Labcycler 2194 (Sensoquest). Les cycles de température utilisés pour l'amplification sont les suivants :

- PCR CILK1 : 40 cycles à 94 °C (30s) / 60 °C (30s) / 72 °C (60s),
- PCR Sox10-GFP-DTA : 40 cycles à 94 °C (20s) / 60 °C (20s) / 72 °C (30s).

A la fin de la PCR, les produits sont analysés sur gel agarose à 2,5 % préparé dans du tampon TBE1X (Tris Base 89mM ; acide borique 89mM, EDTA 2mM) et contenant du Midori Green (MG04, NIPPON Genetics) dilué 10 000x. La migration est réalisée à une tension constante de 135 V pendant 20 min. Le marqueur de poids utilisé est le *Quick-Load 1kb Plus DNA Ladder* (N0469S, New England Biolabs).

3. Prélèvement tissulaire

Pour l'étude des embryons, après avoir sacrifié la souris gestante, les cornes utérines sont immédiatement placées dans le milieu HBSS froid sans calcium ni magnésium (14175, Gibco). Les embryons sont extraits des cornes utérines et conservés sur glace dans le même milieu. Après avoir sorti l'embryon du sac vitellin, le cerveau est isolé en HBSS frais sous hotte à dissection. Pour les souriceaux (P4, P10, P30), celui-ci est sacrifié et le cerveau est directement isolé en HBSS sans Ca²⁺ ni Mg²⁺ frais sous hotte à dissection. Lorsque le prélèvement servira à de la culture cellulaire, le cerveau doit être disséqué dans le milieu HBSS contenant un mélange Pénicilline/Streptomycine (PS) 1%.

Tableau 1 : Préparation des mélanges PCR pour le géotypage.

Composant	Concentration finale	Référence
ICK		
Amorce 31	0,5 µM	IDT-DNA
Amorce 51	0,5 µM	IDT-DNA
Amorce 71-1	0,5 µM	IDT-DNA
dNTPs	0,2 mM	N0447S, New England BioLabs
Buffer green (5x)	1X	M791A, Promega
Go Taq polymérase	0,05 U/µl	M7848, Promega
Sox10-GFP		
Amorce DTA-forward	0,4 µM	IDT-DNA
Amorce DTA-reverse	0,4 µM	IDT-DNA
dNTPs	0,2 mM	N0447S, New England BioLabs
Buffer green (5x)	1X	M791A, Promega
Go Taq polymérase	0,025 U/µl	M7848, Promega

Selon l'analyse choisie, deux protocoles sont suivis. Pour l'immunohistochimie, le cerveau est directement fixé (voir point 5). Pour l'analyse par Western blot ou par cytométrie en flux, les bulbes olfactifs, le cervelet, le tronc et les méninges sont éliminés (Figure 10). Pour le Western blot, le cerveau est immédiatement congelé dans l'azote liquide tandis que pour la cytométrie en flux il est dissocié par traitement enzymatique.

4. Immunohistochimie sur cerveau embryonnaire

4.1. Préparation des coupes de cerveau

Après dissection, les cerveaux sont fixés pendant 1 h à 4 °C dans une solution de paraformaldéhyde (PFA) (15710, Electron Microscopy Sciences) 4 % en PBS. Ils sont ensuite transférés dans une solution de sucrose 30 % et placés sous agitation en chambre froide jusqu'à ce que le cerveau se retrouve au fond du récipient. Les cerveaux sont enchâssés dans un milieu d'enrobage hydrosoluble Neg-50 (6502B, EpreDia), congelés sur carboglace et conservés à -80°C. Des coupes coronales de 15 µm réalisées au cryostat (CryoStar Nk 70, Thermo Scientific) sont déposées sur des lames *Superfrost Plus* (J1800AMNZ, EpreDia). Elles sont séchées pendant toute la nuit à température ambiante, puis sont conservées à -80 °C jusqu'à utilisation.

4.2 Immunohistochimie

Lors de l'analyse, la coupe est réhydratée dans le *Phosphate-Buffered Saline* (PBS) pendant 5 min puis est soumise au démasquage des antigènes. Pour cela, la coupe est incubée avec le *Dako target Retrieval* (S1699, Dako) dans un bain marie pendant 15 min à 95 °C. Cette étape est suivie de deux lavages au PBS.

Le blocage est effectué pendant 4 h à 4 °C en ajoutant 600 µL par lame d'une solution de PBS-T (PBS ; Triton X-100 0,2%) (Sigma-Aldrich, T8787) comprenant 5% de sérum d'âne (017-000-121, Jackson ImmunoResearch). Après le blocage, l'excès de solution est éliminé puis, par lame, sont ajoutés 300 µL d'une solution de PBS-T comprenant 1% de sérum d'âne et d'anticorps primaire à la concentration désirée (Tableau 2). La lame est recouverte d'un parafilm et est placée la nuit à 4 °C.

Le lendemain, la lame est lavée deux fois 10 min avec du PBS-T puis est incubée 2 h à température ambiante dans du PBS-T contenant du sérum d'âne 1 %, l'anticorps secondaire fluorescent adéquat (1/1000) et du DAPI (10µg/ml) (D9542, Sigma-Aldrich). Ensuite, la lame est lavée 2 fois 5 min avec du PBS, puis 3 min dans de l'eau. Le montage est réalisé en appliquant 4-5 gouttes de *Dako mounting medium* (S3023, Dako) sur les coupes puis en déposant délicatement, sans former de bulles si possibles une lame couvre-objet. La lame est séchée toute la nuit sous ventilateur puis conservée à 4 °C plusieurs semaines. Les lames sont analysées au microscope confocal NikonA1R.

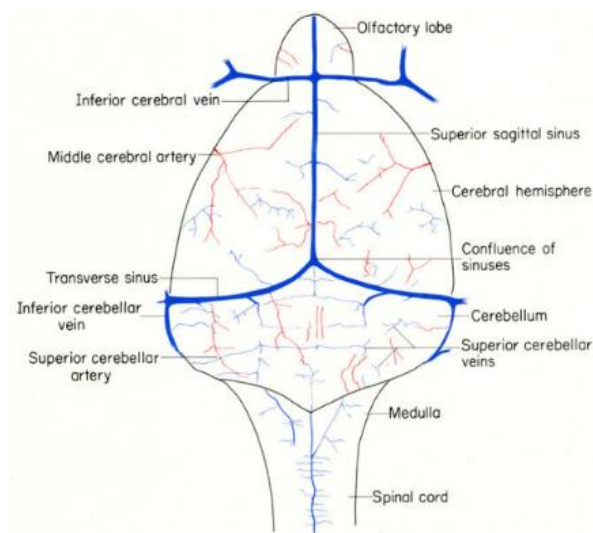


Figure 10 : Vue dorsale d'un cerveau de souris et de différentes régions. Les traits bleus montrent les endroits de coupe permettant d'éliminer les bulbes olfactifs, le cervelet et le tronc.

Tableau 2 : Liste des anticorps utilisés lors des analyses par immunohistochimie

Anticorps	Espèce d'origine	Type	Dilution	Référence
Anticorps primaires				
Anti-Olig2	Lapin	Monoclonal	1/500	ab109186, Abcam
Anti-Ctip2	Rat	Monoclonal	1/100	ab18465, Abcam
Anticorps secondaires				
Alexa fluor 647 anti-IgG lapin	Ane	Polyclonal	1/1000	A31573, ThermoFisher
Alexa fluor 647 anti-IgG rat	Ane	Polyclonal	1/1000	A78947, ThermoFisher

5. Extraction des protéines totales et analyse par Western blot

5.1. Extraction des protéines et quantification

Après la dissection du cerveau de l'embryon, le tissu est soit directement congelé à -80°C pour une analyse ultérieure soit directement homogénéisé à l'aide du piston de broyage ultrafin (« B ») de l'homogénéisateur de *Dounce* dans 500 μL de tampon RIPA (Tris-HCl 50mM pH 8 ; NaCl 150mM, NP-40 1% ; déoxycholate de sodium 0,5% ; dodécylsulfate de sodium 0,1%) comprenant du « *Complete EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail* » (11836170001, Sigma). L'homogénat est transféré dans un tube Eppendorf et est incubé pendant 15 min sur glace.

L'échantillon est soumis pendant 30 s à des ultrasons grâce à une sonde réglée aux trois quarts de la puissance maximale. Cette étape est suivie d'une centrifugation de 20 min à 16 000 g à 4°C . Le surnageant contenant les protéines est récupéré et conservé à -20°C jusqu'à utilisation.

Une fois les protéines extraites, leur quantification est réalisée à l'aide du kit *Pierce BCA Protein Assay kit* (23225, ThermoScientific). Dans une plaque 96 puits, une gamme étalon de BSA (Albumine de Sérum Bovin) correspondant à différentes dilutions, ainsi que les échantillons d'intérêt sont déposés, puis 200 μL de réactif BCA sont ajoutés à chaque puit. Les échantillons et la BSA sont dilués dans le tampon RIPA. La plaque est incubée à 37°C pendant 30 min, puis l'absorbance est mesurée à 562 nm sur un spectrophotomètre (Thermo Labsystems Multiskan Ascent). La concentration en protéines est déterminée par comparaison des absorbances mesurées à la droite d'étalonnage de la BSA.

5.2. Western blot

Une fois les protéines dosées, un Western blot est effectué afin de mettre en évidence les protéines d'intérêt. Les protéines sont d'abord séparées selon leur poids moléculaire par électrophorèse SDS-PAGE discontinue⁷⁵. Des gels de polyacrylamide 8 % sont préparés pour la séparation des protéines. Le volume et la quantité de protéines des différents échantillons sont égalisés par un éventuel ajout de tampon RIPA. Quatre volumes d'échantillon sont ajoutés à un volume de tampon de chargement (Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8 ; Glycérol 10 % ; SDS 2 % ; β -mercaptoéthanol 5 % ; bleu de bromophénol 0,01 %). Les échantillons sont ensuite déposés dans les puits du gel préalablement placé dans une cuve contenant le tampon d'électrophorèse (Tris-HCl 25mM ; Glycine 192mM ; SDS 0,1%) et soumis à un courant de 8 mA pendant 30 min, puis de 16 mA pendant 1 h.

A la fin de l'électrophorèse, les protéines sont transférées du gel sur une membrane de polyvinylidène difluoride (PVDF). La membrane est préalablement incubée dans l'éthanol pendant 1 min, puis deux minutes dans de l'eau et enfin dans du tampon de transfert. Le transfert est réalisé grâce

à un montage en « sandwich », assemblé de la cathode vers l'anode comme suit : une éponge, deux papiers Whatman, le gel, la membrane de PVDF, deux papiers Whatman et une éponge. Ce montage est placé dans une cuve contenant le tampon de transfert (Tris Base 25mM pH 8,3 ; Glycine 192mM ; Méthanol 20%). La cuve est déposée dans un bac contenant de la glace, puis le transfert est effectué à tension constante à 50 V pendant 2 h. La membrane est ensuite bloquée pendant 1 h à température ambiante dans du *Tris-Buffered-Saline-Tween* (TBS-T) (Tris-HCl 50 mM pH 7,5 NaCl 150 mM, Tween 20 0.1%) contenant 5% de poudre de lait, puis est incubée toute la nuit à 4°C avec l'anticorps primaire (Tableau 3).

Le lendemain, la membrane est lavée trois fois avec du TBS-T, puis incubée avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase de raifort (HRP). Après trois nouveaux lavages au TBS-T, la détection des protéines est réalisée à l'aide du kit Pierce™ *ECL Western Blotting Substrate* (32106, ThermoScientific). La membrane est mise en contact avec la solution de révélation qui contient le substrat de la HRP. La réaction d'oxydoréduction émet de la lumière qui peut être visualisée par une caméra (Amersham™ ImageQuant™ 800).

La normalisation des signaux émis par les échantillons est réalisée grâce à la détection de l'alpha-tubuline, une protéine de ménage présente dans toutes les cellules. Les anticorps précédents sont éliminés de la membrane en incubant celle-ci deux fois pendant 10 min à température ambiante dans du tampon de stripping (glycine 0,2 M ; SDS 3,5 mM ; Tween-20 1 % ; pH 2,2). Après deux lavages de 10 min dans du PBS, puis deux autres de 10 min en TBS-T, la membrane est bloquée pendant 1 h à température ambiante dans du TBS-T contenant 5% de poudre de lait. Elle est ensuite incubée pendant 2 h à température ambiante avec l'anticorps anti- α -tubuline couplé à la HRP. Après trois nouveaux lavages au TBS-T, l' α -tubuline est révélée au moyen du kit ECL comme décrit précédemment. Toutes les étapes d'incubations et de lavages sont réalisées sous agitation.

6. Analyse de populations cellulaires de cerveau embryonnaire par cytométrie en flux

6.1. Préparation de la suspension cellulaire

Sous hotte à flux laminaire, le cerveau est finement fragmenté à l'aide d'un scalpel. Un volume de 100 μ L de DNase (LK003170, Worthington) est ajouté, suivi de 900 μ L de papaïne (LK003176, Worthington) pour digérer le tissu. Le mélange est transféré dans un tube de 15 mL et incubé pendant 30 min à 37 °C sous 5 % CO₂ sous agitation constante (60 rpm).

L'action de la papaïne est arrêtée par l'ajout de 1 mL d'ovomucoïde (LK003182, Worthington), suivi d'un mélange doux par inversion. Le tube est placé à température ambiante pendant 2-3 minutes pour

Tableau 3 : Liste des anticorps utilisés lors des analyses par Western Blot

Anticorps	Espèce d'origine	Type	Dilution	Référence
Anticorps primaires				
Anti-Olig2	Lapin	Monoclonal	1/2000	ab109186, Abcam
Anti-Ctip2	Rat	Monoclonal	1/2000	ab18465, Abcam
Anti-Nkx2.1	Lapin	Monoclonal	1/2000	ab76013, Abcam
Anti- α -tubuline HRP	Souris	Monoclonal	1/2000	12351S, Cell Signaling
Anticorps secondaires				
Anti-IgG lapin HRP	Chèvre	Polyclonal	1/2000	G21234, ThermoFisher
Anti-IgG rat HRP	Chèvre	Polyclonal	1/2000	7077, Cell Signaling

permettre la sédimentation des morceaux de tissu, puis le surnageant est éliminé. Une suspension cellulaire est obtenue par ajout de 1 mL de Solution A (HBSS sans Ca^{2+} ni Mg^{2+} ; BSA 0,5%), au culot suivi de 10 à 15 pipetages délicats à l'aide d'une P1000. La suspension cellulaire est ensuite filtrée sur un tamis de 70 μm (542070, Greiner), qui est ensuite lavé avec 1 mL de solution A. Les cellules sont finalement comptées, après coloration au bleu de trypan, à l'aide d'un compteur cellulaire (Countess II FL, Life Technologies).

6.2. Immunomarquage

La suspension cellulaire est centrifugée 5 min à 500 g à température ambiante, puis la concentration cellulaire est ajustée à 10^7 cellules vivantes/mL à l'aide de la solution A. Ensuite, à un volume de 150 à 200 μL (soit 1.5 à 2.10^6 cellules/tube) de cellules sont ajoutés 1,5-2 μg de *Mouse BD Fc Block* (553141, BD Pharmingen) et le tout est placé 15 min à 4°C. L'anticorps monoclonal de rat anti-PDGFR α -PE-Cy7 (25-1401-82, Invitrogen) est ajouté à la dilution désirée et le mélange est incubé pendant 30 min à température ambiante à l'abri de la lumière. Ensuite, l'échantillon est centrifugé 5 min à 500 g et le culot est remis en suspension dans 100 μL de solution A. La suspension est filtrée à travers un tamis de 70 μm , qui est lavé avec 400 μL de solution A. Enfin, du DAPI (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) est ajouté afin de distinguer les cellules mortes des cellules vivantes et les cellules sont comptées au FACS Canto II.

7. Fluorescence-activated nuclei sorting (FANS)

7.1. Dissociation tissulaire et fixation

Un volume de 300 μL de solution fixative (PFA 1% dans du Dulbecco-PBS ou DPBS) est ajouté à 100 mg de tissu cérébral (frais ou congelé). Le tissu est immédiatement homogénéisé à l'aide d'un potter sans fil. L'homogénat est transféré dans 9,7 mL de solution fixative, puis placé sur un agitateur à 30 rpm à température ambiante pendant 10 min. Un volume de 500 μL de glycine 2,5M est ensuite ajouté et le tube est mélangé à 30 rpm à température ambiante pendant 5 min.

7.2. Isolement des noyaux

L'homogénat est centrifugé à 1100 g pendant 5 min à 4 °C. Le surnageant est éliminé et le culot est remis en suspension dans 10 mL de tampon NF1 froid (Tris-HCl 10 mM pH 8 ; EDTA 1 mM ; MgCl_2 5 mM ; Saccharose 0,1 M ; Triton X-100 0,5%). Cette étape de lavage est répétée deux fois au total. Après élimination du surnageant, le culot est remis en suspension dans 5 mL de tampon NF1 et le tout est incubé sur glace pendant 30 min.

La suspension est transférée dans un homogénéiseur de *Dounce* en verre, puis 20 passages sont réalisés avec le piston lâche, suivis de 5 passages avec le piston serré. L'échantillon est passé à travers

un filtre de 70 μ M (542070, Greiner) et le filtre est lavé avec 15 mL de tampon NF1. Un coussin de saccharose de 5 mL (Saccharose 1,2 M ; Tris-HCl 10 mM pH 8 ; MgCl₂ 3 mM ; DTT 1 mM) est déposé par pipetage lent au fond du tube. L'échantillon est centrifugé à 3 900 g pendant 30 min à 4 °C (pas de freins). La phase aqueuse supérieure ainsi que le saccharose sont éliminés et le culot est remis en suspension dans 1 mL de tampon NF1. Un volume de 9 mL de tampon NF1 est ajouté, l'échantillon est mélangé délicatement puis est centrifugé à 1600 g pendant 5 min à 4 °C.

7.3. Marquage des noyaux

Le culot de noyaux est remis en suspension dans 10 mL de tampon FANS (DPBS ; BSA 1% ; EDTA 1 mM), puis centrifugé à 1600 g pendant 5 min à 4 °C. Les noyaux sont ensuite remis en suspension dans 300 μ L de tampons FANS.

Le contrôle isotypique est préparé en ajoutant 30 μ L de noyaux à 270 μ L de tampons FANS comprenant les anticorps « isotype contrôle » aux mêmes concentrations que leur anticorps primaire équivalent. Pour chaque anticorps utilisé, un tube FACS est préparé en ajoutant 30 μ L de noyaux à 270 μ L de tampons FANS comprenant les anticorps aux dilutions choisies, et le tout est incubé la nuit à 4 °C (Tableau 4). Le lendemain, 4 mL de tampon FANS sont ajoutés dans chaque tube, puis les échantillons sont centrifugés à 1600 g pendant 5 min à 4 °C. Le surnageant est éliminé et les noyaux sont finalement remis en suspension dans 300 μ L de tampon FANS. La solution est pipetée au minimum 10 fois afin d'assurer une bonne homogénéisation.

7.4. Cytométrie en flux des populations nucléaires

Avant le comptage des noyaux au FACS, la suspension est passée sur un filtre de 40 μ M (542040, Greiner). Du DAPI (0,5 μ g/ml) est ajouté à chaque échantillon puis les noyaux sont comptés au FACS Canto II (BD Biosciences).

8. Culture primaire d'OPC et différenciation en oligodendrocyte

8.1. Traitement des supports de culture

Avant de procéder à la culture cellulaire des OPCs, les supports de culture sont préalablement revêtus de poly-L-lysine, afin d'augmenter les interactions électrostatiques entre le support et les charges négatives de la membrane cytoplasmique et permettre l'adhérence des cellules.

Pour les analyses en immunofluorescence, des lamelles en verre sont préalablement incubées 3 h à 55 °C dans du HCl 1M, puis sont rincées 4 fois dans de l'eau Mili-Q et sont enfin immergées toute la nuit dans de l'éthanol. Le lendemain, après un séchage de 2 h sous hotte à flux laminaire, les lamelles sont autoclavées et conservées stérilement à température ambiante. Ce traitement a pour but de dégraisser et éroder les lamelles afin de favoriser l'adhérence des cellules.

Tableau 4 : Liste des anticorps utilisés pour les expériences de FANS

Anticorps	Espèce d'origine	Type	Dilution	Référence
Alexa Fluor® 647 Anti-Olig2	Lapin	Monoclonal	1/1000, 1/2000, 1/2500	ab225100, Abcam
FITC Anti-Ctip2	Rat	Monoclonal	1/600, 1/1200, 1/2500	ab123449, Abcam
Alexa Fluor™ 488 anti-NeuN	Souris	Monoclonal	1/600, 1/1200, 1/2500	MAB377X, MilliporeSigma
Isotype contrôle				
Alexa Fluor® 647 – IgG Isotype contrôle	Lapin	Monoclonal	1/1000, 1/2000, 1/2500	AB199093, Abcam
Alexa Fluor™ 488 – IgG1-k Isotype contrôle	Souris	Monoclonal	1/600, 1/1200, 1/2500	FCMAB310A4, MilliporeSigma

Le coating est réalisé à l'aide la poly-L-lysine hydrobromide (PLL) (P1399, Sigma Aldrich) à partir d'une solution stock à 1 mg/mL. La solution de travail correspond à de la PLL 100 ou 200 µg/mL en tampon borate 100 mM (pH 8,5). Pour les plaques de culture (12 puits), une solution à 100 µg/mL est utilisée à raison de 1 mL par puits. Pour les lamelles de verre, une solution à 200 µg/mL est utilisée à raison de 500 µL par puits (plaques 24 puits). Après 24h d'incubation à 4 °C, la solution est éliminée, les supports sont lavés trois fois avec de l'eau Mili-Q stérile, puis séchés sous hotte pendant 2 h. Les supports ainsi préparés sont conservés pour une durée maximale de trois mois à 4 °C.

8.2. Isolement des OPCs

8.2.1 Par tri de cellules marquées par fluorescence (FACS)

Sous hotte à flux laminaire, le cerveau d'un nouveau-né P4 Sox10-GFP est finement fragmenté à l'aide d'un scalpel. Un volume de 200µL de DNase est ajouté, suivi de 1800 µL de Papaïne pour digérer le tissu. Le mélange est transféré dans un tube de 15 mL et incubé pendant 30 min à 37 °C sous 5 % CO₂ sous agitation constante (60rpm).

L'action de la papaïne est arrêtée par l'ajout de 2 mL d'ovomucoïde, suivi d'un mélange par inversion. Le tube est placé à température ambiante pendant 2-3 minutes pour laisser sédimenter les morceaux de tissu, puis le surnageant est éliminé. La suspension cellulaire est obtenue par ajout de 1 mL de solution A (HBSS sans Ca²⁺ ni Mg²⁺ ; BSA 0,5% ; PS 1%), au culot suivi de 10 à 15 pipetages délicats à l'aide d'une P1000. La suspension cellulaire est filtrée sur un tamis de 70 µm, qui est ensuite lavé avec 1 mL de solution A. Les cellules sont finalement comptées à l'aide d'un compteur cellulaire après l'ajout du bleu de trypan (mélange v/v : 10 µL de suspension cellulaire + 10 µL de bleu de trypan). La suspension cellulaire est centrifugée 5 min à 600 g à température ambiante, puis la concentration cellulaire est ajustée à 1-2x10⁶ cellules vivantes/mL à l'aide de la solution A.

L'iodure de propidium 1/1000 est ajouté avant de passer la suspension cellulaire au wsé. Les OPCs isolés sont récupérés dans 500 µL de milieu OPC-A contenant 0,5 % de BSA. Finalement, les cellules sont centrifugées 5 min à 500 g et le culot est remis en suspension dans 1 mL de milieu de prolifération (voir section 8.3.).

8.2.2. Par tri immunomagnétique (MACS)

Le traitement du cerveau du nouveau-né se déroule comme décrit pour le tri par FACS jusqu'au comptage cellulaire au bleu de trypan.

Après comptage, les cellules sont centrifugées à 5 min à 600 g et le culot cellulaire est remis en suspension dans 80 µL de tampon MACS dégazé aux ultrasons (DPBS pH 7.2 ; BSA 0.5%) pour un nombre de cellules allant jusqu'à 10⁷ au maximum. Un volume de 10 µL de FcR *blocking reagent* (130-

101-502, Miltenyi Biotec) est ajouté, la solution est mélangée et incubée pendant 10 min à 4 °C. Ensuite, pour une quantité allant jusqu'à 10^7 cellules, un volume de 10 µL microbilles magnétiques recouvertes d'IgG2b de rat anti-PDGFRα de souris (130-101-502, Miltenyi Biotec) sont ajoutés et le mélange est incubé pendant 10 min à 4 °C.

Ensuite, 1 à 2 mL de tampon de tampon MACS sont ajoutés et après une centrifugation de 10 min à 300g, le culot est remis en suspension dans 500 µL de tampon MACS. Pendant la centrifugation, une colonne MS est placée dans le champ magnétique du séparateur MACS et est conditionnée par ajout de 500 µL de tampon MACS. La suspension cellulaire est déposée sur la colonne. Après passage de celle-ci au travers de la colonne, trois lavages par 500 µL de tampon MACS sont réalisés afin d'éliminer les cellules non retenues. La colonne est retirée du séparateur MACS et les OPCs sont récupérés par l'ajout d'un 1 mL de tampon MACS puis sont analysés au FACS.

8.2.3. Par centrifugation différentielle

Après isolement des hémisphères cérébraux d'un nouveau-né P4 Sox10-GFP, ceux-ci sont finement fragmentés à l'aide d'un scalpel et transféré dans un tube contenant 1 mL d'Accumax glacé (A7089, Sigma). L'homogénat est dissocié mécaniquement en réalisant 10 aspiration-refoulement à l'aide d'une pipette de 1 mL. Ensuite, 4 mL de solution de dissociation (200 µl de Papaine 1mg/ml dans 4 mL OPC-A ; voir Tableau 5) sont ajoutés et la suspension est incubée pendant 30 min à 37 °C sous 5 % CO₂ sous agitation constante (60rpm).

La suspension cellulaire est ensuite centrifugée à 300 g pendant 5 min à température ambiante. Le surnageant est éliminé et le culot est remis en suspension dans 1 mL d'Optiprep 12 % (7820, Stem Cells ; voir Tableau 5) en réalisant 10 aspiration-refoulement à l'aide d'une pipette de 1 mL. Après ajout de 3 mL d'Optiprep 12%, la suspension est centrifugée, à 200 g pendant 15 min à température ambiante (pas de frein). Le surnageant est collecté et 4 mL de milieu de dissociation lui sont ajoutés. La suspension est soumise à une dernière centrifugation à 200 g pendant 15 min à température ambiante (pas de freins). Le culot est resuspendu dans 1 mL de solution A (HBSS sans Ca²⁺ ni Mg²⁺ ; BSA 0,5% ; PS 1%). Une partie est utilisée pour le comptage au FACS, l'autre pour la culture cellulaire.

8.3. Culture et différenciation cellulaire

Après isolement, les OPCs sont mis en culture selon les densités suivantes :

- Plaque 12 puits : 50 000 cellules par puits dans un volume de 1 mL de milieu de prolifération,
- Plaques 24 puits (sur lamelles) : 30 000 cellules par puits sontensemencées dans un volume de 500 µL.

Tableau 5 : Composition des milieux utilisés pour la purification d'OPC par centrifugation différentielle

Solution	Composition
Milieu de dissociation	Milieu OPC-A (sans FGF ni PDGF) + 200 µl de Papaine 1mg/ml
Milieu Optiprep 12 %	1,2 mL d'Optiprep et 8,8 mL de milieu de dissociation

Le milieu de prolifération utilisé est le milieu OPC-A (DMEM/-F12 comprenant du glutamax (31331-028, Gibco) supplémenté avec 1 % N2 (17502048, ThermoFisher), 2 % B27 (17504044, ThermoFisher), 1 % PS (L0022, Biowest) qui peut se conserver 15 jours à 4°C et auquel est ajouté lors de l'utilisation 40 ng/mL de FGF-2 humain recombinant (100-18B, PreproTech), 20 ng/mL de PDGF-AA humain recombinant (130-138-938, Miltenyi Biotech).

Le milieu de prolifération des OPCs est renouvelé toute les 48 h. La différenciation des OPCs en OLs est réalisée après passage des cellules ayant proliféré pendant 7 jours en plaque 12 puits. Pour ce faire, les puits sont rincés au PBS, puis les cellules sont traitées à l'Accutase (00-4555-56, ThermoFisher) pendant 8 min à 37 °C. Après détachement des cellules, la réaction est arrêtée par simple dilution dans 3 mL de milieu OPC-A et les cellules sont récupérées par 10 min de centrifugation à 600g. Les OPCs sont mis en culture sur des lamelles de verre à la densité décrite ci-dessus pendant 2 jours.

La différenciation des OPCs en OLs est induite grâce au milieu de différenciation qui correspond à du milieu OPC-A additionné de 10 ng/mL de CNTF de rat recombinant (450-50, PreproTech) et de 40 ng/mL de 3,3',5-Triiodo-L-thyronine (T3) (100-0548, StemCell).

9. Analyse d'OPCs et d'OLs en culture par immunofluorescence

Les puits sont lavés deux fois pendant 5 min à température ambiante avec 500 µL de PBS. Les cellules sont fixées pendant 20 minutes à température ambiante avec un volume de 500 µL de PFA 4 %. Après trois lavages au PBS, le blocage et la perméabilisation sont effectués pendant 4 h à 4 °C en ajoutant une solution de PBS-T (PBS ; Triton X-100 0,2%) comprenant 10 % de sérum d'âne. Après élimination de cette solution, les cellules sont incubées avec l'anticorps primaire (Tableau 6) dilué dans 370 µL d'une solution de PBS-T comprenant 5 % de sérum d'âne. L'incubation est effectuée à 4 °C toute la nuit.

Le lendemain, les cellules sont lavées trois fois 5 min avec du PBS. Puis, elles sont incubées 1 h à température ambiante et à l'abri de la lumière avec l'anticorps secondaire fluorescent (1/1000) et du DAPI (1/5000), dilués dans 370 µL de PBS-T contenant 1 % de sérum d'âne. Après trois nouveaux lavages de 5 min au PBS, chaque lamelle est prélevée du fond du puits, trempée brièvement dans de l'eau distillée et égouttée sur du papier Tork. Le montage est réalisé en déposant une goutte de *Dako mounting medium* sur une lame puis en y apposant délicatement la lamelle (cellules face à la lame). Après séchage, les lames sont conservées à 4 °C jusqu'à analyse au microscope confocal NikonA1R.

10. Analyse statistique

Les analyses statistiques ont été réalisées sur le logiciel GraphPad Prism 8.3.0. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne et le seuil de significativité est fixé à $p < 0.05$.

Tableau 6 : Anticorps utilisés pour l'analyse par immunofluorescence de cellules en culture

Anticorps	Espèce d'origine	Type	Dilution	Référence
Anticorps primaires				
Anti-PDGFR α	Chèvre	Polyclonal	1/500	AF1062, R&D Systems
Anti-GFP	Chèvre	Polyclonal	1/500	ab6673, Abcam
Anti-Beta3-Tubuline	Lapin	Monoclonal	1/500	5568, Cell Signaling
Anti-CNPase	Lapin	Monoclonal	1/500	5664, Cell Signaling
Anti-Olig2	Lapin	Monoclonal	1/500	ab109186, Abcam
Anti-MBP	Rat	Monoclonal	1/500	MAB386, Milipore
Anticorps secondaires				
Alexa fluor 488 anti-IgG chèvre	Ane	Polyclonal	1/1000	A11055, ThermoFisher
Alexa fluor 647 anti-IgG chèvre	Ane	Polyclonal	1/1000	A21447, ThermoFisher
Alexa fluor 647 anti-IgG lapin	Ane	Polyclonal	1/1000	A31573, ThermoFisher
Alexa fluor 647 anti-IgG rat	Ane	Polyclonal	1/1000	A78947, ThermoFisher

Les tests utilisés dépendent des expériences réalisées et sont : le test t de Student (bilatéral apparié ou non), l'ANOVA à deux facteurs suivie d'un test de comparaison multiple post hoc de Sidak et l'ANOVA à un facteur suivie d'un test de comparaison multiples post hoc de Tukey. Les résultats sont exprimés avec la valeur de la statistique (t ou F selon les tests) accompagné de la p -valeur.

Résultats

Résultats

1. Identification des souris CILK1 -/- et procédure de dissection

1.1. Génotypage

Les embryons issus de différents croisements de souris hétérozygotes CILK1 (+/-) ont été génotypés après prélèvement tissulaire réalisé lors de la dissection embryonnaire. La PCR effectuée sur ces prélèvements a permis de distinguer les embryons sauvages (+/+ ou WT), hétérozygotes (+/- ou HET) et homozygotes invalidés (-/- ou KO) pour le gène CILK1. Si, sur un grand nombre d'individus, la répartition des génotypes se fait suivant les proportions mendéliennes attendues (environ 25% de WT, 25% de KO et 50% de HET), il n'en est pas forcément de même d'une portée à l'autre, comme en atteste la Figure 11. Concernant les souris de la lignée Sox10-GFP-DTA, le génotypage par PCR permet de confirmer la présence ou l'absence du transgène GFP, mais pas le nombre de copie (Figure 11). Toutefois comme tous les croisements ont été réalisés entre un individu porteur de la construction et un individu WT, nous sommes certains qu'une seule copie du transgène est présente.

1.2. Répartition des embryons et stratégie expérimentale

Afin de garantir la représentativité biologique des résultats obtenus, les embryons analysés pour chaque approche expérimentale sont systématiquement issus de portées comprenant au moins un individu WT et un individu KO. Cette stratégie est rendue nécessaire par l'impossibilité de déterminer avec précision le moment de la fécondation, les accouplements étant réalisés sur une période nocturne. Compte tenu de la courte durée du développement intra-utérin chez la souris (environ 19,5 jours) et du fait que la fécondation est conventionnellement datée à minuit, une variabilité temporelle non négligeable peut exister entre les embryons d'un même âge gestationnel théorique.

La stratégie de répartition a été définie comme suit :

- Les expériences d'IHC ont été réalisées avec un effectif de **N=3** par génotype.
- Les Western blots ont été effectués avec un effectif de **N=4 à 6** par génotype selon le marqueur étudié (voir point 4.1).
- Les expériences de FANS ont été réalisées avec un effectif de **N=3** par génotype.
- Mises au point : Lorsque les lignées C57BL6/J et Sox10-GFP-DTA ont été utilisées pour des mises au point techniques, aucun effectif expérimental n'a été considéré.

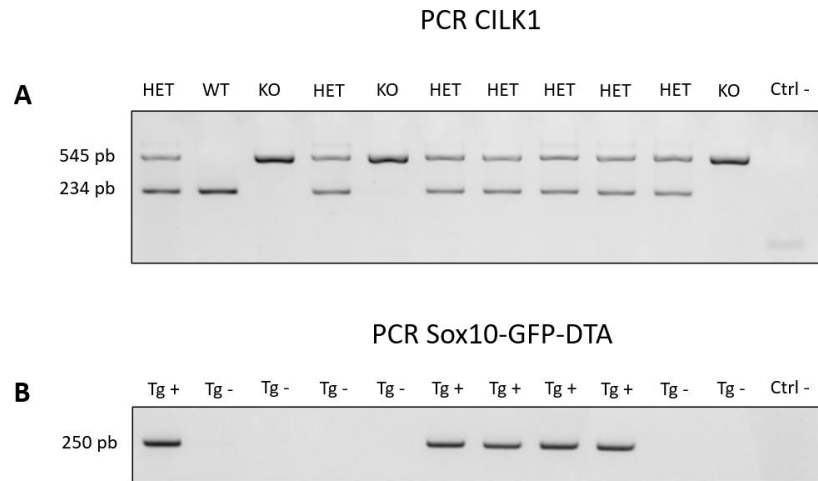


Figure 11 : Identification du génotype des individus issus du croisement entre souris CILK1-HET ou Sox10-GFP-DTA.

PCR CILK1 : L'allèle sauvage (WT) présente une bande à 234 pb, tandis que l'allèle invalidé (KO) est caractérisé par une bande à 545 pb. Les individus hétérozygotes (HET) présentent une bande à 234 pb et une bande à 545 pb (A). PCR Sox10-GFP-DTA : L'allèle du transgène GFP-DTA présente une bande à 250 pb. Les individus Tg + présentent cette bande, les individus Tg - ne la présentent pas (B).

2. Influence de CILK1 sur la neurogenèse et l'oligodendrogenèse corticale

2.1. Critères histologiques d'identification des régions rostro-caudales

Afin d'analyser l'influence de l'absence de CILK1 sur la neurogenèse et l'oligodendrogenèse corticale, trois niveaux de coupe coronales, répartis le long de l'axe rostro-caudal du cortex à E18.5, ont été sélectionnés. Leur identification repose sur plusieurs critères histologiques. La localisation de ces niveaux a été déterminée à l'aide de l'atlas du cerveau prénatal de la souris ⁷⁶ qui a servi de référence pour définir les plans de sections utilisés (Figure 12).

Le niveau rostral (E18 coupe coronale 7) correspond à la partie antérieure du télencéphale. Sur cette coupe, les ventricules sont fins et droits. Les deux hémisphères (droit et gauche) semblent séparés mais sont reliés en leur centre par le corps calleux. Sur ce niveau de coupe, seule la partie dorsale (D) du cortex a été prise en compte.

Le niveau médial représente une partie plus centrale du cortex (E18 coupe coronale 10). Le corps calleux est bien identifiable au niveau de la ligne médiale. Les ventricules sont bien visibles, le putamen caudé et le noyau septal latéral sont bien développés. Nous n'avons pu utiliser de coupe plus médiale de type coronales 11 et 12 car chez les souris CILK1-KO, nous avons été confrontés à un soucis de déchirement des coupes important au niveau des structures situées sous le corps calleux. Sur ce niveau de coupe, les parties dorsale (D) et dorso-latérale (DL) du cortex ont été considérées.

La région caudale correspond à la partie postérieure du cerveau (E18 coupe coronale 14-15). La structure clé de cette région est l'apparition de la formation hippocampique et un troisième ventricule bien identifiable et « isolé » en position ventrale. Sur ce niveau de coupe, les parties dorsale (D) et dorso-latérale (DL) du cortex ont été prises en compte.

L'âge embryonnaire E18,5 a été choisi car il constitue le dernier jour viable pour les souris CILK1 -/- et il comprend aussi le début de la troisième vague de production d'OPCs issue du pallium dorsal ⁶⁷.

2.2. Mesure de l'épaisseur corticale

Afin d'évaluer l'influence de l'absence de CILK1 sur le développement cortical, nous avons mesuré l'épaisseur du cortex au niveau des trois repères rostro-caudaux définis ci-dessus (point 2.1). Pour ce faire, nous avons tracé une ligne perpendiculaire à la région bordant le ventricule et allant jusqu'à la pie mère afin de comparer les cerveaux d'embryons de souris WT et CILK1 KO à E18.5 (Figure 13).

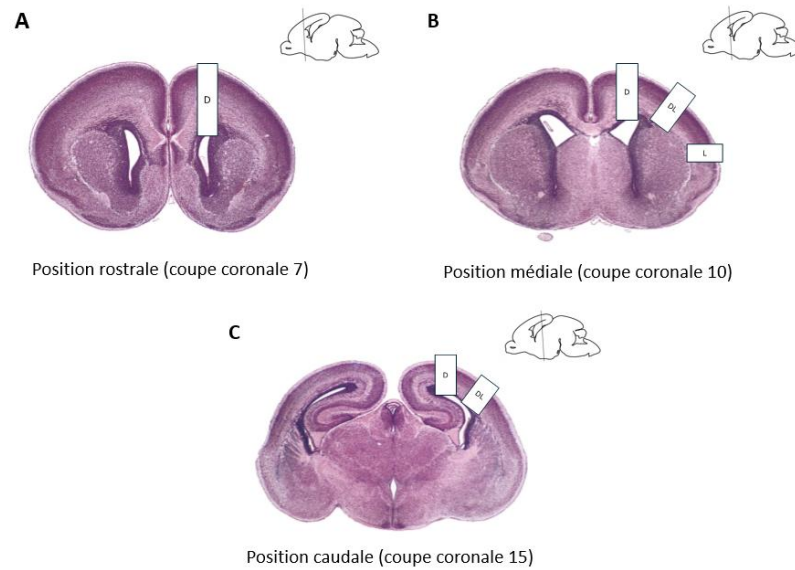


Figure 12 : Coupes coronale du cerveau d'embryon E18 issues de l'atlas prénatal de souris illustrant les trois niveaux rostro-caudaux considérés pour l'analyse.

Position rostrale (A) Position médiale (B) Position caudale (C). D : dorsal, DL : dorsolatéral, L : latéral.

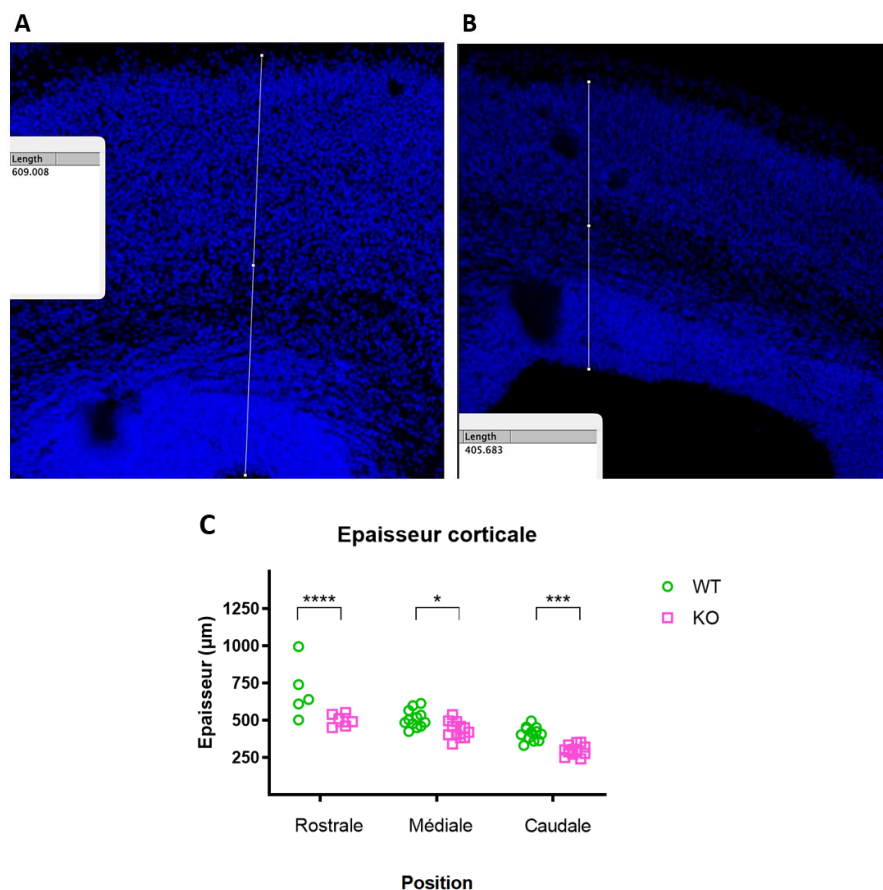


Figure 13 : Comparaison de l'épaisseur corticale du cerveau de souris WT et CILK1 KO à E18.5 le long de l'axe rostro-caudal.

Exemple d'image après coloration au DAPI d'une coupe rostrale du cortex du cerveau WT (A) et KO (B). Analyse statistique de l'épaisseur corticale (μm) aux niveaux rostral, médial et caudal chez les embryons WT et KO (C).

L'analyse quantitative démontre une diminution significative de l'épaisseur corticale chez les embryons CLK1 KO par rapport aux embryons WT sur l'ensemble de l'axe rostro-caudal (Figure 13). L'ANOVA à deux facteurs révèle un effet significatif de la position ($F(2,53)=48,1$; $p=0,0001$) ainsi que du génotype ($F(1,53)=43,2$; $p=0,0001$) mais sans interaction significative entre ces facteurs. Le test post hoc de Sidak confirme qu'au niveau rostral, cette réduction est extrêmement marquée chez le KO ($p<0,0001$). Cependant, l'effet observé au niveau médial est moins marqué, quoique statistiquement significatif ($p=0,0325$). Enfin le niveau caudal présente une diminution hautement significative chez le KO ($p=0,0006$).

2.3. Procédure pour le comptage automatisé

Dans le but d'assurer une analyse quantitative et reproductible de la densité cellulaire, ainsi qu'une comparaison fiable des signaux entre tous les échantillons, l'acquisition des images au microscope confocal a été réalisée sur plusieurs niveaux de l'épaisseur de chaque coupe (Z series) selon les paramètres standardisés suivants :

- Canal DAPI : gain (HV) de 90, *offset* de -10 et puissance laser de 3.0 %,
- Canal Alexa Fluor 647 : gain (HV) de 110, *offset* de -13 et puissance laser de 9.0 %,
- Pinhole : maintenu à 1.1 AU (Airy Unit) pour les deux canaux.

Pour réaliser le comptage automatique à l'aide du logiciel Qupath, nous avons utilisé les paramètres suivant : *pixel size* 1,5 μ m ; *threshold* 700 et *cell expansion* 10 μ m. La Figure 14 montre comment le logiciel détecte et entoure individuellement chaque cellule détectée à partir du signal de fluorescence obtenu sur une zone déterminée du cortex.

2.4. Mesure de la densité corticale en cellules Olig2+ et Ctip2+

Afin d'évaluer l'impact de l'absence de CLK1 sur des populations spécifiques du cerveau, nous avons en premier lieu, quantifié la densité corticale des cellules Olig2, marqueur de la lignée oligodendrocytaire, et Ctip2 le marqueur des neurones de projection des couches profondes, au niveau des trois repères rostro-caudaux à E18.5. Nous avons envisagé d'analyser la densité de cellules Nkx2.1+ qui proviennent de la MGE et se différencient en interneurones Sst+ et Pv+ mais malheureusement à cet âge, les cellules corticales dérivant de cette région n'expriment plus ce facteur de transcription contrairement à celles ayant migré dans les régions sous-corticales⁷⁷.

2.4.1. Quantifications des cellules Olig2+

L'analyse par ANOVA à deux facteurs met en évidence un effet significatif de la position rostro-caudale sur la densité des cellules Olig2+ ($F(2,45)=7,9$; $p=0,0011$). En revanche, aucun effet significatif

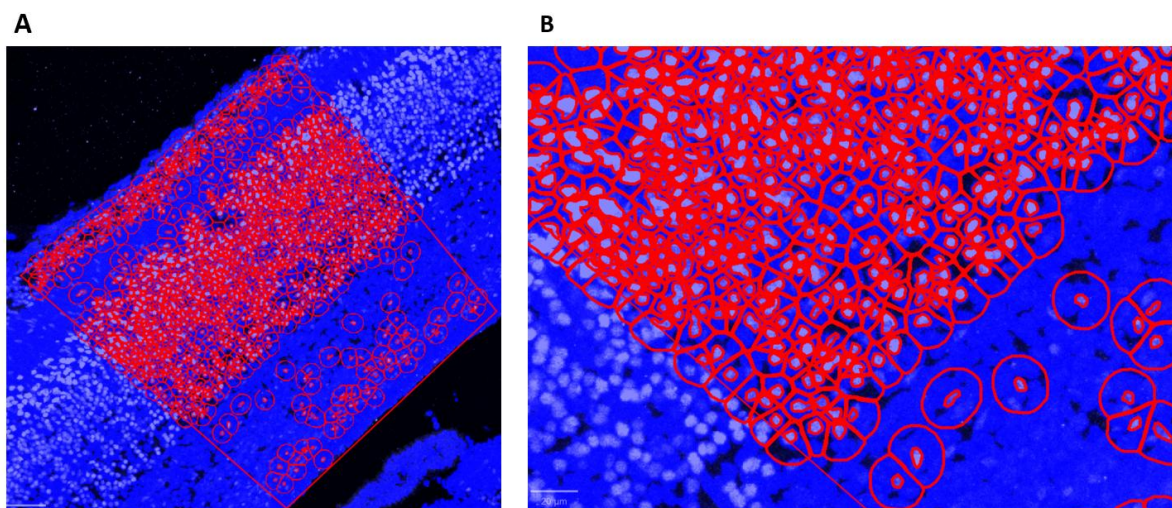


Figure 14 : Illustration de la méthode de détection et de segmentation cellulaire automatisée par QuPath.

Image représentative de la zone d'intérêt délimitée manuellement. Les cercles entourant chaque cellule individuellement illustrent la capacité du logiciel à individualiser les cellules de façon automatisée, servant ensuite de base pour le calcul des densités cellulaires (A). Zoom de la région d'intérêt permettant de mieux visualiser les cercles de segmentation entourant les cellules (B).

du génotype n'est observé ($F(1,45)=3,8$; $p=0,057$), pas plus qu'une d'une interaction position et génotype ($F(2,45)=2,8$; $p=0,069$). Conformément à ces résultats, le test post hoc de Sidak ne révèle aucune différence significative quelle que soit la position entre les souris WT et CILK1-KO pour chacune des positions analysées.

Afin d'analyser l'effet de la position rostro-caudale au sein de chaque génotype, des ANOVA à un facteur ont été réalisées séparément. Chez les souris WT, la densité ne varie pas significativement ($F(2,22)=1,625$; $p=0,22$). A l'inverse, un effet significatif de la position est observé chez les souris CILK1-KO ($F(2,23)=6,578$; $p=0,0055$). Le test post hoc de Tukey indique que la densité est significativement plus faible en position caudale que dans la région rostrale ($p=0,011$) ou médiale ($p=0,021$) (Figure 15).

2.4.2. Quantifications des cellules Ctip2+

L'analyse par ANOVA à deux facteurs montre un effet significatif du génotype ($F(1,34)=10,28$; $p=0,0029$). Aucun effet significatif de la position ($F(2,34)=0,6$; $p=0,55$) ni d'interaction entre ces deux facteurs ($F(2,34)=1,08$; $p=0,352$) n'est observée. Les analyses post hoc de Sidak montre que la diminution observée chez les KO n'atteint la significativité qu'au niveau rostral ($p=0,0439$) (Figure 16).

3. Influence de CILK1 sur l'oligodendrogenèse hippocampique

Lors de l'analyse des coupes destinées à l'étude de la production des cellules Olig2+, nous avons constaté une faible densité de ces cellules au sein des structures hippocampiques. Cette observation nous a conduit à examiner plus en détail le déroulement de l'oligodendrogenèse dans cette région. Quatre structures ont été sélectionnées pour l'analyse : la formation hippocampique, la fimbria (faisceau de fibres associés à l'hippocampe), et selon le niveau de coupe considéré le subiculum (la voie principale de sortie de l'hippocampe vers le cortex entorhinal) ou le cortex rétrosplénial (une région adjacente à l'hippocampe mais qui n'en fait pas partie) (Figure 17).

Compte tenu de la taille plus restreinte de ces structures par rapport au cortex, l'analyse n'a pas été réalisée sur plusieurs niveaux de coupe le long d'un axe rostro-caudal. Un unique plan de coupe a donc été retenu.

Un test *t* de Student pour échantillon indépendants a été réalisé afin de comparer la densité de cellules Olig2+ dans les 4 structures des embryons WT et CILK1 KO. Les résultats mettent en évidence une diminution significative de la densité de cellules Olig2+ dans le cortex rétrosplénial ($t(9)=4,424$; $p=0,017$), le subiculum ($t(8)=3,271$; $p=0,011$), la fimbria ($t(9)=2,902$; $p=0,0175$) et la formation hippocampique ($t(9)=6,207$; $p=0,0002$).

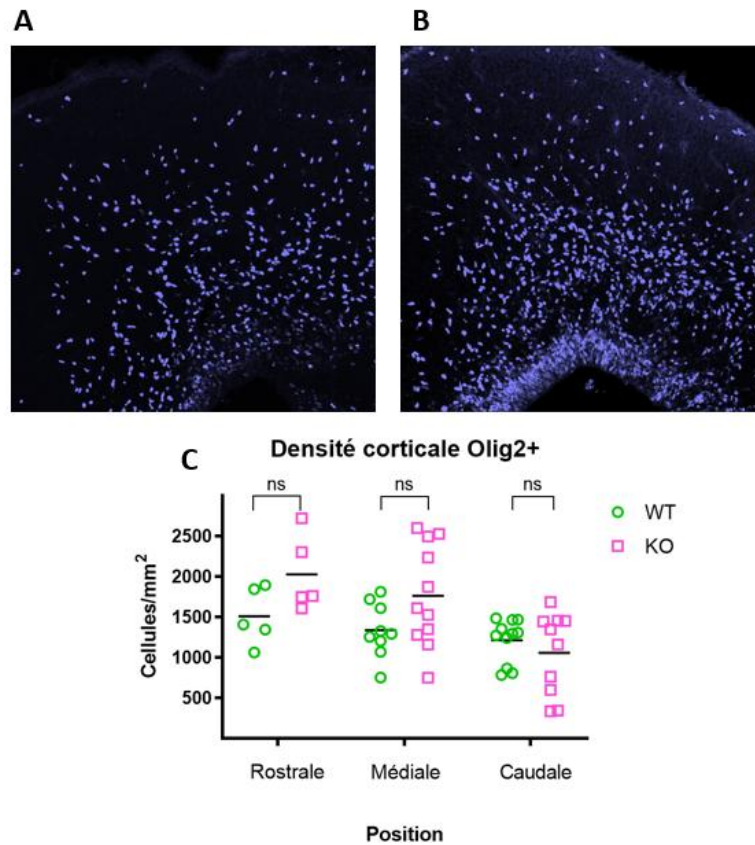


Figure 15 : Comparaison de la densité corticale des cellules Olig2+ entre les souris WT et CILK1 KO à E18.5 le long de l'axe rostro-caudal.

Images représentatives de coupes histologiques du néocortex en position rostrale à E18.5 du cerveau de souris WT (A) et CILK1 KO (B). Analyse statistique de la densité en cellules Olig2+ aux niveaux rostral, médial et caudal chez les embryons WT et KO (C).

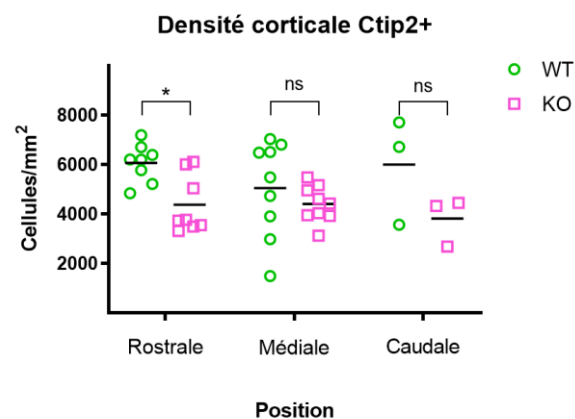


Figure 16 : Comparaison et analyse statistique de la densité corticale des cellules Ctip2+ entre les souris WT et CILK1 KO à E18.5 le long de l'axe rostro-caudal.

4. Contribution de CILK1 à la neurogenèse et l'oligodendrogenèse du prosencéphale

À la suite des observations réalisées au niveau de l'hippocampe, il nous a paru pertinent d'examiner si l'inactivation de CILK1 affectait également d'autres régions du prosencéphale. En effet, les fœtus atteints du syndrome ECO présentent d'importantes anomalies cérébrales, et le cerveau des souris CILK1^{-/-} apparaît lui aussi altéré. Dans ce contexte, il est légitime de s'interroger sur le développement des structures qui composent le prosencéphale chez ces animaux.

Par ailleurs, en l'absence, dans le cadre de ce mémoire, d'outils génétiques et d'anticorps permettant l'identification précise des différentes régions cérébrales, nous avons choisi des approches quantitatives globales. Bien que non spécifiques sur le plan histologique, elles devraient permettre d'évaluer les conséquences de l'absence de CILK1 sur l'organisation du prosencéphale.

4.1. Analyse du niveau d'expression des marqueurs Olig2, Ctip2 et Nkx2.1 par Western blot

Dans un premier temps, nous avons décidé de quantifier par Western blot le niveau d'expression des facteurs Olig2, Ctip2 et Nkx2.1 sur des extraits de protéines totales du prosencéphale au stade E18.5.

Deux méthodes d'extraction de protéines totales ont tout d'abord été comparées. La première utilise un tampon, RIPA et l'homogénéisateur de *Dounce*, la seconde utilise un tampon SDS et un système de lyse et d'homogénéisation par billes (Omni Bead Ruptor de la firme Revvity). Quel que soit le facteur de transcription considéré, des résultats légèrement meilleurs ont été obtenus par la méthode RIPA (résultats non montrés). Dans un second temps, pour chaque facteur étudié, nous avons testé différentes quantités de protéine totale permettant d'obtenir un signal non saturant afin de pouvoir réaliser des analyses quantitatives (résultats non montrés).

Une fois ces mises au point réalisées, une comparaison du niveau d'expression a été réalisée en utilisant l' α -tubuline comme protéine de ménage. Les résultats sont présentés dans la Figure 18.

Pour comparer objectivement le niveau d'expression d'une même protéine entre différents blots (c'est-à-dire entre différentes expériences de Western blot), une normalisation a été réalisée. Pour chaque échantillon, les résultats ont été exprimés sous forme de rapport protéine d'intérêt / α -tubuline. Une moyenne a ainsi pu être calculée pour les échantillons WT d'un même blot. Celle-ci a ensuite été arbitrairement fixée comme valant « 1 » ce qui a permis de calculer un ratio pour tous les échantillons (WT et KO) présents sur la membrane. Les valeurs obtenues suite à ce calcul sont reprises dans la Figure 18, sous chacune des images.

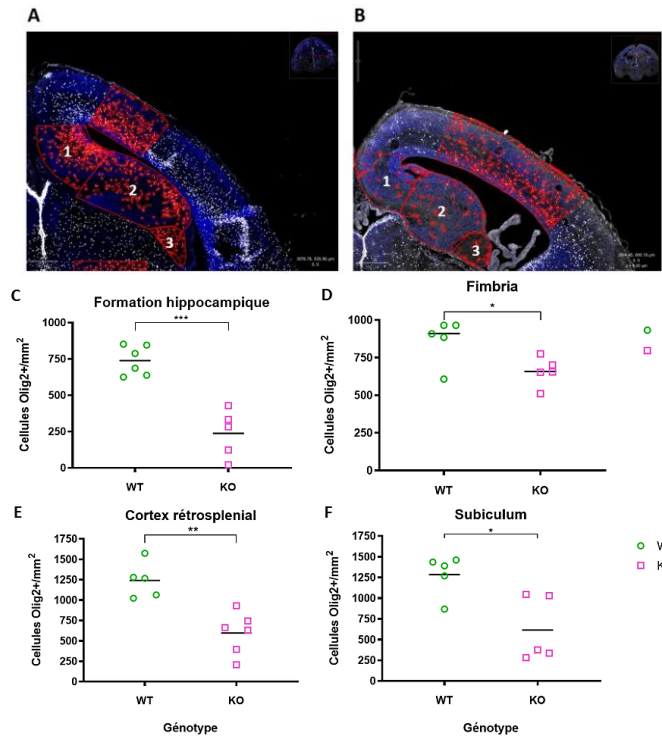


Figure 17 : Comparaison de la densité de cellules Olig2+ dans le subiculum, la formation hippocampique et la fimbria des souris WT et CILK1 KO à E18.5. Images représentatives de coupes histologiques de cerveau E18.5 entier de souris CILK1 WT (A) et KO (B). Les zones (1), (2) et (3) représentent respectivement le subiculum, la formation hippocampique et le fimbria. Analyse statistique de la densité en cellules Olig2+ dans la formation hippocampique (C), la fimbria (D), le cortex rétrospénial (E) et le subiculum (F).

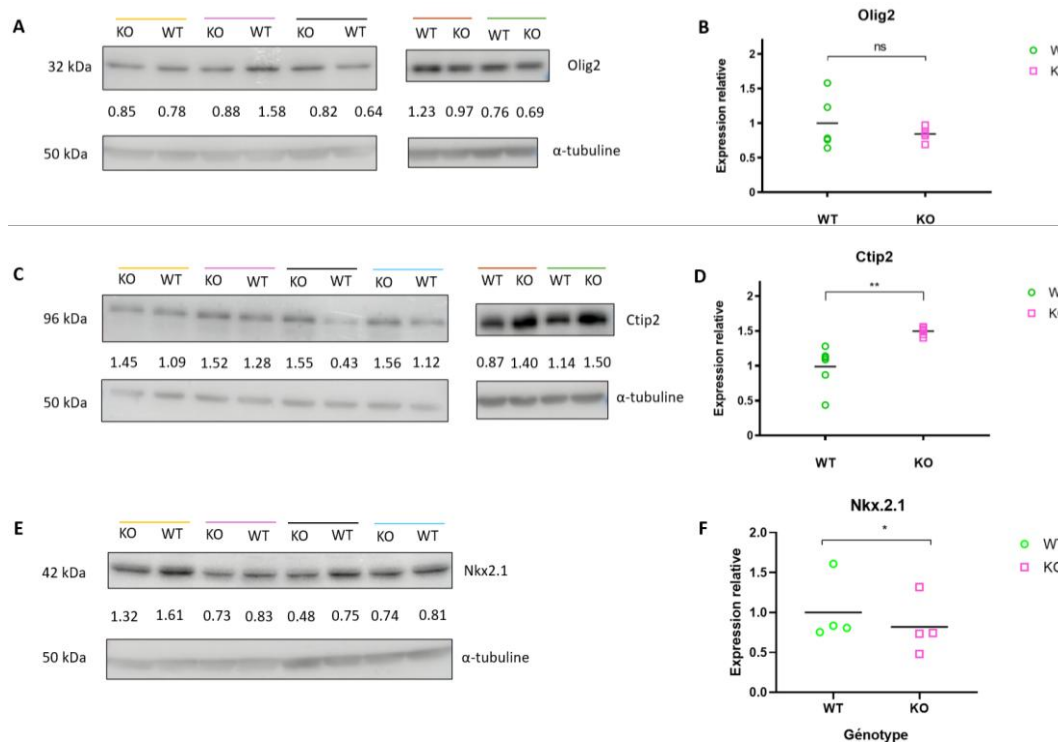


Figure 18 : Analyse par Western blot de l'expression des protéines Olig2 (32 kDa), Ctip2 (100 kDa) et Nkx2.1 (42kDa) dans le prosencéphale à E18.5. Images utilisées pour quantifier le niveau d'expression des protéines Olig2 (A), Ctip2 (C) et Nkx2.1 (E) et de la protéine de ménage α -tubuline. Les valeurs calculées après normalisation sur la protéine de ménage α -tubuline sont montrées. Analyse statistique du niveau d'expression dans le prosencéphale des embryons de la protéine Olig2 (B), Ctip2 (D) et Nkx2.1 (F).

Un test t de Student pour échantillon indépendants a été réalisé afin de comparer le niveau d'expression des différents facteurs de transcription dans le prosencéphale des embryons WT et CILK1 KO. Les résultats montrent qu'il n'y a pas de différence significative concernant l'expression d'Olig2 que le test soit pairé ou non ($t(7)=0,856$; $p=0,476$), qu'il y a une diminution de l'expression de Nkx2.1 chez le KO uniquement si les échantillons sont pairés ($t(3)=3,21$; $p=0,049$) et qu'une augmentation significative de l'expression de Ctip2 est observée quelle que soit la méthode ($t(10)=4,041$; $p=0,0024$ en non pairé). Cette variation du niveau d'expression de la protéine Ctip2 va en sens opposé à l'observation réalisée dans le cortex.

4.2. Comptage des OPCs par FACS

Afin de compléter nos analyses histologiques et biochimiques, une approche alternative utilisant le FACS a été envisagée pour évaluer la proportion d'OPCs présents dans le prosencéphale. L'idée étant d'obtenir une suspension cellulaire qui serait incubée avec un anticorps anti-PDGFR α pour ensuite réaliser un comptage de cellules au FACS.

Pour déterminer la dilution optimale d'anticorps, une mise au point de la méthode a été réalisée à l'aide des souris Sox10-GFP. En effet, la dilution optimale de l'anticorps anti-PDGFR α ne devrait plus marquer que les cellules GFP+. Le Tableau 7 reprend les résultats des deux expériences de mise au point et la Figure 19 montre le résultat FACS de la seconde expérience.

Nous avons appliqué la même série de dilutions à deux suspensions cellulaires dissociées issues de souris C57BL6/J mais préparées à des moments distincts. Les pourcentages de cellules PDGFR α positives obtenus étaient de 7,7% et 5,5%, correspondant à une variation d'environ 40% entre les deux expériences. Cette différence qui paraît néanmoins acceptable compte tenu de l'incertitude relative concernant l'âge réel des embryons ainsi que du fait que la troisième vague d'OPCs débute aux alentours du stade E17.

Nous avons toutefois choisi de ne pas poursuivre cette approche car elle nécessite l'utilisation de tissus frais, ce qui complique la procédure lorsqu'une même portée comprend plusieurs génotypes. Cette contrainte est d'autant plus importante qu'il n'est pas possible de distinguer anatomiquement les embryons WT et CILK1 HET, au contraire des embryons CILK1 KO qui présentent un phénotype de polydactylie.

4.3. Comptage des populations cellulaires par marquage des noyaux

Pour tenter de pallier au problème de l'analyse de cellules vivantes, une approche basée sur l'isolement des noyaux cellulaires a été envisagée. En effet les noyaux résistent mieux non seulement à l'extraction mais également à la congélation. Ce dernier aspect n'est pas négligeable puisqu'il permet

Tableau 7 : Test de dilution de l'anticorps PDGFR α pour le marquage des OPCs dans une suspension cellulaire de prosencéphale E18,5 de souris Sox10-GFP.

	Expérience 1		Expérience 2	
Dilution	PDGFR α +	PDGFR α +/GFP+	PDGFR α +	PDGFR α +/GFP+
1/100	17,7%	6,5%	12,7%	5,8%
1/250	7,8%	5,4%	8%	4,5%
1/500	7%	5%	5,5%	3,5%
1/1000	4,3%	4,2%	2,9%	2,6%

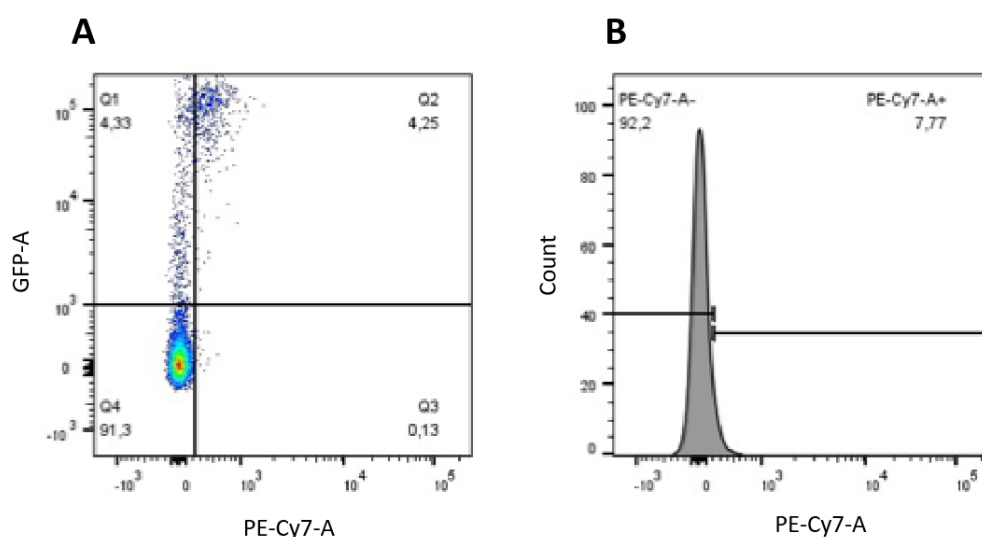


Figure 19 : Quantification de la population d'OPCs dans un prosencéphale E18,5 par cytométrie en flux.

Dilution de l'anticorps anti-PDGFR α permettant de ne détecter que des cellules de la lignée oligodendrocytaire GFP+ dans une suspension cellulaire d'embryon Sox10-GFP (A). Pourcentage de cellules PDGFR α + détectées avec la même dilution d'anticorps dans une suspension cellulaire d'embryon C57Bl6/J (B). Dans tous les cas, les cellules ont été sélectionnées après exclusion des débris et des doublets.

de déterminer le génotype des embryons avant de réaliser l'extraction, ce qui évite de travailler sur tous les embryons dont probablement une grande partie (les CILK1 HET) seront, en tout cas dans un premier temps, inutiles.

Nous avons décidé de travailler sur les trois marqueurs à savoir NeuN, un marqueur « pan-neuronal » exprimé dans tous les neurones post-mitotiques mais aussi Ctip2 et Olig2. Cette fois la mise au point de la dilution optimale de l'anticorps primaire n'a pu se faire à l'aide des souris Sox10-GFP puisque la fluorescence intrinsèque de la GFP est perdue lors l'étape de fixation. Pour ce type d'expérience nous allons utiliser un « contrôle isotypique ». Il s'agit d'anticorps contrôle qui partage la même espèce, la même classe d'immunoglobuline et le même fluorochrome que l'anticorps primaire. Toutefois il ne reconnaît aucune cible sur les cellules et permet donc de distinguer la liaison spécifique de l'anticorps primaire de la liaison non spécifique (Figure 20). Le contrôle isotypique pour Ctip2 n'étant pas arrivé dans le temps imparti pour ce travail, nous n'avons pu optimiser les conditions de sa détection. Des tests de dilutions de l'isotype contrôle et de l'anticorps primaire ont permis de déterminer une dilution qui semble optimale (Tableau 8). Celles-ci correspondent aux dilutions décrites dans l'article de Nott *et al.*⁷⁸.

Sur base de ces conditions, une analyse quantitative de la proportion de noyaux d'origine neuronale (à l'aide de NeuN) et oligodendrocytaire (grâce à Olig2) dans le prosencéphale des embryons E18,5 WT et CILK1 KO a été menée. Cette analyse suggère que le nombre la proportion de noyaux Olig2+ est plus faible chez la souris KO (Tableau 9). La Figure 20 reprend les résultats FACS. Signalons que nous suspectons une erreur dans l'expérience réalisée sur la première portée puisque les pourcentages de noyaux détectés sont très différents de ceux attendus sur base des mises au point. Pour cette raison aucun test statistique n'a été réalisé.

5. Culture et différenciation cellulaire des OPCs

Parallèlement aux études sur la souris, nous envisageons d'étudier *in vitro* le rôle de CILK1 dans l'oligodendrogenèse. Si pour les OPCs de rat une méthode basée sur le « *shaking* » existe depuis longtemps, elle s'est révélée inefficace pour l'isolement des OPCs de souris. Néanmoins plusieurs méthodes ont été développées et sont basées sur l'utilisation d'anticorps (*immunopanning*, MACS) ou de molécules fluorescentes (FACS). Récemment une méthode de centrifugation différentielle a aussi été décrite comme utilisable pour purifier les OPCs de souris^{79,80}.

Afin de comparer les 3 méthodes de purifications, des nouveaux nés Sox10-GFP âgés de 4 jours (P4) ont été utilisées.

Tableau 8 : Optimisation des dilutions de l'anticorps isotypique contrôle et de l'anticorps primaire pour le marquage de populations neuronales et oligodendrocytaires dans une suspension de noyaux isolés du prosencéphale de souris C57BL6/J (E18,5).

Dilution	Isotype	Anticorps primaire
NeuN		
1/600	10 %	92 %
1/1200	9 %	90 %
1/2500	1,9 %	79 %
Olig2		
1/1000	7 %	40 %
1/2000	2 %	15 %
1/2500	2 %	9 %

Tableau 9 : Pourcentage de population neuronale et oligodendrocytaire dans une suspension de noyaux isolés du prosencéphale d'embryon WT et CILK1 KO au stade embryonnaire E18,5.

	NeuN		Olig2	
	WT	KO	WT	KO
1 ^{ère} portée	97 %	91 %	22,6 %	22,2 %
2 ^{ème} portée	89,6 %	79,4 %	15,4 %	10,5 %
3 ^{ème} portée	90 %	82,3 %	14,9 %	10,2 %

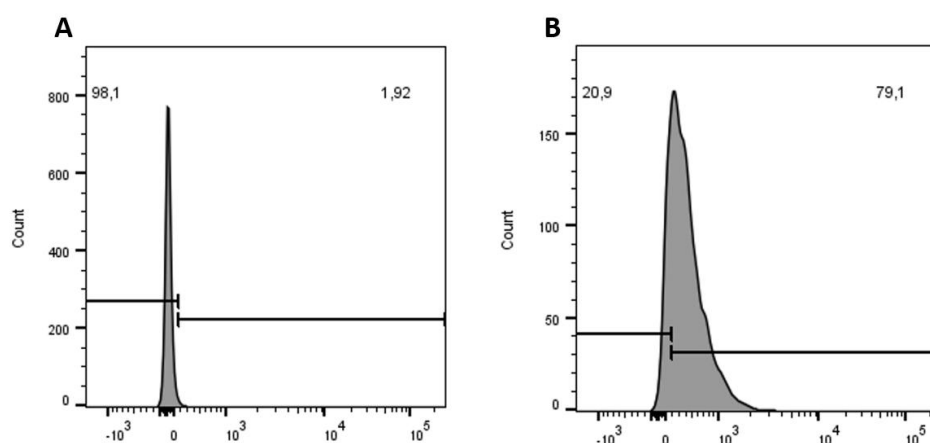


Figure 20 : Graphe FACS obtenu avec la dilution optimale montrant le marquage obtenu avec le contrôle isotypique (A) comparé au marquage obtenu avec l'anticorps primaire anti-NeuN (B).

Le seuil de positivité a été défini à partir de la distribution de fluorescence du contrôle isotypique.

5.1. Méthodes d'isolement des OPCs

5.1.1. Isolement d'OPCs par FACS

Deux cerveaux ont été soumis à une dissociation enzymatique à la papaïne et de $6,5 \cdot 10^6$ cellules vivantes (coloration au bleu de trypan) ont été triées au FACS. Un total de 370.000 cellules GFP+ ont été isolées, pour une pureté de 88% (Figure 21 A), ce qui correspond à environ 5,5% des cellules vivantes. Elles ont été mises en culture en partie sur lamelle et en partie dans des plaques 12 puits dans du milieu de prolifération pour OPC.

5.1.2. Isolement d'OPCs par MACS

Deux cerveaux ont été soumis à une dissociation enzymatique à la papaïne et de $4,8 \cdot 10^6$ cellules vivantes (coloration au bleu de trypan) ont été obtenues. Malheureusement après isolement au MACS, 53.000 cellules vivantes ont été isolées, ne représentant que 1,2% du total des cellules isolées. Leur analyse au FACS montre qu'environ 89% de ces cellules sont GFP+ (Figure 21 B). Cette expérience a été recommencée mais le rendement en cellules vivantes après purification par MACS était toujours aussi faible. Aucune mise en culture n'a été réalisée après isolement des OPCs par cette méthode.

5.1.3. Enrichissement des OPCs par centrifugation différentielle

Deux cerveaux ont été soumis à une dissociation enzymatique à l'aide d'un mélange accutase/papaïne et de $3,2 \cdot 10^6$ cellules vivantes (coloration au bleu de trypan) ont été obtenues. Elles ont été mises en culture en partie sur lamelle et en partie dans des plaques 12 puits dans du milieu de prolifération pour OPC sans tenir compte de la pureté. L'analyse par FACS montre que 30% de cellules récoltées sont GFP+ et sont donc des OPCs (Figure 21 C).

5.2. Culture et différenciation des OPCs

5.2.1 Après isolement par FACS

Les OPCs isolés par FACS ont été cultivés dans un milieu de prolifération. Après 7 jours de culture les OPCs sur lamelle ont été fixés à la PFA pour une analyse par immunocytochimie. Les OPCs qui avaient poussé en boîte 12 puits ont été passés etensemencés sur lamelle. Après deux jours de culture en milieu de prolifération, la différenciation en OLs mature a été induite par un changement de milieu et après 2 jours de différenciation les cellules ont été fixées pour analyse.

5.2.1.1. Immunofluorescence sur OPCs

Afin de vérifier la pureté de la population d'OPCs isolée par FACS, l'expression d'Olig2, un facteur de transcription nucléaire caractéristique de la lignée oligodendrocytaire, a été analysée conjointement avec le signal rapporteur GFP exprimé sous le contrôle du promoteur Sox10 spécifique la lignée oligodendrocytaire. L'analyse par microscopie révèle que l'ensemble des noyaux marqués au

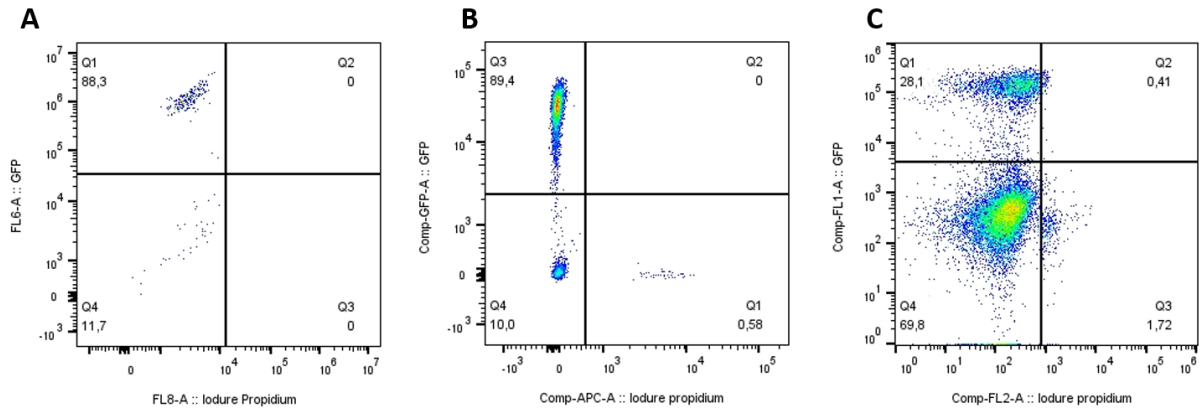


Figure 21 : Quantification par cytométrie en flux du pourcentage de cellules GFP+ obtenues après purification par trois méthodes distinctes

Purification par cytométrie en flux (A). Purification par billes magnétiques (MACS) (B). Purification par centrifugation différentielle (C). L'analyse a été réalisée après exclusion des débris cellulaires et des doublets

DAPI co-expriment la GFP et Olig2 (Figure 22 A et B), confirmant ainsi la pureté de la population cellulaire isolée.

Dans un second temps, afin de confirmer que ces cellules correspondaient bien à des OPCs non différenciés, l'expression du récepteur PDGFR α a été évaluée. L'observation au microscope montre que la totalité des noyaux identifiés par marquage au DAPI présentent un signal positif pour PDGFR α (Figure 22 C, D et E). L'expression de ce marqueur, caractéristique des OPCs, indique que les cellules ont bien conservé un état prolifératif et non différencié.

5.2.1.2. Immunofluorescence sur OLs

Ensuite, nous avons évalué l'efficacité de l'induction de la différenciation des OPCs en OLs en utilisant des marqueurs de différenciation de la lignée oligodendrocytaire à savoir la CNP qui est un marqueur assez précoce et la MBP qui apparaît au stade final de la différenciation. A ce stade, la culture présente une certaine hétérogénéité. L'analyse du marquage MBP au fort grossissement (40x) montre plusieurs choses (Figure 23). Tout d'abord deux types de noyau semblent exister sur base du marquage DAPI, un premier très petit et dense et un second plus volumineux et moins intense. Comme le montre les flèches jaunes, le deuxième type de marquage DAPI correspond à des cellules GFP+ excepté pour un seul cas (flèche cyan). L'existence d'autant de noyaux potentiels qui ne sont pas GFP+ pose la question de leur identité. D'autre part, plusieurs cellules GFP+ ne se sont pas différenciées en OLs mature exprimant la MBP comme le montre les flèches rouges. On constate aussi, comme attendu que la morphologie des cellules MBP+ est très complexe et correspond bien à celle d'OLs mature puisqu'ils semblent entourés d'un halo réagissant avec l'anticorps. Dans la littérature, ils sont décrits comme des OLs avec des feuillettes de myéline qui correspondent à des membranes partiellement formées⁸¹.

L'analyse de la large image (Figure 23) montre que la différenciation des OPCs en OLs mature est loin d'être complète mais avoisine les 25-30%, ce qui est en accord avec la littérature⁷⁹.

L'analyse du marquage CNP au fort grossissement (40x) ne montre pas plus de choses que le marquage MBP (Figure 24). La différence majeure provient plutôt de l'intensité du marquage avec la CNP qui est beaucoup moins importante qu'avec la MBP, ce qui pourrait plus aisément induire des faux positifs. Sinon comme attendu sur base de la littérature, la CNP se retrouve bien au niveau des feuillettes de myéline⁸².

En conclusion de cette expérience, l'expression de la MBP et CNP confirme que les OPCs isolés par FACS ont la capacité de se différencier et que le protocole de différenciation peut être validé.

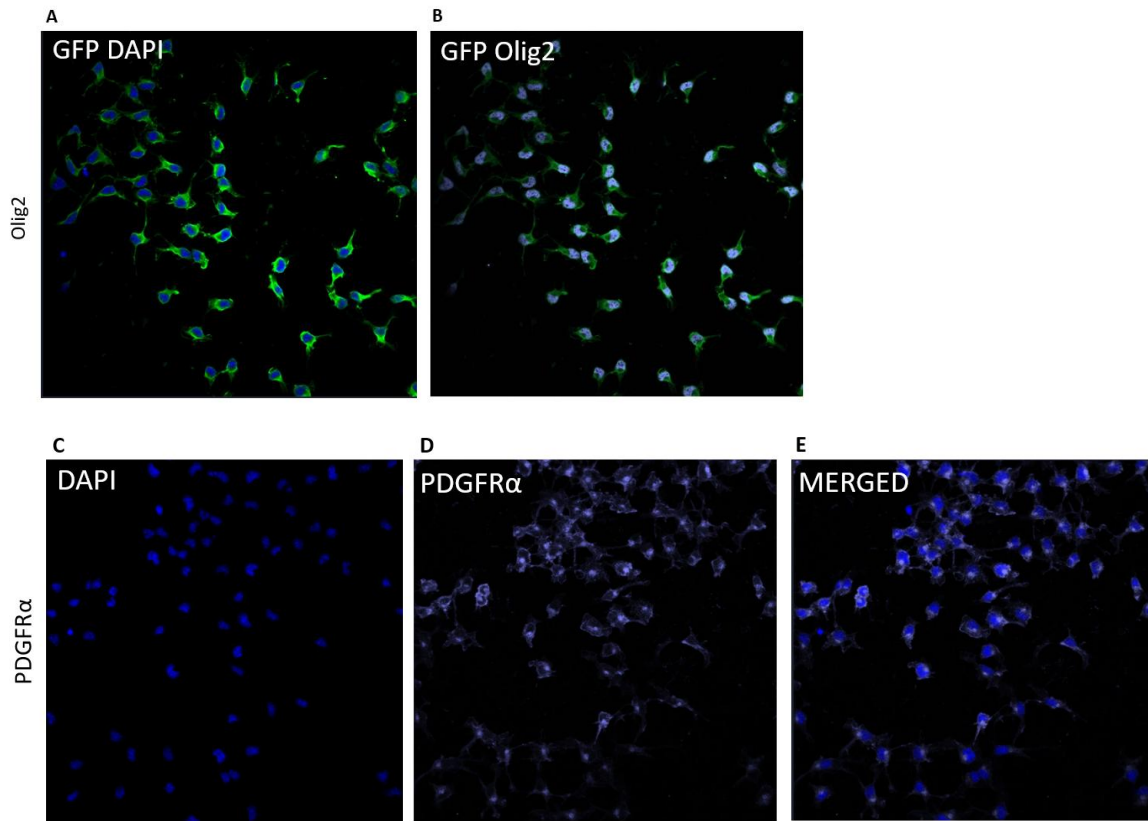


Figure 22 : Caractérisation immunocytochimique des OPCs *Sox10*-GFP isolés par FACS après 7 jours de culture en condition proliférative. Marquage au DAPI (bleu) et le signal GFP (vert) (A). Immunomarquage Olig2 (violet) en association avec le signal GFP (vert) (B). La deuxième série d'image concerne le marquage PDGFRα. Marquage nucléaire au DAPI (C). Immunomarquage du récepteur PDGFRα (D). Superposition des images C et D (E). Images de microscopie confocale au grossissement 40x

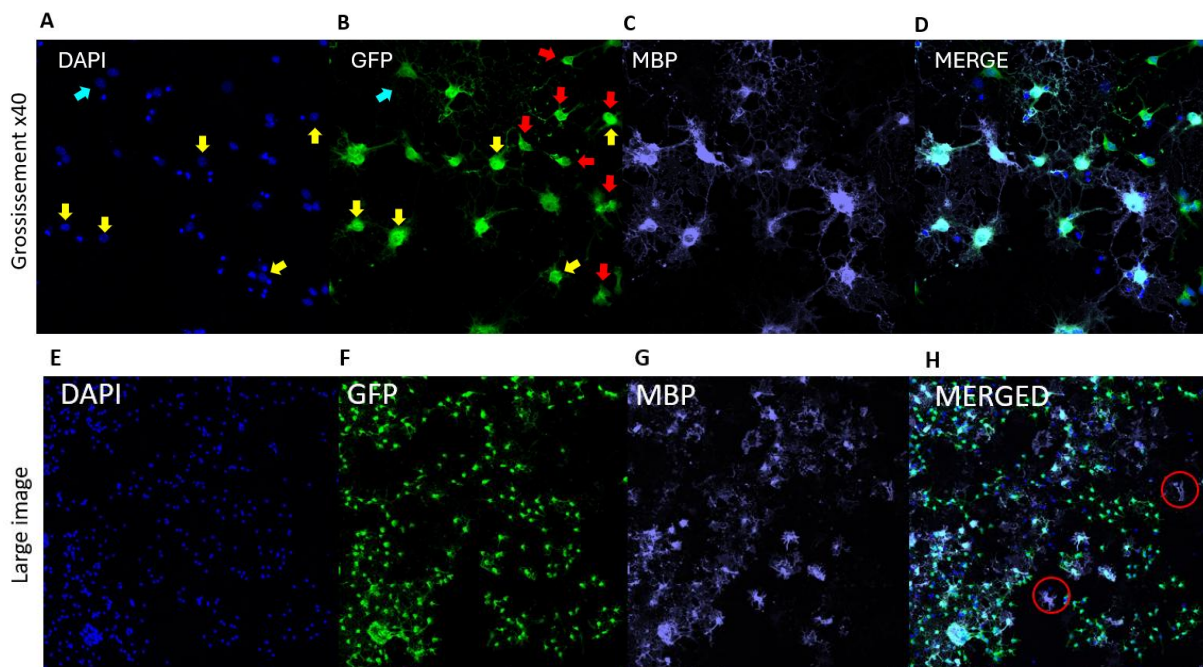


Figure 23 : Caractérisation immunocytochimique de l'expression de la MBP dans les OLs générés à partir d'OPCs isolés par FACS après 48h de différenciation. Images de microscopie confocales au grossissement 40x (images A à D) et au grossissement 20x en large image (images E à H). Marquage au DAPI (A, E). Signal GFP (en vert) (B, F). Immunomarquage contre la MBP (C, G). Superposition des 3 marquages (DAPI, GFP, MBP) (D, H). Les flèches jaunes montrent que les noyaux « volumineux » sont ceux de cellules GFP+. La flèche cyan montre le noyau « volumineux » d'une cellule GFP-. Les flèches rouges montrent des cellules GFP+/MBP-. Sur la large image sont entouré en rouge deux cellules exprimant la MBP mais pas la GFP

5.2.2. Après centrifugation différentielle

Les OPCs enrichis par centrifugation différentielle ont été cultivés dans un milieu de prolifération. Après 4 jours, les cultures ont été arrêtées et fixés à la PFA pour une analyse par immunocytochimie. En effet, en microscopie visible apparaissait clairement qu'une population cellulaire dont la morphologie ne ressemblait pas aux OPCs, proliférait au moins aussi bien sinon pas mieux que ces derniers.

De manière surprenante, l'analyse par immunocytochimie a démontré que toutes les cellules en culture sont Olig2+ (Figure 25), même celles qui n'expriment pas la GFP. L'analyse de l'image montre que la proportion des cellules GFP+ est d'environ 20%, ce qui est un peu moins que de la proportion de cellules GFP+ qui avait été mise en culture, suggérant que les cellules Olig2+/GFP- prolifère un peu plus vite que les OPCs. Une étude de la littérature révèle qu'il existe une population d'astrocytes Olig2+⁸³. Par manque de temps nous n'avons pu réaliser d'autres immunomarquages pour confirmer qu'il s'agit bien d'astrocyte.

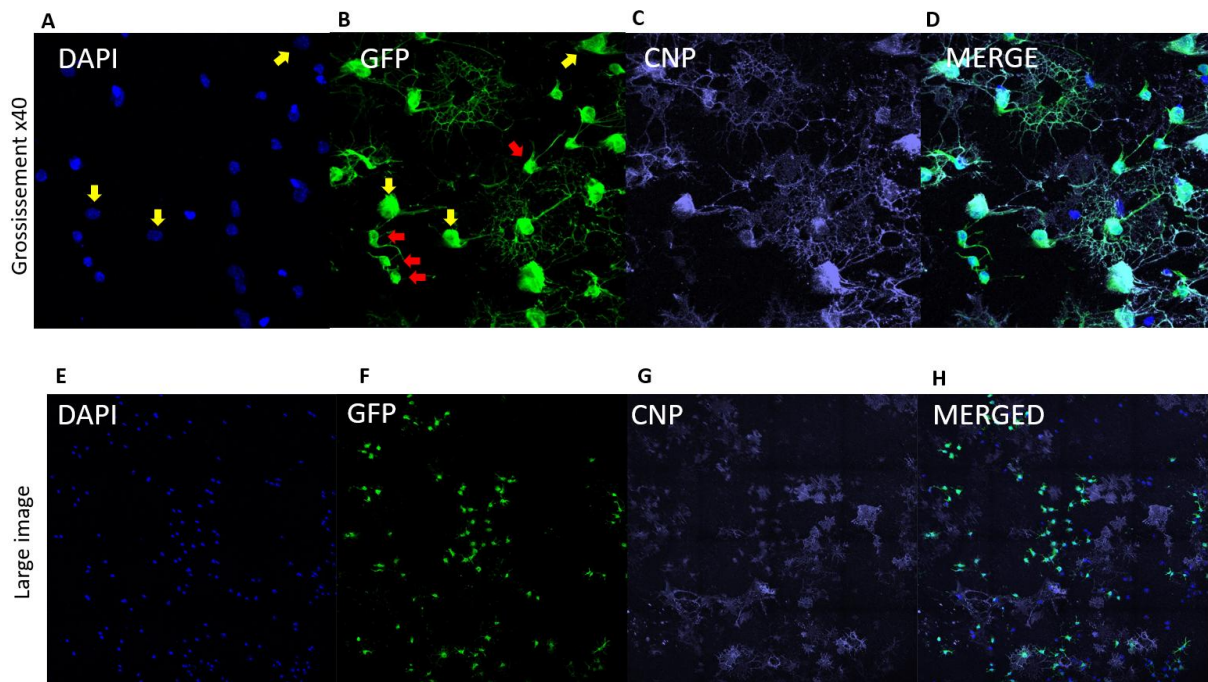


Figure 24 : Analyse immunocytochimique de l'expression de la CNP dans les OLGs générés à partir d'OPCS isolés par FACS après 48h de différenciation.

Images de microscopie confocales au grossissement 40x (images A à D) et au grossissement 20x en large image (images E à H). Marquage au DAPI (A, E). Signal GFP (en vert) (B, F). Immunomarquage contre la CNP (C, G). Superposition des 3 marquages (DAPI, GFP, CNP) (D, H). Les flèches jaunes montrent que les noyaux « volumineux » sont ceux de cellules GFP+. Les flèches rouges montrent des cellules GFP+/MBP-.

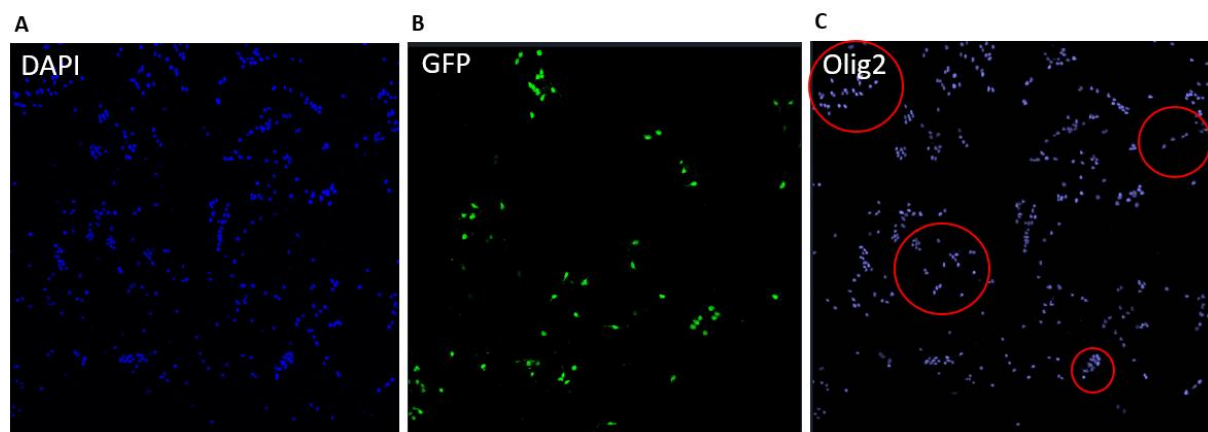


Figure 25 : Analyse par immunofluorescence validant la pureté des OPCs *Sox10*-GFP isolés par centrifugation différentielle après 4 jours en milieu de prolifération.

Images de microscopie confocales au grossissement 20x en large image. Marquage au DAPI (en bleu) (A). Signal GFP (en vert) (B). Immunofluorescence Olig2 (en violet) (C). En rouge sont entourées des groupes de noyaux colorés au DAPI n'exprimant pas la GFP mais exprimant Olig2.

Discussion

Discussion et perspectives

L'épilepsie myoclonique juvénile (EMJ) est une épilepsie génétique généralisée dont les premiers symptômes apparaissent à l'adolescence, une période de la vie durant laquelle, chez l'Homme, le processus de maturation des circuits neuronaux n'est pas encore achevé, en particulier au niveau du cortex préfrontal. D'un point de vue cellulaire et moléculaire, cette période se caractérise notamment par une myélinisation prolongée qui se poursuit beaucoup plus longtemps chez l'Homme que chez les autres mammifères. Parmi les gènes identifiés comme associés à l'EMJ, la « *Ciliogenesis Associated Kinase 1* » (CILK1) constitue un candidat particulièrement intéressant puisque son expression augmente fortement lors de la différenciation des progéniteurs oligodendrocytaires (OPCs) en oligodendrocytes matures (OLs). Cette observation suggère une implication de CILK1 dans ce processus de différenciation, susceptible d'influencer la myélinisation chez l'Homme.

L'objectif de ce travail était donc double. Il s'agissait, d'une part, d'étudier l'influence de CILK1 sur la production et la prolifération des OPCs *in vivo* et, d'autre part, de mettre au point une technique d'isolement, de culture et de différenciation des OPCs afin de développer des analyses complémentaires permettant d'évaluer les conséquences de l'absence de CILK1 sur l'oligodendrogenèse.

Dans la première partie de ce travail, les souris CILK1 KO ont été utilisées afin d'évaluer l'impact de cette kinase sur la neurogenèse et l'oligodendrogenèse corticales. En effet, les OPCs sont produits, comme toutes les cellules du cerveau à l'exception de la microglie, dans différentes régions cérébrales à partir des progéniteurs de glie radiaire (RGCs). Or, chez la souris CILK1 KO, le cil primaire des RGCs est fortement altéré, voire absent, et diverses anomalies cérébrales sont observées, notamment des bulbes olfactifs arrondis ainsi qu'un élargissement des ventricules associé à une réduction de l'épaisseur corticale, signe d'hydrocéphalie¹⁸.

Nous avons tout d'abord confirmé, au moyen de mesures précises qui n'avaient encore jamais été réalisées, que l'épaisseur corticale est effectivement diminuée sur l'ensemble de l'axe rostro-caudal chez les souris KO. Parallèlement, la densité des cellules Ctip2+ du cortex, qui marquent spécifiquement les neurones des couches V (fortement) et VI (plus faiblement), n'est pas modifiée, à l'exception de la région rostrale. Cela indique que le nombre de neurones Ctip2+ diminue proportionnellement à la réduction de l'épaisseur corticale. Bien qu'une analyse complémentaire à l'aide d'un marqueur des couches corticales supérieures, tel que Cux1, soit nécessaire, ces résultats suggèrent que la neurogenèse corticale est affectée par l'absence de CILK1. En revanche, l'oligodendrogenèse ne semble pas altérée, bien que la densité des cellules Olig2+ le long de l'axe rostro-caudal soit modifiée.

Il est tentant d'attribuer les effets observés sur la neurogenèse à un déficit de signalisation SHH dépendante du cil primaire, d'autant plus que le phénotype des souris CILK1 KO correspond à celui d'une ciliopathie et qu'il est bien établi que la voie canonique SHH favorise la prolifération des RGCs et des progéniteurs intermédiaires^{18,30,84}. En revanche, l'absence d'effet marqué sur l'oligodendrogenèse corticale apparaît plus surprenante, puisque de nombreuses études ont démontré l'importance de la signalisation SHH dans ce processus. Ainsi, les souris SHH KO présentent une absence totale de transcrits Olig2 le long de la ligne médiane ventrale, région connue pour exprimer SHH, et des études de gain et de perte de fonction ont montré que SHH est à la fois nécessaire et suffisant pour l'expression des gènes Olig⁸⁵. De même, les souris Nkx2.1 KO, dépourvues de domaine d'expression de SHH dans le télencéphale, ne possèdent aucun OPC PDGFR α + dans la zone ventriculaire du cerveau antérieur⁶⁴. Des travaux plus récents ont cependant nuancé ce modèle. Vers la fin de la neurogenèse, les RGCs corticaux génèrent des progéniteurs intermédiaires tripotents (Tri-IPC) capables de produire une sous-population d'oligodendrocytes corticaux, d'astrocytes et d'interneurones du bulbe olfactif. La signalisation SHH est essentielle à la génération de ces cellules GSX2+ en réduisant les niveaux de Gli3R⁶⁸. Il apparaît néanmoins que l'activation de la voie RAF–MEK–ERK constitue un déterminant majeur de l'acquisition de la compétence gliogénique des progéniteurs neuronaux corticaux. Une fois cette compétence acquise, la signalisation SHH agirait de manière coopérative afin de favoriser la génération de la lignée oligodendrocytaire, avec des effets dépendants du contexte régional et du stade développemental⁸⁶.

Nos résultats sur l'oligodendrogenèse semblent donc difficilement explicables par une simple altération de la signalisation SHH. La variation de densité des cellules Olig2+ le long de l'axe rostro-caudal suggère qu'un autre morphogène pourrait être impliqué chez la souris CILK1 KO, en particulier les membres de la famille des FGF (*Fibroblast Growth Factors*), dont certains, comme FGF8 et FGF17, sont produits par l'organisateur rostral, et ce d'autant plus que les récepteurs FGFR1, FGFR2 et FGFR3 sont exprimés dans le cortex cérébral aux stades embryonnaires E15 et E18⁸⁷. Il a par ailleurs été démontré que la phosphorylation d'Ascl1, induite par l'activation de la signalisation FGF, oriente les progéniteurs vers la voie oligodendrocytaire⁸⁸. Or, CILK1 interagit avec FGFR3 et l'activation de la voie FGF inhibe partiellement son activité par phosphorylation du résidu Tyr15, suggérant que CILK1 pourrait agir comme un régulateur négatif de l'oligodendrogenèse sous le contrôle de la signalisation FGF/FGFR3¹⁵.

Contrairement au cortex, une diminution importante de la proportion de cellules Olig2+ est observée dans la formation hippocampique, le subiculum, la fimbria ainsi que dans le cortex cingulaire, suggérant un rôle majeur de CILK1 dans ces régions. Cette diminution pourrait résulter d'une altération de la production des morphogènes issus de l'hème cortical ou de leurs effets sur les progéniteurs. Les

deux principaux morphogènes produits par cette structure sont WNT et BMP. Le premier favorise le maintien des progéniteurs neuronaux et retarde la transition gliale, tandis que le second favorise principalement la différenciation astrocytaire^{89,90}. Il est intéressant de noter que GSK3- β , connu pour être un régulateur négatif de la voie WNT, constitue une cible de CILK1^{9,91}. Cela n'exclut toutefois pas une implication des voies SHH et FGF dans la régulation de l'oligodendrogenèse au sein de ces structures.

La seconde partie de ce travail a consisté à étudier la neurogenèse et l'oligodendrogenèse dans le prosencéphale des souris CILK1 KO. Le prosencéphale comprend de nombreuses structures cérébrales (noyaux de la base, système limbique, thalamus, hypothalamus, habenula, etc.) qui, pour la plupart, sont difficiles à délimiter histologiquement sans recourir à des anticorps spécifiques ou à des souris rapportrices permettant d'identifier précisément les différentes régions. Plusieurs approches visant à étudier globalement cette structure ont donc été testées.

Nous avons commencé à mesurer, par Western blot, le niveau d'expression de différents marqueurs tels que Ctip2, Olig2 et Nkx2.1. Les signaux obtenus ont systématiquement été normalisés par rapport à celui de l' α -tubuline, utilisée comme protéine de référence. De manière inattendue, une augmentation significative de l'expression de Ctip2 a été observée. Si l'on suppose que le niveau d'expression de cette protéine est identique dans chaque cellule, indépendamment du génotype, ce résultat suggère que la proportion de cellules Ctip2+ est plus élevée au sein de la population cellulaire totale, celle-ci étant estimée à partir du signal de l' α -tubuline. À E18, des neurones Ctip2+ sont principalement observés dans le cortex, le striatum et l'hippocampe. Les « *medium spiny neurons* » (MSNs) du striatum dérivent de la partie ventrale de l'éminence ganglionnaire latérale (vLGE), tandis que les neurones du bulbe olfactif proviennent, au stade embryonnaire, de sa partie dorsale (dLGE). Étant donné que le bulbe olfactif est atrophié chez les souris CILK1 KO, il est possible que des modifications affectent la taille relative des domaines ventral (Dlx+/Isl1+) et dorsal (Dlx+/Er81+) de la LGE. Une autre hypothèse serait une altération de l'expression du facteur de transcription Gsx2, qui participe au maintien de l'identité des progéniteurs striataux précoces et est nécessaire à l'acquisition d'un destin striatal^{92,93}. De même, la diminution du niveau d'expression de Nkx2.1 suggère soit une altération du destin de certains types cellulaires dérivés de la MGE, soit une atteinte des neurones Nkx2.1+ issus du septum ou de l'aire préoptique (POA). Toutefois, l'ampleur relativement faible de cette variation d'expression, de l'ordre de 10 à 15 %, risque de rendre difficile l'identification précise de la région concernée. Concernant Olig2, aucune modification significative de son expression n'a été détectée. Cependant, les altérations histologiques observées au niveau de la formation hippocampique ne concernent qu'une faible proportion de la population totale de cellules Olig2+ du prosencéphale.

Cette faible contribution pourrait expliquer pourquoi les diminutions observées histologiquement ne sont pas détectables par Western blot.

La principale limite de l'approche par Western blot réside dans le fait que cette méthode ne permet pas, à elle seule, de déterminer si les variations observées résultent d'une modification du nombre de cellules exprimant la protéine d'intérêt ou d'une variation de son niveau d'expression au sein de chaque cellule. Des approches complémentaires fondées sur le comptage cellulaire ont donc été mises en œuvre.

La première consistait à analyser par cytométrie en flux (FACS) des suspensions cellulaires issues de cerveaux embryonnaires. Cette approche a finalement été abandonnée en raison d'une trop grande variabilité des résultats. Il convient néanmoins de souligner qu'elle apparaît particulièrement prometteuse pour l'isolement d'OPCs provenant de cerveaux embryonnaires de souris WT et CILK1 KO en vue de leur mise en culture *in vitro* (voir ci-dessous).

La deuxième approche reposait sur le comptage, par cytométrie en flux, des noyaux cellulaires, structures nettement plus stables et résistantes que les cellules entières. En utilisant les mêmes conditions de dilution d'anticorps que celles décrites dans la littérature, une diminution du nombre de neurones (marqueur NeuN) et d'OPCs a été mise en évidence dans le prosencéphale des souris CILK1 KO. Une première observation concerne la proportion de noyaux Olig2+, qui apparaît supérieure à celle des cellules PDGFR α + mesurée à partir des suspensions cellulaires (environ 15 % de noyaux contre 7 à 8 % de cellules). Bien entendu, des essais complémentaires visant à optimiser la dilution de l'anticorps primaire seront nécessaires afin d'affiner la méthode. Néanmoins, chez la souris adulte, la proportion de cellules Olig2+ est estimée à environ 23 % dans le diencephale et les noyaux gris centraux, à 23 % dans le cortex et à 21 % dans l'hippocampe, tandis qu'environ 5 % des cellules correspondent à des OPCs^{53,94}. D'autre part si la gliogenèse ne débute dans le télencéphale qu'aux alentours du stade E17,5, elle commence dès E13,5 dans l'hypothalamus tubéral, une partie du diencephale, et atteint son maximum vers E17,5. Or, les cellules d'origine diencephalique contribuent également aux populations cellulaires analysées par FANS⁹⁵. Il se pourrait donc que la valeur obtenue par FANS soit une assez bonne estimation.

La dernière partie de ce travail a consisté à comparer différentes techniques d'isolement d'OPCs, mais également à tester un protocole de culture et de différenciation de ces cellules en OLs. Parmi les trois méthodes d'isolement évaluées, celle basée sur l'utilisation du FACS a donné les meilleurs résultats. Si la pureté par la méthode MACS est bonne (89 % des cellules étaient GFP+), elle présente surtout un problème de viabilité et donc de rendement, ce qui rend cette approche difficilement exploitable pour l'étude des propriétés des OPCs. Enfin, la méthode de centrifugation différentielle,

bien que très simple à mettre en œuvre, est celle qui a fourni la plus faible pureté en cellules GFP+ (environ 30 %). Il convient toutefois de noter que l'article original décrivant cette méthode l'applique à des cerveaux de souris P1, alors que nous avons travaillé sur des cerveaux P4 afin de permettre une comparaison entre les différentes approches⁷⁹. Il serait donc intéressant de tester la centrifugation différentielle sur des cerveaux P1, comme suggéré dans cette étude. La principale surprise concernant cette méthode est que, bien que seulement 30 % des cellules soient GFP+ (et donc Sox10+), toutes les cellules observées sont Olig2+. Les implications de cette observation seront discutées ci-dessous.

Concernant la culture cellulaire, les conditions permettant la prolifération des OPCs sont désormais au point et devraient permettre d'étudier l'effet de différents facteurs ou conditions sur leur vitesse de prolifération. Quant au protocole de différenciation, celui-ci est également opérationnel, mais il sera nécessaire d'optimiser la densité cellulaire afin de pouvoir analyser quantitativement la complexité des prolongements cellulaires et éviter leur chevauchement.

Au terme de ce travail, le résultat, à première vue surprenant, obtenu lors de la culture cellulaire après centrifugation différentielle, montrant qu'un grand nombre de cellules Olig2+ sont Sox10-, nous a conduits à nous interroger sur la nature de ces cellules. Il est rapidement apparu qu'une fraction parfois non négligeable de la population astrocytaire exprime également le facteur de transcription Olig2, en plus de marqueurs caractéristiques tels que S100 β ou Sox9. Ainsi, dans le cortex et l'hippocampe de souris adultes, environ 15 % des cellules S100 β + sont également Olig2+, tandis que cette proportion atteint près de 80 % dans le thalamus⁹⁶. À la lumière de ces données, il apparaît évident qu'il faudra désormais tenir compte de cette information et compléter nos analyses par une étude de l'expression de Sox9. En effet, nous observons une diminution importante de la densité de cellules Olig2+ dans l'hippocampe des souris CILK1 KO à E18.5. Or, à ce stade de développement et dans cette structure, environ 50 % des cellules Olig2+ sont également Sox9+⁹⁷. Il est donc légitime de se demander si l'une des deux populations de cellules Olig2+ est davantage affectée que l'autre en l'absence de CILK1. De même, le comptage des noyaux Olig2+ par FANS inclut également les noyaux provenant d'astrocytes, tandis que le comptage cellulaire par FACS à l'aide de l'anticorps dirigé contre le PDGFR α ne concerne que les OPCs. Cette différence pourrait expliquer les variations de pourcentage observées selon l'approche utilisée.

En conclusion, cette étude préliminaire sur l'implication de CILK1 dans la première étape de l'oligodendrogenèse suggère que cette kinase pourrait, via les différentes cibles dont elle régule l'activité, moduler la réponse de plusieurs populations de progéniteurs aux morphogènes au cours du développement cérébral. La mise au point de la culture primaire d'OPCs nous permettra également d'étudier son rôle dans des conditions expérimentales contrôlées.

Pour la suite de ce travail, plusieurs axes d'étude nous paraissent intéressants. Au niveau cortical, il conviendra d'analyser la neurogenèse des couches supérieures à l'aide du marqueur Cux1, mais également d'augmenter le nombre d'animaux étudiés pour l'analyse de l'oligodendrogenèse, la différence observée entre les groupes WT et KO étant proche du seuil de significativité. La quantification de la production des Tri-IPC à l'aide de l'anticorps anti-Gsx2 constituera également un objectif important.

Au niveau de l'hippocampe, il sera nécessaire d'étudier la population de cellules Sox9+/Olig2+ (astrocytes) afin de déterminer l'origine de la diminution du nombre de cellules Olig2+. En effet, les premières cellules Olig2+ sont détectées dans la région hippocampique et la fimbria vers E16. Cependant, à E18, environ 50 % des cellules Olig2+ présentes expriment également Sox9, ce qui indique qu'elles correspondent à des progéniteurs astrocytaires^{85,97}.

Concernant la culture et la différenciation des OPCs, des cultures d'OPCs purifiés par FACS à l'aide de l'anticorps anti-PDGFR α -PE-Cy7 seront réalisées à partir d'embryons E18.5 WT et CILK1 KO. Différents paramètres, tels que la prolifération et la différenciation des OPCs et les effets de SHH seront alors analysés.

Bibliographie

1. Scheffer IE, Berkovic S, Capovilla G, et al. ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*. 2017;58(4):512-521. doi:10.1111/EPI.13709
2. Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. *Epilepsia*. 1989;30(4):389-399. doi:10.1111/J.1528-1157.1989.TB05316.X
3. Gilsoul M, Grisar T, Delgado-Escueta A V., de Nijs L, Lakaye B. Subtle Brain Developmental Abnormalities in the Pathogenesis of Juvenile Myoclonic Epilepsy. *Front Cell Neurosci*. 2019;13. doi:10.3389/FNCEL.2019.00433
4. Lakaye B, Nguyen L. Genetic Animal Models of Idiopathic Generalized Epilepsies: What Can We Learn from Them? *Biomedicines*. 2025;13(6). doi:10.3390/BIMEDICINES13061301
5. Delgado-Escueta A V., Koeleman BPC, Bailey JN, Medina MT, Durón RM. The quest for Juvenile Myoclonic Epilepsy genes. *Epilepsy and Behavior*. 2013;28(1). doi:10.1016/j.yebeh.2012.06.033
6. Bailey JN, de Nijs L, Bai D, et al. Variant Intestinal-Cell Kinase in Juvenile Myoclonic Epilepsy. *N Engl J Med*. 2018;378(11):1018-1028. doi:10.1056/nejmoa1700175
7. Lahiry P, Wang J, Robinson JF, et al. A multiplex human syndrome implicates a key role for intestinal cell kinase in development of central nervous, skeletal, and endocrine systems. *Am J Hum Genet*. 2008;84(2):134-147. doi:10.1016/j.ajhg.2008.12.017
8. Taylor SP, Bosakova MK, Varecha M, et al. An inactivating mutation in intestinal cell kinase, ICK, impairs hedgehog signalling and causes short rib-polydactyly syndrome. *Hum Mol Genet*. 2016;25(18):3998-4011. doi:10.1093/hmg/ddw240
9. Fu Z, Gailey CD, Wang EJ, Brautigan DL. Ciliogenesis associated kinase 1: targets and functions in various organ systems. *FEBS Lett*. 2019;593(21):2990-3002. doi:10.1002/1873-3468.13600
10. Miyata Y, Nishida E. Distantly related cousins of MAP kinase: Biochemical properties and possible physiological functions. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;266(2):291-295. doi:10.1006/bbrc.1999.1705
11. Oldfield CJ, Dunker AK. Intrinsically disordered proteins and intrinsically disordered protein regions. *Annu Rev Biochem*. 2014;83:553-584. doi:10.1146/ANNUREV-BIOCHEM-072711-164947
12. Oh YS, Wang EJ, Gailey CD, Brautigan DL, Allen BL, Fu Z. Ciliopathy-Associated Protein Kinase ICK Requires Its Non-Catalytic Carboxyl-Terminal Domain for Regulation of Ciliogenesis. *Cells*. 2019;8(7). doi:10.3390/CELLS8070677
13. Fu Z, Schroeder MJ, Shabanowitz J, et al. Activation of a nuclear Cdc2-related kinase within a mitogen-activated protein kinase-like TDY motif by autophosphorylation and cyclin-dependent protein kinase-activating kinase. *Mol Cell Biol*. 2005;25(14):6047-6064. doi:10.1128/MCB.25.14.6047-6064.2005
14. Fu Z, Larson KA, Chitta RK, et al. Identification of yin-yang regulators and a phosphorylation consensus for male germ cell-associated kinase (MAK)-related kinase. *Mol Cell Biol*. 2006;26(22):8639-8654. doi:10.1128/MCB.00816-06
15. Bosakova MK, Nita A, Gregor T, et al. Fibroblast growth factor receptor influences primary cilium length through an interaction with intestinal cell kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019;116(10):4316-4325. doi:10.1073/PNAS.1800338116
16. Lee JG, Ye Y. Bag6/Bat3/Scythe: a novel chaperone activity with diverse regulatory functions in protein biogenesis and degradation. *Bioessays*. 2013;35(4):377-385. doi:10.1002/BIES.201200159

17. Sebti S, Prébois C, Pérez-Gracia E, et al. BAT3 modulates p300-dependent acetylation of p53 and autophagy-related protein 7 (ATG7) during autophagy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(11):4115-4120. doi:10.1073/PNAS.1313618111
18. Chaya T, Omori Y, Kuwahara R, Furukawa T. ICK is essential for cell type-specific ciliogenesis and the regulation of ciliary transport. *EMBO J*. 2014;33(11):1227-1242. doi:10.1002/EMBJ.201488175
19. Engelke MF, Waas B, Kearns SE, et al. Acute Inhibition of Heterotrimeric Kinesin-2 Function Reveals Mechanisms of Intraflagellar Transport in Mammalian Cilia. *Current Biology*. 2019;29(7):1137-1148.e4. doi:10.1016/j.cub.2019.02.043
20. Nojima H, Tokunaga C, Eguchi S, et al. The mammalian target of rapamycin (mTOR) partner, raptor, binds the mTOR substrates p70 S6 kinase and 4E-BP1 through their TOR signaling (TOS) motif. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(18):15461-15464. doi:10.1074/jbc.C200665200
21. Hall MN. mTOR-What Does It Do? *Transplant Proc*. 2008;40(10 SUPPL.). doi:10.1016/j.transproceed.2008.10.009
22. Wu D, Chapman JR, Wang L, et al. Intestinal cell kinase (ICK) promotes activation of mTOR complex 1 (mTORC1) through phosphorylation of raptor Thr-908. *Journal of Biological Chemistry*. 2012;287(15):12510-12519. doi:10.1074/jbc.M111.302117
23. Fu Z, Kim J, Vidrich A, Sturgill TW, Cohn SM. Intestinal cell kinase, a MAP kinase-related kinase, regulates proliferation and G1 cell cycle progression of intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2009;297(4). doi:10.1152/AJPGI.00066.2009
24. Tong Y, Park S, Wu D, et al. Modulation of GSK3 β autoinhibition by Thr-7 and Thr-8. *FEBS Lett*. 2018;592(4):537-546. doi:10.1002/1873-3468.12990
25. He Y, Zhang X, Pan W, et al. Ciliogenesis-associated Kinase 1 Promotes Breast Cancer Cell Proliferation and Chemoresistance via Phosphorylating ERK1. *Int J Biol Sci*. 2024;20(7):2403-2421. doi:10.7150/IJBS.87442
26. Rah G, Cha H, Kim J, et al. KLC3 Regulates Ciliary Trafficking and Cyst Progression in CILK1 Deficiency-Related Polycystic Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol*. 2022;33(9):1726-1741. doi:10.1681/ASN.2021111455
27. Tsutsumi R, Chaya T, Tsujii T, Furukawa T. The carboxyl-terminal region of SDCCAG8 comprises a functional module essential for cilia formation as well as organ development and homeostasis. *Journal of Biological Chemistry*. 2022;298(3). doi:10.1016/j.jbc.2022.101686
28. Limerick A, McCabe EA, Turner JS, et al. An Epilepsy-Associated CILK1 Variant Compromises KATNIP Regulation and Impairs Primary Cilia and Hedgehog Signaling. *Cells*. 2024;13(15). doi:10.3390/CELLS13151258
29. Mill P, Christensen ST, Pedersen LB. Primary cilia as dynamic and diverse signalling hubs in development and disease. *Nat Rev Genet*. 2023;24(7):421-441. doi:10.1038/S41576-023-00587-9
30. Moon H, Song J, Shin JO, et al. Intestinal cell kinase, a protein associated with endocrine-cerebro-osteodysplasia syndrome, is a key regulator of cilia length and Hedgehog signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(23):8541-8546. doi:10.1073/pnas.1323161111
31. Wang EJ, Gailey CD, Brautigan DL, Fu Z. Functional Alterations in Ciliogenesis-Associated Kinase 1 (CILK1) that Result from Mutations Linked to Juvenile Myoclonic Epilepsy. *Cells*. 2020;9(3). doi:10.3390/cells9030694
32. Tong Y, Park SH, Wu D, et al. An essential role of intestinal cell kinase in lung development is linked to the perinatal lethality of human ECO syndrome. *FEBS Lett*. 2017;591(9):1247-1257. doi:10.1002/1873-3468.12644
33. Chaya T, Furukawa T. Post-translational modification enzymes as key regulators of ciliary protein trafficking. *J Biochem*. 2021;169(6):633-642. doi:10.1093/JB/MVAB024

34. Togawa K, Yan YX, Inomoto T, Slaugenhaupt S, Rustgi AK. Intestinal Cell Kinase (ICK) Localizes to the Crypt Region and Requires a Dual Phosphorylation Site Found in Map Kinases. *J Cell Physiol.* 2000;183:129-139. doi:10.1002/(SICI)1097-4652(200004)183:1
35. Tsutsumi R, Chaya T, Furukawa T. Enriched expression of the ciliopathy gene Ick in cell proliferating regions of adult mice. *Gene Expression Patterns.* 2018;29:18-23. doi:10.1016/j.gep.2018.04.005
36. Lu IL, Chen C, Tung CY, et al. Identification of genes associated with cortical malformation using a transposon-mediated somatic mutagenesis screen in mice. *Nat Commun.* 2018;9(1). doi:10.1038/S41467-018-04880-8
37. Marques S, Zeisel A, Codeluppi S, et al. Oligodendrocyte heterogeneity in the mouse juvenile and adult central nervous system. *Science.* 2016;352(6291):1326-1329. doi:10.1126/SCIENCE.AAF6463
38. Chamling X, Kallman A, Fang W, et al. Single-cell transcriptomic reveals molecular diversity and developmental heterogeneity of human stem cell-derived oligodendrocyte lineage cells. *Nat Commun.* 2021;12(1). doi:10.1038/S41467-021-20892-3
39. Perlman K, Couturier CP, Yaqubi M, et al. Developmental trajectory of oligodendrocyte progenitor cells in the human brain revealed by single cell RNA sequencing. *Glia.* 2020;68(6):1291-1303. doi:10.1002/GLIA.23777
40. Raju KL, Augustine D, Rao RS, et al. Biomarkers in Tumorigenesis Using Cancer Cell Lines: A Systematic Review. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2017;18(9):2329-2337. doi:10.22034/APJCP.2017.18.9.2329
41. Silva CG, Peyre E, Nguyen L. Cell migration promotes dynamic cellular interactions to control cerebral cortex morphogenesis. *Nat Rev Neurosci.* 2019;20(6):318-329. doi:10.1038/s41583-019-0148-y
42. Edgar JM, Griffiths IR. White Matter Structure: A Microscopist's View. *Diffusion MRI: From Quantitative Measurement to In vivo Neuroanatomy: Second Edition.* Published online January 1, 2014:127-153. doi:10.1016/B978-0-12-396460-1.00007-X
43. Godin JD, Nguyen L. Novel functions of core cell cycle regulators in neuronal migration. *Adv Exp Med Biol.* 2014;800:59-74. doi:10.1007/978-94-007-7687-6_4
44. Hasel P, Liddel SA. Astrocytes. *Current Biology.* 2021;31(7):R326-R327. doi:10.1016/j.cub.2021.01.056
45. Shigemoto-Mogami Y, Hoshikawa K, Goldman JE, Sekino Y, Sato K. Microglia enhance neurogenesis and oligodendrogenesis in the early postnatal subventricular zone. *J Neurosci.* 2014;34(6):2231-2243. doi:10.1523/JNEUROSCI.1619-13.2014
46. Stoufflet J, Tielens S, Nguyen L. Shaping the cerebral cortex by cellular crosstalk. *Cell.* 2023;186(13):2733-2747. doi:10.1016/j.cell.2023.05.040
47. Kwan KY, Šestan N, Anton ES. Transcriptional co-regulation of neuronal migration and laminar identity in the neocortex. *Development.* 2012;139(9):1535-1546. doi:10.1242/dev.069963
48. Miyoshi G, Fishell G. GABAergic interneuron lineages selectively sort into specific cortical layers during early postnatal development. *Cereb Cortex.* 2011;21(4):845-852. doi:10.1093/CERCOR/BHQ155
49. Baumann N, Pham-Dinh D. Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol Rev.* 2001;81(2):871-927. doi:10.1152/PHYSREV.2001.81.2.871
50. Franklin RJM, Ffrench-Constant C. Remyelination in the CNS: from biology to therapy. *Nat Rev Neurosci.* 2008;9(11):839-855. doi:10.1038/NRN2480
51. McKenzie IA, Ohayon D, Li H, et al. Motor skill learning requires active central myelination. *Science.* 2014;346(6207):318-322. doi:10.1126/SCIENCE.1254960
52. Saher G, Brügger B, Lappe-Siefke C, et al. High cholesterol level is essential for myelin membrane growth. *Nat Neurosci.* 2005;8(4):468-475. doi:10.1038/NN1426

53. Dawson MRL, Polito A, Levine JM, Reynolds R. NG2-expressing glial progenitor cells: An abundant and widespread population of cycling cells in the adult rat CNS. *Molecular and Cellular Neuroscience*. 2003;24(2):476-488. doi:10.1016/S1044-7431(03)00210-0
54. Auguste YSS, Ferro A, Kahng JA, et al. Oligodendrocyte precursor cells engulf synapses during circuit remodeling in mice. *Nat Neurosci*. 2022;25(10):1273-1278. doi:10.1038/s41593-022-01170-x
55. Orduz D, Benamer N, Ortolani D, et al. Developmental cell death regulates lineage-related interneuron-oligodendroglia functional clusters and oligodendrocyte homeostasis. *Nat Commun*. 2019;10(1). doi:10.1038/s41467-019-11904-4
56. Fang LP, Zhao N, Caudal LC, et al. Impaired bidirectional communication between interneurons and oligodendrocyte precursor cells affects social cognitive behavior. *Nat Commun*. 2022;13(1). doi:10.1038/s41467-022-29020-1
57. Traiffort E, Zakaria M, Laouarem Y, Ferent J. Hedgehog: A Key Signaling in the Development of the Oligodendrocyte Lineage. *J Dev Biol*. 2016;4(3). doi:10.3390/jdb4030028
58. Kessaris N, Fogarty M, Iannarelli P, Grist M, Wegner M, Richardson WD. Competing waves of oligodendrocytes in the forebrain and postnatal elimination of an embryonic lineage. *Nat Neurosci*. 2006;9(2):173-179. doi:10.1038/NN1620
59. Vincze A, Mázló M, Seress L, Komoly S, Ábrahám H. A correlative light and electron microscopic study of postnatal myelination in the murine corpus callosum. *Int J Dev Neurosci*. 2008;26(6):575-584. doi:10.1016/J.IJDEVNEU.2008.05.003
60. Rowitch DH. Glial specification in the vertebrate neural tube. *Nat Rev Neurosci*. 2004;5(5):409-419. doi:10.1038/nrn1389
61. Pozniak CD, Langseth AJ, Dijkgraaf GJP, Choe Y, Werb Z, Pleasure SJ. Sox10 directs neural stem cells toward the oligodendrocyte lineage by decreasing Suppressor of Fused expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(50):21795-21800. doi:10.1073/pnas.1016485107
62. Bergles DE, Richardson WD. Oligodendrocyte Development and Plasticity. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015;8(2). doi:10.1101/cshperspect.a020453
63. Boggs JM. Myelin basic protein: a multifunctional protein. *Cell Mol Life Sci*. 2006;63(17):1945-1961. doi:10.1007/s00018-006-6094-7
64. Nery S, Wichterle H, Fishell G. Sonic hedgehog contributes to oligodendrocyte specification in the mammalian forebrain. *Development*. 2001;128(4):527-540. doi:10.1242/DEV.128.4.527
65. Lu QR, Yuk DI, Alberta JA, et al. Sonic hedgehog-regulated oligodendrocyte lineage genes encoding bHLH proteins in the mammalian central nervous system. *Neuron*. 2000;25(2):317-329. doi:10.1016/S0896-6273(00)80897-1
66. Tong CK, Fuentealba LC, Shah JK, et al. A dorsal SHH-dependent domain in the V-SVZ produces large numbers of oligodendroglial lineage cells in the postnatal brain. *Stem Cell Reports*. 2015;5(4):461-470. doi:10.1016/j.stemcr.2015.08.013
67. Winkler CC, Yabut OR, Fregoso SP, et al. The Dorsal Wave of Neocortical Oligodendrogenesis Begins Embryonically and Requires Multiple Sources of Sonic Hedgehog. *J Neurosci*. 2018;38(23):5237-5250. doi:10.1523/JNEUROSCI.3392-17.2018
68. Zhang Y, Liu G, Guo T, et al. Cortical Neural Stem Cell Lineage Progression Is Regulated by Extrinsic Signaling Molecule Sonic Hedgehog. *Cell Rep*. 2020;30(13):4490-4504.e4. doi:10.1016/j.celrep.2020.03.027
69. Wang LC, Almazan G. Role of Sonic Hedgehog Signaling in Oligodendrocyte Differentiation. *Neurochem Res*. 2016;41(12):3289-3299. doi:10.1007/S11064-016-2061-3
70. Xu X, Yu Q, Fang M, et al. Stage-specific regulation of oligodendrocyte development by Hedgehog signaling in the spinal cord. *Glia*. 2020;68(2):422-434. doi:10.1002/GLIA.23729

71. Briscoe J, Théron PP. The mechanisms of Hedgehog signalling and its roles in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013;14(7):418-431. doi:10.1038/NRM3598
72. Miller DJ, Duka T, Stimpson CD, et al. Prolonged myelination in human neocortical evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(41):16480-16485. doi:10.1073/PNAS.1117943109
73. Nishio M, Liu X, Mackey AP, Arcaro MJ. Myelination across cortical hierarchies and depths in humans and macaques. *bioRxiv.* Published online February 6, 2025. doi:10.1101/2025.02.06.636851
74. Lallemand Y, Luria V, Haffner-Krausz R, Lonai P. Maternally expressed PGK-Cre transgene as a tool for early and uniform activation of the Cre site-specific recombinase. *Transgenic Res.* 1998;7(2):105-112. doi:10.1023/A:1008868325009
75. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227(5259):680-685. doi:10.1038/227680A0
76. Schambra U. Prenatal Mouse Brain Atlas. *Prenatal Mouse Brain Atlas.* Published online 2008. doi:10.1007/978-0-387-47093-1
77. Nóbrega-Pereira S, Kessaris N, Du T, Kimura S, Anderson SA, Marín O. Postmitotic Nkx2-1 Controls the Migration of Telencephalic Interneurons by Direct Repression of Guidance Receptors. *Neuron.* 2008;59(5):733-745. doi:10.1016/j.neuron.2008.07.024
78. Nott A, Schlachetzki JCM, Fixsen BR, Glass CK. Nuclei isolation of multiple brain cell types for omics interrogation. *Nat Protoc.* 2021;16(3):1629-1646. doi:10.1038/S41596-020-00472-3
79. Kim H, Kim BJ, Koh S, et al. A primary culture method for the easy, efficient, and effective acquisition of oligodendrocyte lineage cells from neonatal rodent brains. *Heliyon.* 2024;10(8). doi:10.1016/j.heliyon.2024.e29359
80. Kim H, Kim BJ, Koh S, et al. Protocol for the acquisition and maturation of oligodendrocytes from neonatal rodent brains. *STAR Protoc.* 2024;5(4). doi:10.1016/j.xpro.2024.103327
81. Barateiro A, Fernandes A. Temporal oligodendrocyte lineage progression: In vitro models of proliferation, differentiation and myelination. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2014;1843(9):1917-1929. doi:10.1016/j.bbamcr.2014.04.018
82. Dyer CA, Benjamins JA. Organization of oligodendroglial membrane sheets. I: Association of myelin basic protein and 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphohydrolase with cytoskeleton. *J Neurosci Res.* 1989;24(2):201-211. doi:10.1002/JNR.490240211
83. Tatsumi K, Isonishi A, Yamasaki M, et al. Olig2-Lineage Astrocytes: A Distinct Subtype of Astrocytes That Differs from GFAP Astrocytes. *Front Neuroanat.* 2018;12(8). doi:10.3389/FNANA.2018.00008
84. Wang L, Hou S, Han YG. Hedgehog signaling promotes basal progenitor expansion and the growth and folding of the neocortex. *Nat Neurosci.* 2016;19(7):888-896. doi:10.1038/NN.4307
85. Ono K, Takebayashi H, Ikenaka K. Olig2 transcription factor in the developing and injured forebrain; cell lineage and glial development. *Mol Cells.* 2009;27(4):397-401. doi:10.1007/s10059-009-0067-2
86. Li X, Newbern JM, Wu Y, et al. MEK Is a Key Regulator of Gliogenesis in the Developing Brain. *Neuron.* 2012;75(6):1035-1050. doi:10.1016/j.neuron.2012.08.031
87. Dinh Duong TA, Hoshiba Y, Saito K, et al. FGF Signaling Directs the Cell Fate Switch from Neurons to Astrocytes in the Developing Mouse Cerebral Cortex. *J Neurosci.* 2019;39(31):6081-6094. doi:10.1523/JNEUROSCI.2195-18.2019
88. Balolia A, Arena KA, Shahood A, et al. Ascl1 promotes OPC specification across species and central nervous system regions and its gliogenic function is regulated by phosphorylation. *Dev Biol.* 2026;536:184-201. doi:10.1016/j.ydbio.2026.05.008

89. Kunke D, Bryja V, Mygland L, Arenas E, Krauss S. Inhibition of canonical Wnt signaling promotes gliogenesis in PO-NSCs. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;386(4):628-633. doi:10.1016/j.bbrc.2009.06.084
90. Gomes WA, Mehler MF, Kessler JA. Transgenic overexpression of BMP4 increases astroglial and decreases oligodendroglial lineage commitment. *Dev Biol.* 2003;255(1):164-177. doi:10.1016/S0012-1606(02)00037-4
91. Taelman VF, Dobrowolski R, Plouhinec JL, et al. Wnt signaling requires sequestration of Glycogen Synthase Kinase 3 inside multivesicular endosomes. *Cell.* 2010;143(7):1136-1148. doi:10.1016/j.cell.2010.11.034
92. Stenman J, Toresson H, Campbell K. Identification of two distinct progenitor populations in the lateral ganglionic eminence: implications for striatal and olfactory bulb neurogenesis. *J Neurosci.* 2003;23(1):167-174. doi:10.1523/JNEUROSCI.23-01-00167.2003
93. Wacław RR, Wang B, Pei Z, Ehrman LA, Campbell K. Distinct Temporal Requirements for the Homeobox Gene *Gsx2* in Specifying Striatal and Olfactory Bulb Neuronal Fates. *Neuron.* 2009;63(4):451-465. doi:10.1016/j.neuron.2009.07.015
94. Valério-Gomes B, Guimarães DM, Szczupak D, Lent R. The Absolute Number of Oligodendrocytes in the Adult Mouse Brain. *Front Neuroanat.* 2018;12. doi:10.3389/FNANA.2018.00090
95. Marsters CM, Rosin JM, Thornton HF, et al. Oligodendrocyte development in the embryonic tuberal hypothalamus and the influence of *Ascl1*. *Neural Dev.* 2016;11(1). doi:10.1186/S13064-016-0075-9
96. Wang H, Xu L, Lai C, et al. Region-specific distribution of *Olig2*-expressing astrocytes in adult mouse brain and spinal cord. *Mol Brain.* 2021;14(1). doi:10.1186/S13041-021-00747-0
97. Omura S, Ogawa R, Kawachi T, et al. *Olig2*⁺/*NG2*⁺/*BLBP*⁺ astrocyte progenitors: a novel component of the neurovascular unit in the developing mouse hippocampus. *Front Cell Neurosci.* 2024;18. doi:10.3389/FNCEL.2024.1464402/PDF