

Thesis, COLLÉGIALITÉ

Auteur : Vrancken, Thomas

Promoteur(s) : Franzen, Rachelle

Faculté : Faculté de Médecine

Diplôme : Master en sciences biomédicales, à finalité approfondie

Année académique : 2023-2024

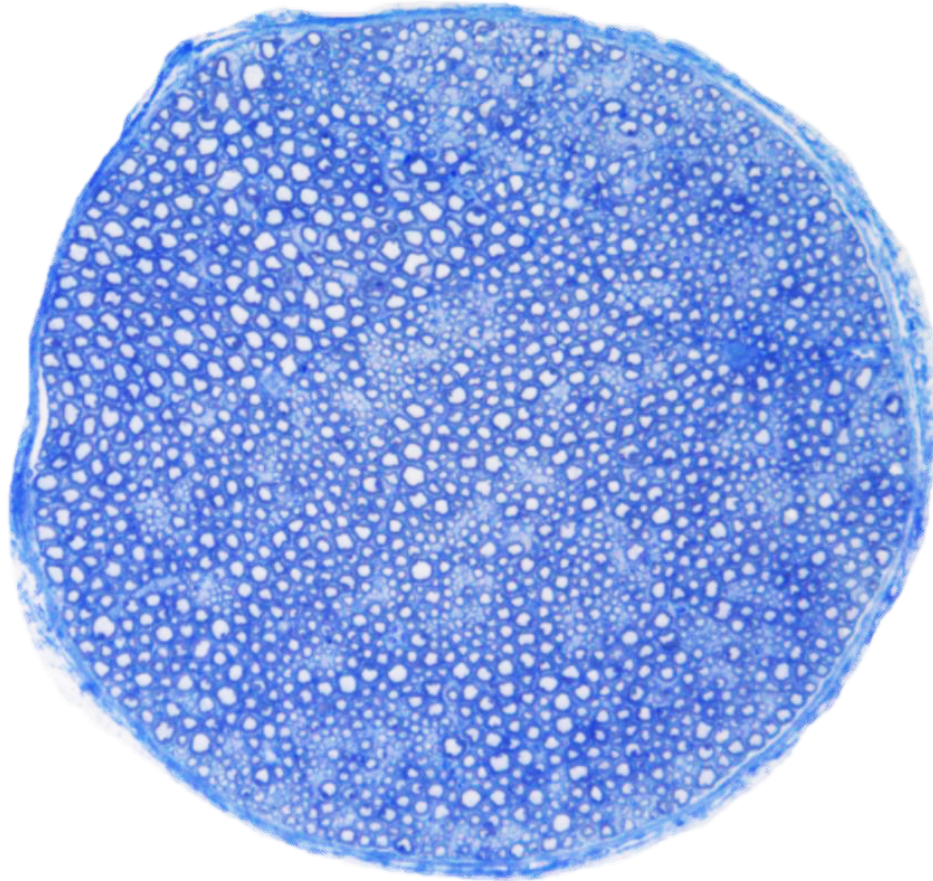
URI/URL : <http://hdl.handle.net/2268.2/20556>

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.

Rôle de Cdk7 dans le phénotype myélinisant et post-lésionnel des cellules de Schwann



VRANCKEN Thomas

Laboratoire des Maladies et Thérapies du Système Nerveux

Promotrice : Dr. FRANZEN Rachelle
Superviseuse : SCHUMACHER Nathalie

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Docteur Rachelle Franzen qui m'a accueilli dans son laboratoire durant ce mémoire. Je la remercie pour sa disponibilité, sa bonne humeur, son soutien et sa gentillesse tout au long de cette période. J'aimerais ensuite remercier Nathalie Schumacher, ma superviseuse, sans qui ce mémoire n'aurait jamais pu avoir lieu. Merci pour toutes les connaissances que tu as pu me transmettre et toutes les techniques que tu m'as permis d'apprendre, le tout toujours dans la bonne humeur. Merci également pour ta patience et pour l'investissement dont tu as fait preuve afin que ce mémoire se déroule au mieux. Sans oublier les précieux conseils et toute l'expertise dans ton domaine que tu as pu me fournir pendant ces 6 mois. Merci d'avoir toujours été présente pour répondre à mes questions ou me remonter le moral dans les moments plus compliqués, ainsi que m'avoir fait confiance tout au long du mémoire. Je tiens également à remercier Alexandra Pieltain, pour sa gentillesse, sa bonne humeur et sa générosité ainsi que pour tous les conseils qu'elle a pu me donner au quotidien. Sans oublier bien sûr de te remercier pour le temps que tu as passé afin que je puisse obtenir les coupes de nerfs sciatiques colorées au bleu de Toluidine.

Je tiens ensuite à remercier mes co-mémorants du GIGA-neuro : Tatiana Rouschop, Chloé Buttenaers et Enes Spahic, pour tous ces bons moments passés ensemble, dans la joie et la bonne humeur ainsi que pour le soutien dont vous avez su faire part.

Je n'oublie pas tous les autres membres du GIGA-Neuro que j'ai pu côtoyer, de près ou de loin, durant l'entièreté de mon mémoire et qui ont contribué à ce que celui-ci se passe dans les meilleures conditions.

Merci également à mes amies et membres du comité SBIM : Marine Hemmer, Eva Miceli, Elisa Dos Santos, Camille Flas, Lola Langhendries pour tous les bons moments partagés durant ces études. Je tiens également à remercier mes amies les plus proches Laurine Miermans et Camille Simon, qui ont toujours été là depuis de nombreuses années et m'ont toujours soutenu dans mes études.

Pour finir, je remercie les personnes qui ont été à mes côtés au quotidien durant ces 5 années d'études, mes parents Marc et Adèle Vrancken ainsi que mon frère Nicolas et ma sœur Sarah, sans qui rien de tout cela n'aurait été possible.

Merci à tous de m'avoir permis d'accomplir ces études.

Liste des abréviations :

ADN : Acide désoxyribonucléique
ADNc : ADN complémentaire
AP-1 : Activating protein 1
APS : Persulfate d'ammonium
ARN : Acide ribonucléique
BCA : BiCinchoninic acid Assay
BDNF : Brain derived neurotrophic factor
Brn2 : brain 2 class III protein domain
BSA : Bovine Serum Albumin
CAK : Cyclin dependent Activating Kinase
Cdk7 : Kinase dépendante des cyclines 7
Cdks : Kinases dépendantes des cyclines
cKO : KO conditionnel
Cre : CRE recombinase
DAPI : 4',6-diamidino-2-phénylindole
DHH : Desert Hedgehog
DMEM : Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO : Dimethylsulfoxyde
dNTP : Désoxyribonucléoside triphosphate
EDTA : Ethylenediamine tetraacetic acid
Egr2 : Early growth response protein 2
EphB2 : Ephrin type-B receptor 2
ER α : Récepteur alpha aux oestrogènes
ErbB3 : Récepteur tyrosine kinase ErbB3
ERK1/2 : Extracellular signal-regulated kinases 1/2
FBS : Fetal Bovine Serum
GFAP : Glia Cell Line Derived Neurotrophic factor
H3K27 : Histone 3 Lysine 27
HMG CoA : Hydroxyméthylglutaryl-CoA
HPRT : Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase

HRP: Horseradish Peroxydase

HS : Horse Serum

iKO : KO inductible

IL6 : Interleukine 6

JNK : Jun N-terminal kinase

LIF : Leukemia inhibitory factor

MAG : Myelin Associated Glycoprotein

MAPK : Mitogen Activated Protein Kinases

MAT1 : Ménage à trois 1

MBP : Myelin Basic Protein

MEM : Milieu minimum essentiel de Eagle

MOI : Multiplicity of infection

MPZ : Myelin Protein Zero

mTOR : Mamalian target of rapamycin

NCAM : Neural cell adhesion molecule

NDS : Normal Donkey Serum

NFATc4 : Nuclear factor of activated T cells 4

Nrg1-III : Neuréguline 1 de type 3

NT-3 : Neurotrophine 3

Oct6 : Octamer binding factor 6

PCR : Polymerase Chain Reaction

PLP : Protéine protéolipidique

PMP22 : Protéine périphérique de myéline 22

POU : Pit-1 Oct-1 Unc-86

PPARs : Peroxisome proliferator activated receptor

P-TEFb : Positive Transcription Elongation Factor

PTEN : Phosphatases and TENSin homolog

PVDF : Polyfluorure de vinylidène

qPCR : PCR quantitative

RAR α : Récepteur alpha à l'acide rétinoïque

RIPA : Radioimmunoprecipitation Assay

RT : Reverse transcription

SDS : Dodécylsulfate de sodium

shARN : Short hairpin RNA

Shh: Sonic Hedgehog

SN : Système Nerveux

SNC : Système Nerveux Central

SNP : Système Nerveux Périphérique

Sox 2 : Sex determining region Y box 2

Sox10 : Sex determining region box 10

SREBP : Sterol Regulatory Element Binding protein

STAT3 : Signal Transducer and Activator of Transcription 3

T3: L-Thyronine

T4: L-Thyroxine

TACE : Tumor necrosis factor-Alpha Converting Enzyme

TFIIH : Facteur général de transcription de l'ARN polymérase 2

TTBS : Tween Tris Buffer Saline

WT : Wild-Type

XPB : Xeroderma Pigmentosum D

YFP : Yellow Fluorescent Protein

Résumé :

Les cellules de Schwann sont responsables de la production de la gaine de myéline dans le système nerveux périphérique. Cette gaine de myéline est notamment responsable de l'isolation électrique de l'axone ce qui permet une transmission rapide de l'influx nerveux tout au long de l'axone jusqu'à sa cible. Dans certains cas, l'axone et la gaine de myéline qui l'entoure peuvent être lésés, lors d'accidents, ou dégradés par différentes maladies neurodégénératives. Cette dégradation de la gaine de myéline se caractérise par la dédifférenciation des cellules de Schwann responsables de sa production, qui adoptent un phénotype semblable à celui des cellules de Schwann immatures. Ces dernières pourront se différencier à nouveau afin d'assurer la remyélinisation des axones. Cette plasticité des cellules de Schwann est essentielle à la régénération de l'axone ainsi qu'à sa remyélinisation, bien que celle-ci soit très lente.

C'est dans ce contexte que nous nous sommes intéressés à l'implication d'une protéine, Cdk7, dans le phénotype myélinisant et post-lésionnel des cellules de Schwann. Cette kinase dépendante des cyclines est impliquée dans l'initiation et l'élongation de la transcription, ainsi que dans la régulation du cycle cellulaire. Elle pourrait donc être indispensable dans les différents phénomènes qui permettent la mise en place de la gaine de myéline et la remyélinisation qui survient après lésion dans les cellules de Schwann.

Le travail décrit ci-après s'articule autour de deux objectifs : l'étude du rôle de Cdk7 dans la myélinisation du système nerveux périphérique et du rôle qu'il pourrait jouer dans les cellules de Schwann après lésion. Pour ce faire nous avons développé des modèles *in vitro* et *in vivo* permettant d'étudier les phénomènes post lésionnels.

Les résultats que nous avons obtenus ont pu mettre en évidence un impact de la perte de Cdk7 sur la myélinisation des cellules de Schwann par diminution de l'expression de protéines spécifiques de celle-ci. Par contre, même si à ce stade aucun effet de Cdk7 n'a pu être mis en évidence concernant son rôle dans la dédifférenciation des cellules de Schwann après lésion, nous observons *in vitro* une diminution de la prolifération des cellules dédifférenciées.

Summary:

Schwann cells are responsible of the myelin sheath production in the peripheral nervous system. This myelin sheath is responsible for the electrical insulation of the axon, enabling rapid transmission of nerve impulses along the axon to its target. In some cases, the axon and its surrounding myelin sheath can be damaged by accidents or degraded by various neurodegenerative diseases. This degradation of the myelin sheath is characterized by the dedifferentiation of the Schwann cells responsible for its production which adopt a phenotype similar to the immature Schwann cells one. The latter can then differentiate again to ensure axon remyelination. This Schwann cell plasticity is essential for axon regeneration and remyelination although this process is very slow.

It is in this context that we investigated the involvement of a protein, Cdk7, in the myelinating and post-lesion phenotype of Schwann cells. This cyclin-dependent kinase is involved in transcription initiation and elongation, as well as in cell cycle regulation. It may therefore be indispensable in the various phenomena involved in myelin sheath formation and remyelination in Schwann cells after injury.

The work described below has two objectives: to study the role of Cdk7 in myelination of the peripheral nervous system, and the role it could play in Schwann cells after injury. To this end, we have developed *in vitro* and *in vivo* models to study post-injury phenomena.

Our results show that loss of Cdk7 has an impact on myelination of Schwann cells through reduced expression of Cdk7-specific proteins. On the other hand, although at this stage no effect of Cdk7 could be demonstrated concerning its role in the dedifferentiation of Schwann cells after injury, we did observe a reduction in the proliferation of dedifferentiated cells *in vitro*.

Table des matières :

1. Introduction générale :	1
1.1. Kinase dépendante des cyclines 7 – Cdk7 :	2
1.1.1. Kinase dépendante des cyclines : structure générale et fonctions :	2
1.1.2. Kinases dépendantes des cyclines en tant que régulatrices de la transcription :	3
1.1.3. Kinases dépendantes des cyclines au sein du cycle cellulaire :	4
1.2. Structure et rôle de Cdk7 :	5
1.2.1. Cdk7 dans la myélinisation :	6
1.3. Développement de la gaine de myéline dans le système nerveux périphérique :	7
1.3.1. Origine des précurseurs des cellules de Schwann :	8
1.3.2. De précurseur de cellule de Schwann à cellule de Schwann immature :	8
1.3.3. Différenciation en cellules de Schwann pro-myélinisantes :	9
1.3.4. Cellules de Schwann myélinisantes :	10
1.3.6. Cellules de Schwann réparatrices :	12
1.4. Lésion nerveuse :	14
1.4.1. Dégénérescence Wallérienne :	14
1.4.2. Remyélinisation et repousse axonale :	15
2. Objectifs du travail et stratégie expérimentale :	16
3. Matériel et Méthodes :	18
3.1. Modèles expérimentaux :	18
3.2. Prélèvements :	18
3.3. Extraction d'ADN et géotypage :	19
3.5. Lignée cellulaire MSC80 :	21
3.6. Transduction lentivirale :	21
3.7. Inhibiteur de Cdk7 :	22
3.8. Test de prolifération – MSC80 :	22
3.9. Extraction d'ARN et RT-qPCR :	23
3.10. Cultures primaires de cellules de Schwann :	24
3.11. Tests de démyélinisation :	25
3.12. Immunocytochimies :	25
3.13. Explants de nerfs :	26
3.13.1. DHH-Cre :	26
3.13.2. PLP-CreERT :	27
3.14. Coloration au bleu de Toluidine :	27
3.15. Statistiques :	27

4. Résultats :	28
4.1. Validation du modèle DHH-Cre :	28
4.2. Implication de Cdk7 dans l'expression de protéines de la myéline :	29
4.2.1. P6 :	29
4.2.2. P28 :	30
4.2.3. P60 :	30
4.3. Étude de l'effet de l'inactivation de Cdk7 dans la démyélinisation :	31
4.3.1. Le nombre d'axones correctement myélinisés diffère-t-il, après lésion chez des individus cKO par rapport aux individus WT ?	31
4.3.2. Fonction de Cdk7 sur la vitesse de démyélinisation <i>in vitro</i> :	32
4.4. Rôle de Cdk7 dans des cellules de Schwann en conditions non différenciées :	33
4.4.1. Déplétion de Cdk7 dans une lignée de cellules de Schwann MSC80 par utilisation de shRNA :	33
4.4.1.1. Implication de Cdk7, dans les MSC80, sur l'expression de gènes impliqués en conditions post lésionnelles :	34
4.4.1.2. Rôle de Cdk7 dans la prolifération des MSC80 :	35
4.4.2. Inhibition de Cdk7 dans les MSC80 par l'inhibiteur spécifique YKL-5-124 :	36
4.4.2.1. Effet de l'inhibition de Cdk7 sur la prolifération cellulaire des MSC80 :	37
5. Discussion et perspectives :	38
6. Bibliographie :	46

Introduction

1. Introduction générale :

Les nerfs périphériques sont composés de fibres nerveuses, de tissu conjonctif, ainsi que de cellules responsables du support trophique et de la myélinisation des axones, les cellules de Schwann. Ces dernières sont spécifiques au système nerveux périphérique (SNP), à l'opposé des oligodendrocytes qui sont responsables de la myélinisation dans le système nerveux central (SNC)¹. Cette gaine de myéline est une substance composée majoritairement de lipides (70 à 85%), mais aussi de protéines (16%)², qui s'enroule des milliers de fois autour de l'axone. A la différence de ce qui est observé dans le système nerveux central (SNC) où les oligodendrocytes sont responsables de la myélinisation de plusieurs axones en même temps, chaque cellule de Schwann ne myélinise qu'un seul segment axonal³. La composition de la gaine de myéline est elle aussi différente dans le SNP par rapport au SNC avec certaines protéines qui sont spécifiques d'un seul des systèmes. Par exemple, la protéine MPZ (Myelin Protein Zero) est spécifiquement exprimée dans le SNP⁴.

La lésion d'un nerf périphérique entraîne la dégradation de l'axone ainsi que de la gaine de myéline qui lui est associée. Une particularité unique du SNP, par rapport au SNC, est sa capacité à régénérer, notamment grâce aux cellules de Schwann. Après lésion, les cellules de Schwann se dédifférencient et prolifèrent avant de s'aligner en bandes de Büngner, permettant de guider la repousse axonale et de favoriser la remyélinisation⁵.

Le laboratoire d'accueil s'intéresse en particulier au rôle d'une protéine dans la myélinisation, tant au niveau central que périphérique. Il s'agit de la kinase dépendante des cyclines 7 (Cdk7). Après la mise en évidence d'un effet de Cdk7 sur la différenciation des cellules de Schwann et le développement de la gaine de myéline dans le SNP (travaux de recherches menés par Nathalie Schumacher dans le cadre de sa thèse de doctorat), le sujet de ce mémoire se focalise sur le rôle de Cdk7 dans la prolifération, la dédifférenciation et l'état non-différencié des cellules de Schwann, afin d'investiguer son rôle dans un contexte lésionnel.

Cette introduction va donc s'articuler en 3 grandes parties : *i)* description de Cdk7, *ii)* cellules de Schwann et myélinisation dans le SNP et *iii)* description des événements cellulaires et moléculaires qui surviennent à la suite d'une lésion nerveuse.

1.1. Kinase dépendante des cyclines 7 – Cdk7 :

1.1.1. Kinase dépendante des cyclines : structure générale et fonctions :

Les Cdks (Kinases Dépendantes des Cyclines) sont des enzymes qui font partie du groupe des sérine/thréonine kinases, c'est-à-dire qu'elles sont capables de catalyser une réaction de phosphorylation au niveau de résidus sérine ou thréonine d'autres protéines. Cette famille de kinases est constituée de 20 membres dont la classification est établie de Cdk1 à Cdk20⁶. Leur première découverte a eu lieu chez les levures suite à la mise en évidence de défauts au niveau de la division cellulaire chez certaines souches mutantes pour Cdc28, une Cdk qui correspond chez les mammifères à Cdk1⁷. La structure est similaire pour toutes les Cdks et est composée de 2 domaines lobulaires : en N terminal, il est constitué de feuillets bêta et au niveau C terminal, le lobe est formé en majorité par des feuillets de type alpha. A l'interface entre ces 2 extrémités se trouvent le site de liaison à l'ATP ainsi que le site catalytique de l'enzyme. Il s'agit d'une région conservée dont 35 à 65% des 300 résidus qui le composent sont similaires chez toutes les Cdks⁸. La taille des Cdks peut varier entre 250 et plus de 1250 acides aminés. En effet, le site catalytique a toujours la même taille mais les domaines N et C terminaux peuvent varier (**Figure 1**). Sous cette forme monomérique les Cdks sont inactives et nécessitent une liaison à une sous-unité régulatrice pour être activées. Cette sous-unité régulatrice est appelée cycline et la particularité de cette famille de protéines est de contenir une séquence « cyclin box », d'où elle tire son nom. Cette séquence longue d'environ 100 acides aminés adopte une structure sous la forme de 5 hélices alpha, lui permettant d'interagir avec les Cdks au niveau de leur partie C terminale par interactions hydrophobes et d'entraîner une modification de sa structure qui permettra l'accès au site catalytique. La plupart du temps, deux « cyclin box » sont présentes dans la séquence des cyclines, ce qui leur permet de pouvoir lier à la fois les Cdks via un site situé du côté N terminal mais également de pouvoir être sous une bonne conformation grâce à la deuxième « cyclin box » du côté C terminal^{9,10}.

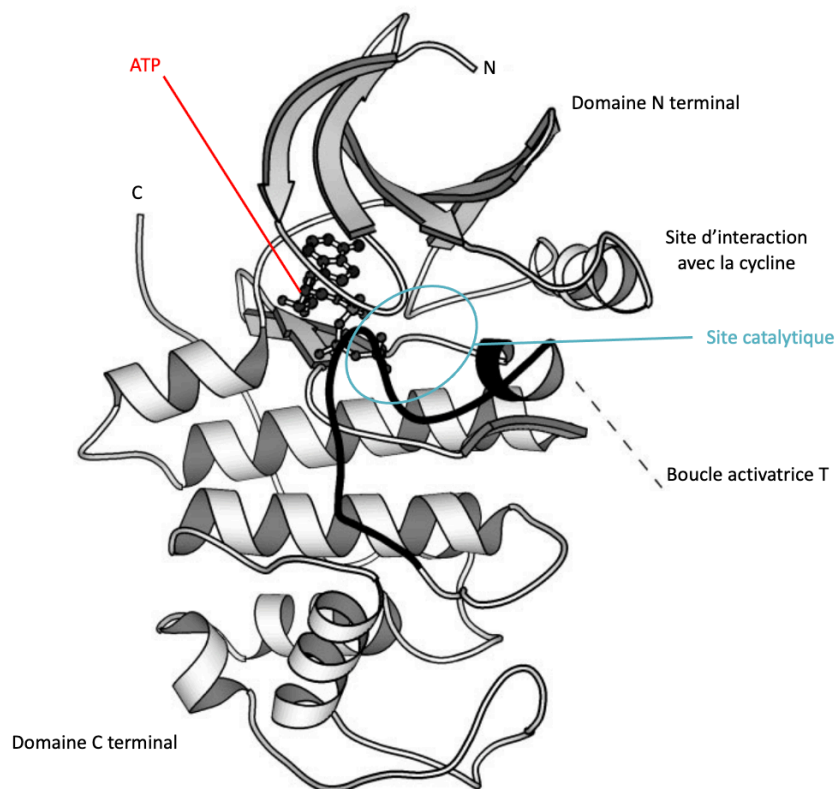


Figure 1 : Représentation de la structure générale des Cdk. Conformation adoptée par les Cdk avec un domaine C terminal composé d'hélices alpha et un domaine N terminal constitué de feuillets bêta. A l'interface de ces 2 domaines se trouvent le site catalytique de la kinase ainsi que le site de liaison à l'ATP. La boucle activatrice T sous cette forme ne permet pas l'accès au site catalytique et nécessite une liaison à une sous unité régulatrice, la cycline, pour libérer l'accès au site catalytique. *Adapté de Morgan (1997)*

Les Cdk peuvent avoir plusieurs rôles distincts au niveau cellulaire. En effet, on peut distinguer 2 groupes de Cdk : d'une part celles qui agissent sur la régulation de la transcription et d'autre part celles qui régulent la progression du cycle cellulaire (**Figure 2**). Ces 2 catégories ne sont pas mutuellement exclusives, il existe des Cdk qui peuvent à la fois jouer un rôle dans la transcription et dans la régulation du cycle cellulaire, comme Cdk7. Chaque Cdk ne se lie pas aléatoirement à une cycline, il existe différents couples Cdk-cyclines connus qui ont été mis en évidence. Une même Cdk pourra avoir une fonction différente, en fonction de la sous-unité à laquelle elle est associée^{9,11}.

1.1.2. Kinases dépendantes des cyclines en tant que régulatrices de la transcription :

Certaines Cdk comme les Cdk 7, 8 et 9 ont été décrites comme impliquées dans la régulation de la transcription des gènes. Elles agissent au niveau de l'ARN polymérase 2, responsable de la production des ARN messagers (ARNm). Plus précisément au niveau de la queue C terminale de la plus grande sous unité de l'ARN polymérase 2 (RBP1). Les Cdk 7 et 8 sont impliquées dans la régulation de la transcription et sont liées de manière étroite au complexe de pré-initiation de la transcription. Cdk9 fait partie du complexe P-TEFb (positive transcription elongation factor) et stimule l'élongation lors de la transcription par hyper-phosphorylation de la queue C terminale de RBP1. De cette manière, lorsque cette région est hypo-phosphorylée, l'ARN polymérase ne va pouvoir former que le complexe de pré-initiation de la transcription. En revanche, en cas de phosphorylation, notamment par les Cdk décrites plus haut, cela entraînera une modification de l'activité de la polymérase vers un état où elle sera capable d'effectuer l'étape d'élongation des transcrits et donc de produire des ARN messagers¹².

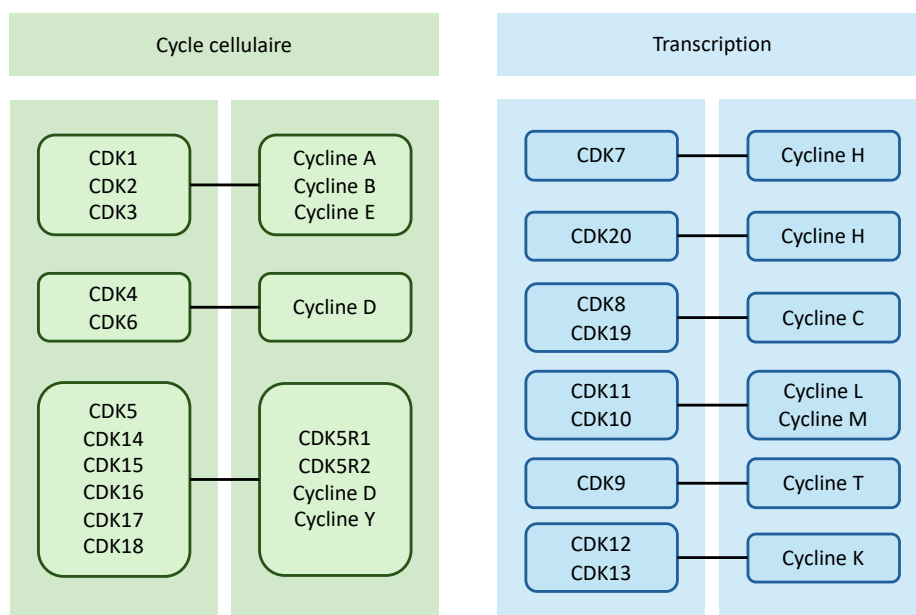


Figure 2: Comparaison des différents couples de cyclines/Cdks. Les Cdks peuvent être impliquées soit dans la régulation du cycle cellulaire, soit dans la régulation de la transcription de certains gènes. Chaque Cdk se lie préférentiellement à des cyclines particulières tel que représenté dans cette figure. *Adapté de Malumbres (2014)*

1.1.3. Kinases dépendantes des cyclines au sein du cycle cellulaire :

La progression du cycle cellulaire se fait à travers les 4 phases qui le composent à savoir : la phase G₁ durant laquelle le cycle est capable de recevoir des signaux extrinsèques afin de le moduler, la phase S correspondant à la synthèse d'ADN, la phase G₂ où la cellule se prépare à se diviser et enfin la phase M qui permet la division mitotique de la cellule en 2 cellules filles. Une phase supplémentaire appelée G₀, qui n'est pas incluse au sein du cycle, est décrite comme une phase durant laquelle la cellule ne se divise pas¹³.

Certaines Cdk_s régulent le cycle cellulaire et sont indispensables pour son fonctionnement. C'est notamment le cas des Cdk_s 4 et 6. En réponse à des signaux mitogènes comme l'activation de la voie Wnt/ β -catenin ou de la voie PI3K/Akt¹⁴, la cycline D va être exprimée et celle-ci va se lier aux Cdk_s 4 et 6. Ce complexe, une fois formé va être transloqué dans le noyau, où il sera responsable de la phosphorylation de la protéine du rétinoblastome et de la libération de facteurs de transcription, nécessaires à la production de la cycline E. La transition de G₁ vers la phase S est sous le contrôle d'un point de restriction dont le passage est uniquement possible grâce au couple Cdk2-cycline E. Par la suite, Cdk2 est également capable de lier une autre cycline, la cycline A, à la suite de la dégradation de la cycline E par ubiquitination et dégradation par le système du protéasome. Ce nouvel hétérodimère Cdk2/cycline A permet l'avancement du cycle de la phase S à la phase G₂ durant laquelle le complexe Cdk1/cycline A est formé. Le remplacement de la cycline A par la cycline B permet ensuite le passage vers la phase de mitose. A ce moment la forme majoritaire de Cdk1 se trouvera associée avec la cycline B avant que celle-ci ne soit également dégradée⁶ (**Figure 3**).

En cas de dysfonctionnement de la régulation fine des différentes phases du cycle, on peut voir apparaître de nombreux troubles dont des cancers ou encore des maladies neurodégénératives^{15,16}.

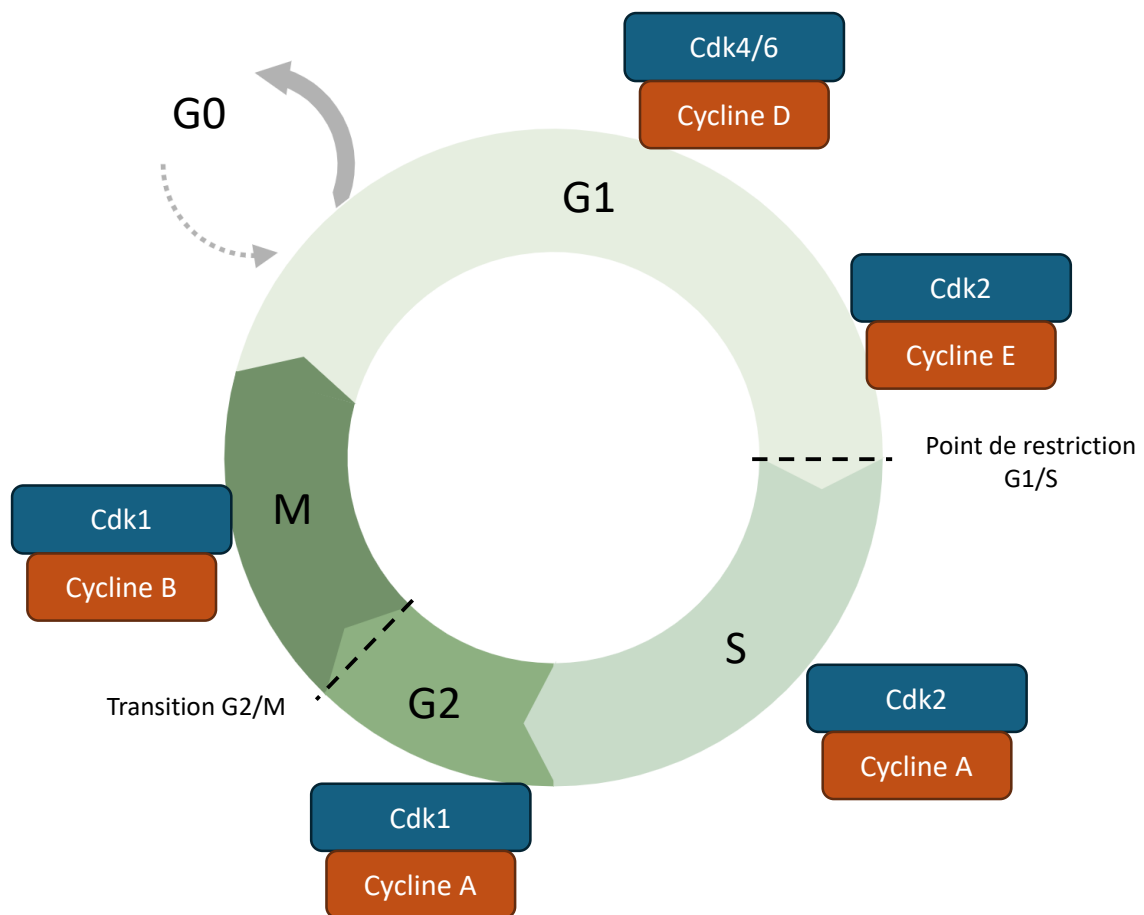


Figure 3: Illustration du cycle cellulaire et des régulateurs associés. Le cycle cellulaire est composé de 4 phases successives : G₁, S, G₂, M ainsi qu'une phase de repos G₀ durant laquelle la cellule ne se divise pas. La progression à travers chacune des phases est régulée par la présence d'un, ou plusieurs, couples d'hétérodimères de Cdk-cycline (voir texte). *Adapté de Schirripa et al. (2022)*

1.2. Structure et rôle de Cdk7 :

Cdk7 est une kinase longue de 346 acides aminés¹⁷. Elle peut avoir plusieurs rôles au niveau cellulaire: d'une part, elle contrôle le cycle cellulaire en phosphorylant les Cdks 1, 2, 4 et 6¹⁸ responsables de la progression entre les différentes étapes du cycle et d'autre part, elle régule l'initiation et l'élongation de la transcription¹⁹ (**Figure 5**). Il a été démontré que Cdk7 est indispensable à la prolifération cellulaire dans les fibroblastes embryonnaires murins et qu'un défaut total d'expression chez des souris est responsable d'une mort embryonnaire précoce. D'autre part, il a été démontré que son implication dans la transcription *in vitro* peut être facultative et que son activité peut être remplacée par d'autres Cdks comme les Cdk8 et Cdk9^{20,21}.

Cdk7 ne fonctionne pas seule mais se trouve au sein d'un complexe nommé CAK pour « Cyclin dependent Activating Kinase ». Ce dernier est composé de Cdk7, de la cycline H ainsi que de la protéine MAT1 (ménage à trois 1) qui fait partie de la famille des protéines en doigts de zinc¹⁸. Sous cette forme trimérique, pour laquelle elle possède des sites de liaison respectivement du côté C terminal pour MAT1 et en N terminal pour la cycline H¹⁷, Cdk7 peut phosphoryler d'autres protéines.

La simple liaison d'une cycline à une Cdk n'est pas toujours suffisante pour que la kinase soit fonctionnelle et puisse agir à son tour sur d'autres protéines. En effet, dans la plupart des cas, une étape supplémentaire de phosphorylation est nécessaire pour permettre l'activité des Cdks. Cette étape peut être réalisée par d'autres Cdks ou effectuée par le complexe CAK⁹ dans lequel Cdk7 est notamment capable de phosphoryler un résidu thréonine particulier. Celui-ci est situé au niveau de la séquence activatrice présente chez les Cdks, la boucle activatrice T, située au niveau du domaine C terminal des Cdks^{9,22}. Cette activation entraîne une modification dans la conformation des Cdks cibles qui permet d'augmenter leur activité²³ (**Figure 4**). Au sein du complexe CAK, Cdk7 n'a pas besoin d'être phosphorylée pour être active. La protéine MAT1 permet en effet de stabiliser le couple Cdk7-cycline H au sein du complexe afin de rendre celui-ci actif¹⁸.

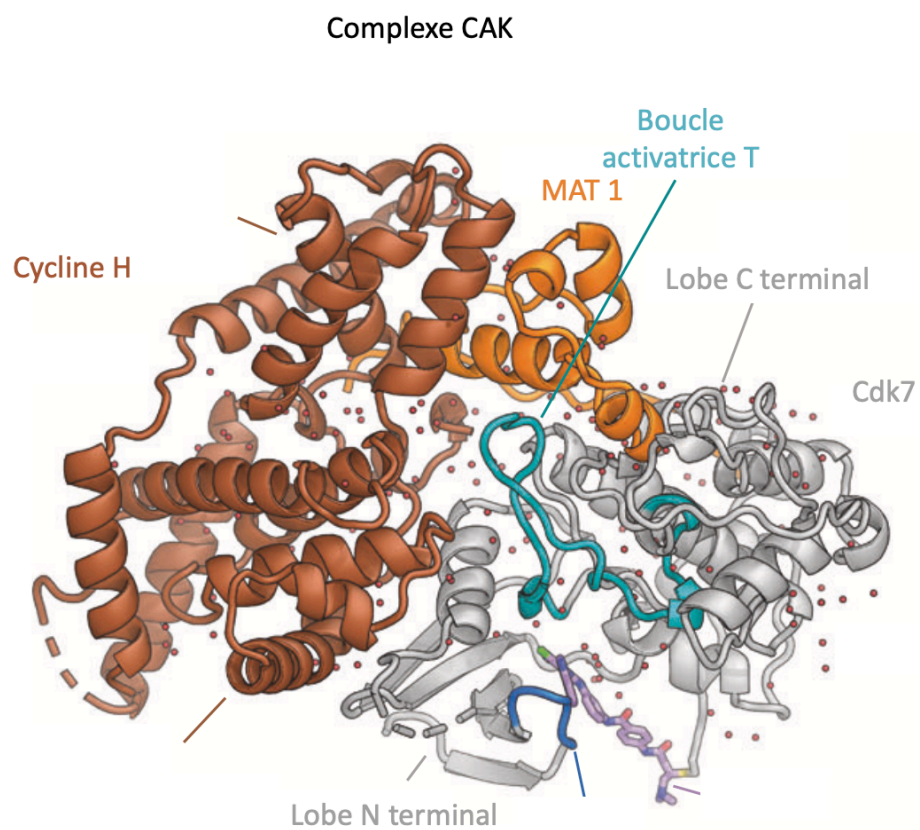


Figure 4: Représentation de la structure du complexe Cdk-Activating Kinase (CAK). La kinase Cdk7 est représentée en gris avec les 2 lobes caractéristiques N et C terminaux, ainsi que la boucle activatrice T mise en évidence en bleu. La protéine MAT1 permettant la liaison entre la cycline H et CDK7 au sein du complexe est représentée en orange. La cycline H est, elle, représentée en brun. *Adapté de Cushing et al. (2024)*

La régulation transcriptionnelle médiée par Cdk7 est due, entre autres, au fait qu'elle soit une sous-unité du facteur général de transcription de l'ARN polymérase 2, TFIIH. Cette holoenzyme est composée de dix sous-unités distinctes, dont l'une est le complexe CAK. Ce complexe est attaché au cœur de l'enzyme via le domaine XPD (Xeroderma Pigmentosum D). Sous cette forme, au sein du complexe CAK, Cdk7 est capable de phosphoryler le domaine C-terminal de la plus grande sous-unité de l'ARN polymérase II (RBP1)²⁴ pour permettre son activation.

Ce domaine C-terminal comporte 52 répétitions d'une séquence de 7 acides aminés : YSPTSPS. Des mutations dans cette séquence au niveau des sérines 2, 5 et 7 sont létales pour les individus porteurs²⁵. La sérine en position 5 est spécifiquement phosphorylée par Cdk7, activant la polymérase. Néanmoins, le complexe CAK n'est pas le seul à pouvoir effectuer cette activation au niveau du domaine C-terminal de la polymérase. Il a été démontré que d'autres kinases permettaient aussi son activation comme par exemple Cdk9²³.

La capacité de Cdk7 à phosphoryler un substrat n'est pas limitée à sa présence au sein du facteur général de transcription TFIIH. En étant inclus dans le complexe CAK, Cdk7 peut également agir par phosphorylation sur d'autres cibles telles que le récepteur alpha à l'acide rétinoïque (RAR α), les récepteurs aux œstrogènes (ER α), la protéine P53 ainsi que les PPARs (peroxisome proliferator-activated receptor). Ces différents récepteurs nucléaires sont notamment connus pour jouer un rôle important dans différents tissus au niveau de la différenciation²³. **(Figure 5)**

1.2.1. Cdk7 dans la myélinisation :

En 2002, il a été démontré que l'inactivation du gène *MAT1* n'entraînait aucun problème de myélinisation par les cellules de Schwann au cours des deux premiers mois de vie chez la souris. Cependant, après trois mois, un début de démyélinisation a été observé au niveau du nerf sciatique. Dans les axones de large diamètre normalement myélinisés, une perte presque totale de la myéline a été constatée. Celle-ci était suivie d'une prolifération des cellules de Schwann et d'une remyélinisation, bien que cette dernière ne permette jamais d'atteindre une épaisseur de myéline comparable à ce qu'elle était avant la démyélinisation. Chez ces souris mutantes pour le gène *MAT1*, une diminution de l'expression de Cdk7 a également été observée. Malgré l'inactivation du gène *MAT1* dans les cellules de Schwann, les

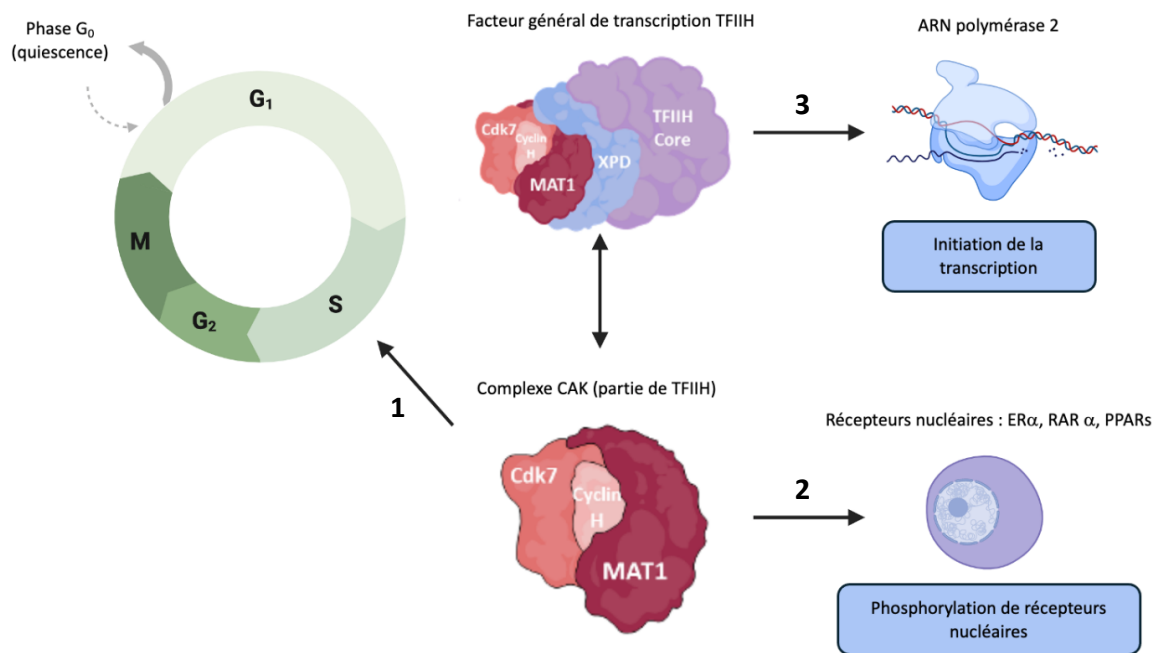


Figure 5: Représentation des différents rôles de Cdk7 : 1. Régulation du cycle cellulaire. 2. Phosphorylation de récepteurs nucléaires. 3. Régulation de la transcription. Lorsque Cdk7 est associé à MAT1 et la cycline H pour former le complexe CAK, il est capable de réguler la progression du cycle cellulaire en phosphorylant d'autres Cdk. Il peut également agir en phosphorylant certains récepteurs nucléaires tels que ERα, RARα et les PPARs. Le complexe CAK peut également faire partie du facteur général de transcription (TFIIH), la liaison au cœur de ce complexe est réalisée via XPD. Le facteur général de transcription TFIIH peut agir en phosphorylant la queue de l'ARN polymérase 2 afin d'initier et de permettre l'élongation de la transcription.

résultats ont démontré qu'elles étaient quand même capables de se développer, d'atteindre leur phénotype différencié, de produire de la myéline et de maintenir cette production²⁶.

Au niveau du SNC, l'invalidation de Cdk7 dans les oligodendrocytes n'entraîne pas de déficit de myélinisation développementale. Néanmoins, des défauts apparaissent au niveau de l'intégrité de la gaine de myéline ce qui entraîne des déficits et des problèmes comportementaux chez les animaux mutés plus âgés, comme une réduction de la force de contraction des membres postérieurs lors de stimulations musculaires répétées²⁷.

Enfin en 2007, Compe *et al.* ont mis en évidence qu'une des sous-unités qui compose TFIIH, à savoir la protéine XPD, permettant la liaison du facteur de transcription avec le complexe CAK, avait également un rôle dans la myélinisation. En effet, une mutation au sein de XPD chez des souris entraîne une diminution de l'expression d'une protéine majeure de la myéline, la Myelin Basic Protein (MBP), et un phénotype d'hypomyélinisation au niveau du SNC chez les animaux mutés²⁸.

1.3. Développement de la gaine de myéline dans le système nerveux périphérique :

Les cellules responsables de la myélinisation du SNP sont appelées cellules de Schwann, décrites en 1847 par Theodore Schwann²⁹. La gaine de myéline est une structure composée principalement de lipides et de protéines, obtenue par l'enroulement en couches très serrées du cytoplasme des cellules de Schwann autour des prolongements axonaux des neurones³⁰. La présence de cette couche autour de l'axone est essentielle pour assurer son isolation électrique, permettant la conduction efficace de l'influx nerveux. Les interruptions « non-myélinisées » entre différentes gaines de myéline le long de l'axone sont appelées Nœuds de Ranvier³¹. Plus précisément, les gaines de myéline favorisent la transmission rapide d'influx nerveux sur des longues distances par conduction saltatoire³².

La gaine de myéline est également importante pour le support métabolique de l'axone. En effet, il a été démontré qu'en périodes d'hypoglycémie, le glycogène qui est stocké dans les cellules de Schwann myélinisantes peut être utilisé pour permettre le bon fonctionnement de la conduction nerveuse³³.

1.3.1. Origine des précurseurs des cellules de Schwann :

Les précurseurs des cellules de Schwann dérivent des cellules de la crête neurale (**Figure 6**). Ces dernières sont des cellules souches, localisées au niveau dorsal du tube neural lors du développement embryonnaire. Les cellules dérivées de la crête neurale commencent par se différencier en précurseurs de cellules de Schwann multipotents, qui donneront naissance aux cellules de Schwann immatures, mais également aux mélanocytes, aux neurones parasympathiques du SN entérique, aux cellules chromaffines, aux cellules de la pulpe dentaire et enfin à certains fibroblastes qui seront responsables de la formation de l'endonèvre autour des fibres nerveuses³⁴⁻³⁶.

C'est l'expression du facteur de transcription Sox10 (Sex determining region Y box 10)³⁷, juste après le début de la migration des cellules depuis la crête neurale, qui détermine leur voie de différenciation en précurseurs de cellules de Schwann au jour embryonnaire 12-13 (E12-13) chez les espèces murines. Ces précurseurs dépendent de la présence des axones pour leur survie et leur prolifération. En effet, à ce stade de leur développement, ils ne reçoivent pas d'autre support que celui de l'axone car il n'y a pas encore de vaisseaux sanguins, ni de tissus conjonctifs autour du nerf en formation³⁶. De plus, le facteur de transcription Sox10 est essentiel pour que les précurseurs répondent à la Neuréguline 1 de type III (Nrg1-III), en induisant l'expression de son récepteur, ErbB3³⁸. En effet, la Nrg1-III, produite par les axones, agit comme un facteur de survie et un mitogène pour ces précurseurs³⁴.

1.3.2. De précurseur de cellule de Schwann à cellule de Schwann immature :

La différenciation en cellule de Schwann immature se produit chez les espèces murines entre les jours E13 et E15 (**Figure 6**). Ces cellules immatures sont responsables du tri radial qui commence en périnatal et s'étend jusqu'au 10^{ème} jour de vie chez les rongeurs³⁹. Ce processus, crucial pour le bon développement du SNP, établit une relation entre une cellule de Schwann et un axone de large diamètre ($>1\mu\text{m}$), permettant sa myélinisation. À l'inverse, les axones de faible calibre ne sont pas isolés et forment des fibres de Remak. Dans ce cas, une cellule de Schwann s'associe à plusieurs axones sans les myéliniser. À ce stade, les interactions entre la matrice extracellulaire et les cellules de Schwann immatures sont essentielles, notamment pour pouvoir assurer le tri radial et la différenciation³⁸. En effet, chez des souris

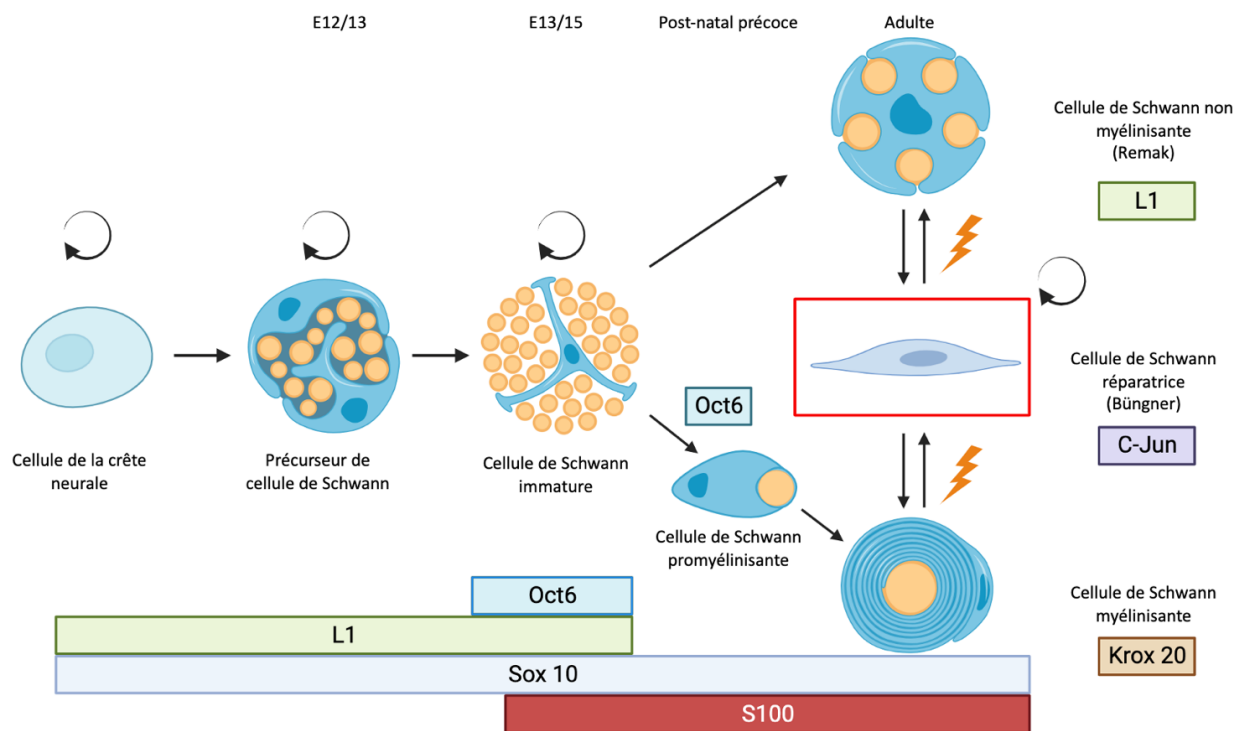


Figure 6: Illustration du développement des cellules de Schwann murines. Les cellules de Schwann dérivent des cellules de la crête neurale. Successivement, elles passent par les stades de précurseur de cellules de Schwann au jour embryonnaire 12/13, puis au stade de cellule de Schwann immature aux alentours du jour embryonnaire 13/15. Après ce stade, les cellules de Schwann immatures pourront se différencier : soit en cellules de Schwann non myélinisantes (Remak), soit en cellules de Schwann pro myélinisantes au stade post-natal précoce puis myélinisantes pour lesquelles la myélinisation sera complètement achevée à l'âge adulte. Un phénotype de cellule de Schwann supplémentaire apparaît après lésion, il s'agit des cellules de Schwann réparatrices (Büngner). Différents marqueurs identifiés sur le schéma permettent de caractériser les différents stades développementaux des cellules de Schwann. *Adapté de Jessen et Mirsky (2008), Mirsky et al. (2002)*

mutantes qui ont un défaut d'expression de la laminine 221 (composant majeur de la lame basale des cellules de Schwann), celles-ci présentent des défauts moteurs. Ceux-ci, sont la conséquence de l'apparition d'une neuropathie démyélinisante périphérique, qui se traduit au niveau des cellules de Schwann par un défaut dans le tri radial³⁹. De plus, les cellules de Schwann immatures influencent d'autres types cellulaires environnants, comme les cellules mésenchymateuses. Cela contribue au développement des différentes couches de tissus conjonctifs (endonèvre, épinèvre et périnèvre), formant ainsi la structure morphologique finale du nerf^{34,36}. La prolifération des cellules de Schwann immatures, importante pour adapter le nombre de cellules de Schwann au nombre d'axones, est sous la dépendance de la voie de signalisation Notch ainsi que ses effecteurs intracellulaires que sont ERK1/2 et JNK. Cette voie est régulée par l'axone qui exprime les ligands de Notch. Elle permet également à ce stade d'empêcher la myélinisation qui ne se mettra en place que plus tard dans le développement⁴⁰.

1.3.3. Différenciation en cellules de Schwann pro-myélinisantes (Figure 6)

L'expression de Sox10 au niveau des cellules de Schwann immatures va entraîner l'expression d'un autre facteur de transcription, Oct6, qui en synergie avec Sox10 entrainera l'expression du facteur Egr2/Krox20 qui est décrit comme le principal responsable de l'initiation de la myélinisation^{41,42}. Plus précisément, Krox20 est un facteur de transcription à doigts de zinc. Son gène est régulé par une séquence stimulatrice (enhancer) de 1,3 kb située 35 bases en amont du site d'initiation de la transcription. L'activation de cette séquence stimulatrice est sous la dépendance du facteur de transcription de type POU, Oct6. Il a été montré que Oct6 n'agissait pas seul sur cette séquence régulatrice mais en combinaison avec le facteur Brn2 (Brain 2 class III protein domain). Cependant, la perte d'Oct6 n'empêche pas le démarrage de la myélinisation. Dans ce cas, Brn2 seul permet une myélinisation, néanmoins retardée. L'expression d'Oct6 est uniquement transitoire dans le développement des cellules de Schwann et son maximum apparaît lors du passage au stade promyélinisant³⁷.

Il existe également des inhibiteurs de la différenciation des cellules de Schwann immatures en cellules de Schwann myélinisantes tels que la voie JNK (c-Jun (N)amino terminal kinase). Celle-ci est mise au repos lorsque Krox20 est exprimé et que la cellule prend la voie de différenciation vers une cellule de Schwann myélinisante³⁴.

1.3.4. Cellules de Schwann myélinisantes :

Lorsque l'expression de Krox20 est activée par Oct6 et Brn2, il peut à son tour agir en tant que régulateur principal de la myélinisation, notamment en activant l'expression de gènes codant pour des protéines de la myéline tels que les protéines MPZ, MBP (Myelin Basic Protein) ou la protéine PMP22 (Protéine Périphérique de Myéline 22). De plus, une fois exprimé, Krox20 permettra également un rétrocontrôle négatif sur l'expression de Oct6. En effet, la perte de l'expression de Krox20 dans les cellules de Schwann myélinisantes, n'entraîne pas de diminution de l'expression de Oct6⁴³.

Comme précisé dans la section 1.3.2, uniquement les axones >1µm de diamètre seront isolés lors du tri radial et myélinisés. Les fibres au diamètre <1µm ne seront pas myélinisées mais seront entourées par des groupes de cellules de Schwann non myélinisantes appelées cellules Remak.

Ce choix de différenciation est régulé par la Nrg1-III. En effet, la Nrg1-III est exprimée à la surface des axones et peut se lier aux récepteurs ErbB2 et ErbB3 présents au niveau de la membrane cellulaire des cellules de Schwann. Cette liaison régule l'expression de molécules associées à la myéline. De plus, le niveau d'expression de Nrg1-III au niveau axonal joue un rôle déterminant dans l'épaisseur de la gaine de myéline qui va se développer autour de l'axone. La cascade moléculaire qui permettra l'expression des gènes de la myéline est la suivante : la liaison de Nrg1-III au récepteur ErbB2/ErbB3 (de type tyrosine kinase) entraîne l'activation de la phospholipase C et une augmentation de la concentration en calcium au niveau intracellulaire. Suite à cette augmentation, le facteur de transcription NFATc4 (Nuclear Factor of Activated T cells 4) est transloqué dans le noyau pour activer la transcription de Krox20. D'autres voies de signalisation sont également impliquées dans l'expression des gènes de la myéline tels que la voie des MAPK (Mitogen Activated Protein Kinases) ou encore la voie PI3K-Akt-mTOR³⁶ (**Figure 7**).

Des mutations affectant les séquences codantes du gène *Egr2/Krox20* sont associées à des formes importantes de neuropathies et de démyélinisation. De même, les mutations du gène *Sox10* entraînent une hypomyélinisation tant au niveau du SNC que du SNP. Cela souligne donc l'importance de ces gènes dans les processus de myélinisation et dans le maintien de l'intégrité de la gaine de myéline au fil du temps^{44,45}.

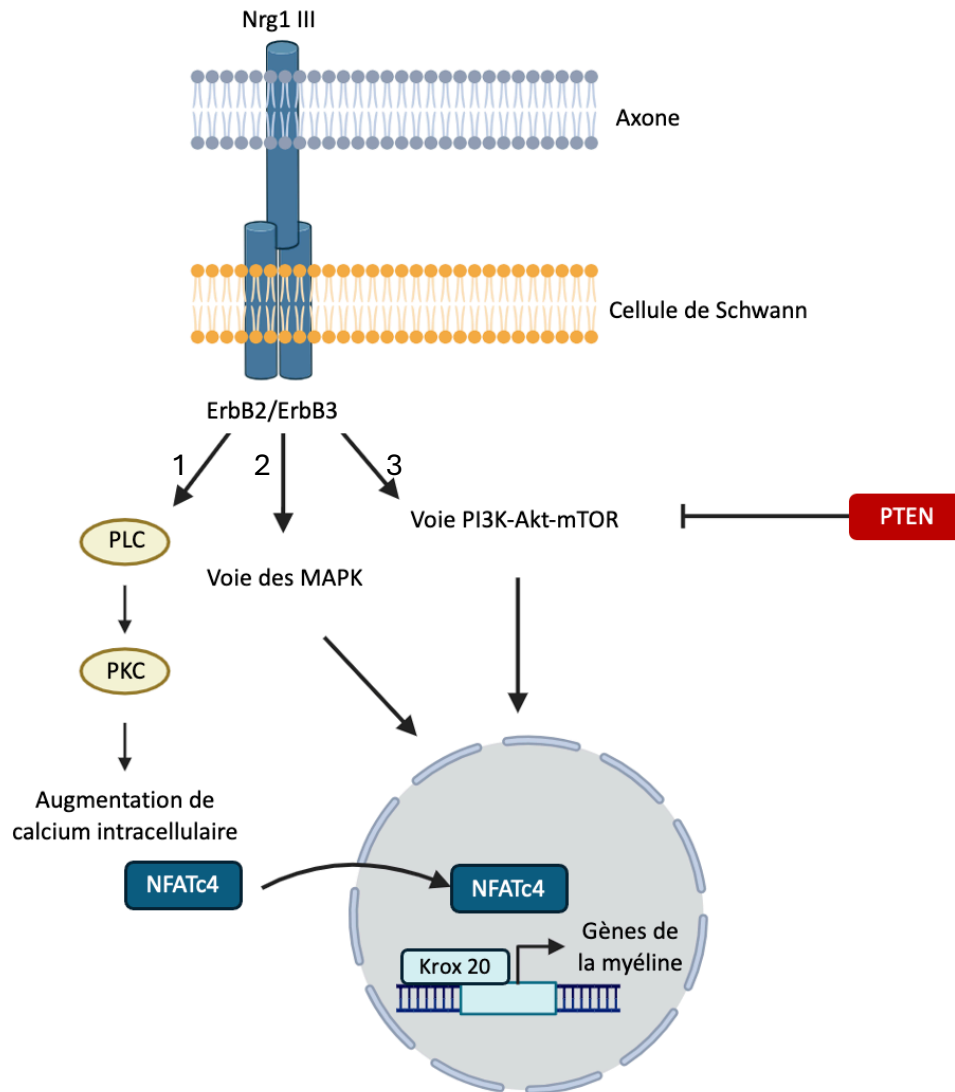


Figure 7: Représentation de la voie de signalisation de la Neuréguline 1 (Nrg1) dans les cellules de Schwann. L'interaction entre Nrg1-III, exprimée à la surface de l'axone, et son récepteur ErbB2/ErbB3, exprimé à la membrane des cellules de Schwann, entraîne une signalisation interne via différentes voies. **1.** Voie de la phospholipase C qui entraîne une augmentation de calcium intracellulaire, permettant la translocation du facteur de transcription NFATc4 à l'intérieur du noyau. Celui-ci agit sur Krox20 et donc l'expression des gènes pro-myélinisants. **2.** Voie des MAPK, qui peuvent également mener à l'expression de gènes pro-myélinisants via l'activation de Krox20 et **3.** Voie PI3K-Akt-mTOR. *Adapté de Bolino (2021)*

La myélinisation de l'axone n'est pas infinie, la gaine de myéline a une épaisseur définie en fonction du diamètre axonal. Parmi les mécanismes qui limitent la production de la myéline on peut citer : la régulation négative de la voie Nrg1/ErbB par clivage du récepteur par TACE (Tumor necrosis factor-Alpha Converting Enzyme), mais également par une diminution de l'expression de ErbB2 lorsque la myélinisation augmente. Une inhibition de l'activité de la voie PI3K-Akt-mTOR par recrutement de PTEN (Phosphatase and TENSin homolog) permet également de contrôler l'extension de la myélinisation^{46,47} **(Figure 7)**.

La myéline, n'est pas uniquement composée de protéines mais également de lipides en grande quantité. Ceux-ci permettent une bonne organisation et une bonne compaction de la gaine, via des interactions avec les protéines de la myéline⁴⁸. Par exemple, la présence de cholestérol est essentielle dans les cellules de Schwann afin qu'elles puissent inclure celui-ci au sein des nombreuses couches de la myéline. La synthèse de lipides est sous le contrôle des SREBP (Sterol Regulatory Element Binding Protein), facteurs de transcription impliqués dans la régulation des gènes de synthèse d'acides gras et de cholestérol⁴⁹. Les SREBP 1a et 2 agissent notamment sur le promoteur du gène de la HMG CoA réductase, enzyme limitante dans la synthèse de cholestérol⁵⁰. En parallèle, Krox20 peut également agir au niveau des promoteurs des gènes d'enzymes de synthèse des acides gras, et participe donc à la régulation de la synthèse lipidique au sein des cellules de Schwann en développement⁵¹

1.3.5. Cellules de Schwann non myélinisantes : (Figure 6)

Comme introduit dans la section 1.3.2, la différenciation des cellules de Schwann immatures ne donne pas uniquement des cellules de Schwann myélinisantes mais également des cellules de Schwann dites non myélinisantes, appelées cellules Remak. Ces dernières sont associées à plusieurs axones dont le diamètre est inférieur à 1µm, qualifiées de type C et responsables de la transmission des informations douloureuses. Les cellules Remak s'associent aux axones de manière à ce que chaque axone soit séparé des autres par des protrusions membranaires émanant des cellules de Remak⁵². Des axones dénudés de toute membrane provenant des cellules Remak sont donc signe d'une mauvaise maturation en cellule Remak. La voie de signalisation mTOR, impliquée dans le développement de cellules de Schwann myélinisantes, est également impliquée dans le développement des fibres de Remak et un

contrôle très précis de celle-ci est indispensable pour la fonction et le développement optimal de ces cellules⁵². Les cellules de Schwann non myélinisantes continuent d'exprimer certains marqueurs qui définissent le stade immature comme L1, NCAM (Neural Cell Adhesion Molecule) et le récepteur à la neurotrophine p75⁵³. Pour l'instant, nous manquons encore de marqueurs spécifiques pour ces cellules Remak, rendant pratiquement impossible de les cibler afin de les étudier en détail au niveau moléculaire⁵².

1.3.6. Cellules de Schwann réparatrices : (Figure 6)

Ce type de cellules de Schwann n'est pas présent de manière physiologique dans le SNP, mais apparaît lors d'une lésion au niveau d'un nerf, engendrant une dédifférenciation, souvent appelée « transdifférenciation », des cellules de Schwann. Ces dernières, myélinisantes ou non myélinisantes, totalement différenciées, vont perdre leurs caractéristiques pour devenir des cellules avec un phénotype se rapprochant de celui du stade immature des cellules de Schwann. Cela se démontre notamment par la perte de l'expression des facteurs pro-myélinisants (tels que Krox20), de l'expression des protéines spécifiques de la myéline comme MBP, MPZ, MAG (Myelin Associated Glycoprotein) ou encore de la E-Cadhérine^{54,55}. On observe aussi une augmentation de l'expression de molécules caractéristiques du stade immature des cellules de Schwann telles que NCAM, la protéine L1 ou encore la protéine GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein)⁵⁵. Ces cellules dédifférenciées vont augmenter l'expression de cytokines et autres facteurs trophiques afin de favoriser leur re-différenciation lorsqu'elles seront à nouveau en contact avec des axones, ainsi que la re-myélinisation de ces derniers. Parmi ces facteurs, on retrouve les facteurs BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor), GDNF (Glia Cell Line Derived Neurotrophic Factor) et Shh (Sonic Hedgehog)⁵³.

En outre, il est connu que la voie de signalisation Notch joue un rôle inhibiteur dans la myélinisation (étant régulée négativement lorsque le facteur pro-myélinisant Krox20 est exprimé). Elle est également impliquée dans la maturation des précurseurs de cellules de Schwann et dans la division des cellules de Schwann immatures. Mais il est également à noter qu'après une lésion nerveuse, Notch contribue à la dédifférenciation des cellules de Schwann en accélérant la vitesse de ce processus. D'autre part, l'activation de cette voie permet de maintenir les cellules de Schwann dans cet état dédifférencié⁵³.

Un des principaux marqueurs de ces cellules de Schwann différenciées/réparatrices est un facteur de transcription en doigts de zinc appelé c-Jun, effecteur final de la voie de signalisation JNK (Jun-N-terminal kinase) et sous-unité du complexe transcriptionnel AP-1. Suite à une lésion nerveuse, le niveau d'expression de ce facteur de transcription augmente très rapidement et perdure 7 à 10 jours⁵⁶. Son expression est également contrôlée par Krox20. En effet, chez des souris n'exprimant pas Krox20, les niveaux de c-Jun restent très élevés et ne diminuent pas dans les cellules de Schwann. De plus, en cas de surexpression de c-Jun, une inhibition de l'expression de Krox20 est observée tout comme une diminution du niveau d'expression de la protéine MPZ⁵³.

Il a également été montré que l'inactivation conditionnelle de c-Jun dans les cellules de Schwann entraîne un délai dans la différenciation des cellules de Schwann après lésion. Cela se marque par la suite par une limitation de la capacité régénérative et fonctionnelle du nerf lésé⁵³. Le manque de régénération fonctionnelle pourrait notamment être lié au fait que c-Jun est essentiel pour obtenir le phénotype des cellules de Schwann réparatrices. Malgré que ces cellules réparatrices ne soient plus en contact direct avec l'axone, leur présence est indispensable pour assurer la survie des fibres nerveuses qui ont été lésées⁵⁴.

Après lésion, c-Jun est un facteur essentiel responsable des changements moléculaires observés au sein des cellules de Schwann lorsqu'elles deviennent des cellules réparatrices. De plus, c-Jun contrôle la morphologie et la disposition adoptée par celles-ci afin de favoriser la régénération axonale⁵⁴. Cette disposition caractéristique, sous forme d'un alignement rectiligne, qu'acquiert les cellules de Schwann différenciées après lésion est appelée bandes de Büngner.

Le phénotype réparateur des cellules de Schwann résulte également de l'activation de la voie Raf/MEK/ERK. En effet, l'activation de cette voie en absence de lésion, à des niveaux similaires à ceux que l'on observe dans les cellules de Schwann après lésion, déclenche la mise en place des caractéristiques des cellules réparatrices tels que la démyélinisation et la prolifération de ces cellules⁵⁵.

D'autres mécanismes moléculaires sont également importants dans l'activation du phénotype réparateur, notamment au niveau épigénétique. En effet il a été montré que la déméthylation de H3K27 entraîne une activation de l'expression de Shh. De plus, une perte de l'acétylation au niveau de H3K27 sur les régulateurs positifs de nombreux gènes pro-myélinisants est observée après lésion. Le profil d'expression des miARN varie fortement après lésion. Ces changements peuvent être expliqués par le fait que c-Jun agit comme régulateur de l'expression de nombreux miARN^{56,57}

1.4. Lésion nerveuse : (Figure 8)

On distingue généralement 2 types de lésions traumatiques au niveau d'un nerf périphérique : un écrasement ou une section complète du nerf. Dans les 2 cas, une succession de mécanismes vont être mis en place portant le nom de dégénérescence Wallérienne⁵⁸.

1.4.1. Dégénérescence Wallérienne :

La lésion au niveau d'un nerf provoque une réaction inflammatoire caractéristique. Le bon déroulement de celle-ci est essentiel à la régénération post-lésionnelle. En effet, la lésion va entraîner une dégénérescence des axones. Dans ce cas, les cellules de Schwann perdent le contact avec ces derniers et vont rejeter leur myéline. La mise en place rapide de ces événements est essentielle pour assurer une récupération et une repousse axonale rapide, efficace et complète. Le recrutement et l'activation de macrophages va se faire via les vaisseaux sanguins non lésés à proximité de la lésion. Après passage dans les tissus par diapédèse, ils permettront de nettoyer la lésion des débris axonaux et des morceaux de gaine de myéline s'y trouvant par phagocytose⁵. L'apparition des premiers signes de dégradation axonaux est observée environ 36 à 44h après lésion chez la souris. L'élimination des débris de myéline est importante. En effet, certaines protéines de la myéline telles que MAG sont des inhibiteurs de régénération axonale. Une grande partie de la myéline sera aussi dégradée directement via les cellules de Schwann durant les 5 à 7 premiers jours après la lésion^{55,57}. En effet, il a été démontré que les cellules de Schwann sont capables de réaliser la myélinophagie. Celle-ci est décrite comme une phagocytose médiée par les cellules de Schwann via l'expression de certains récepteurs également présents au niveau des macrophages, tels que

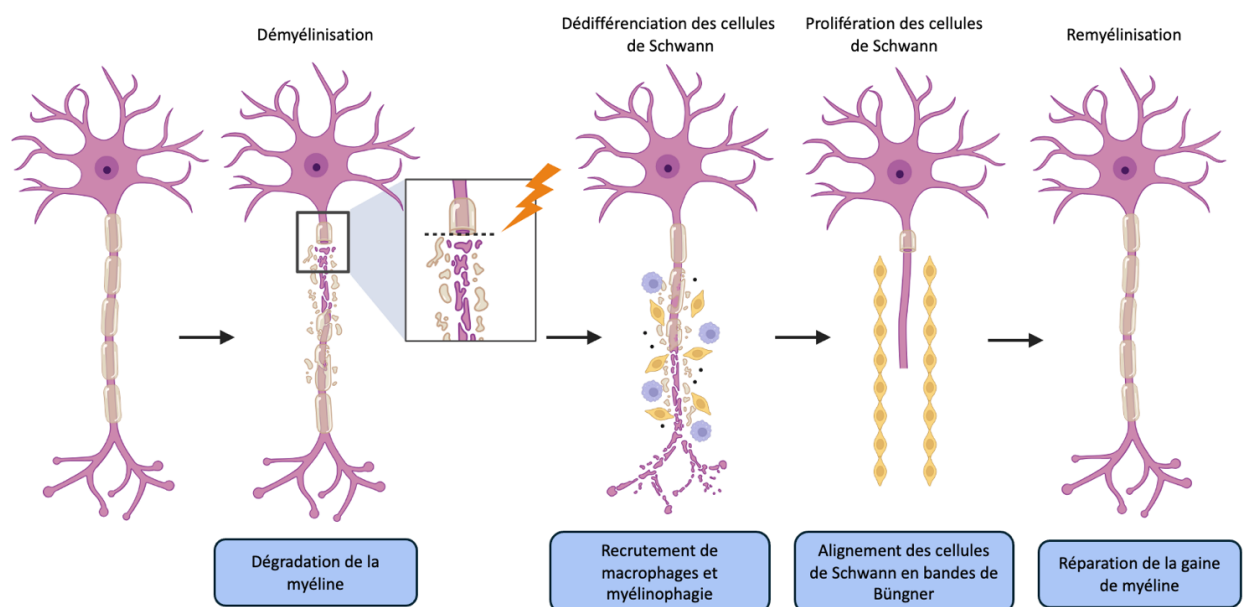


Figure 8: Illustration du phénomène de dégénérescence Wallérienne après lésion nerveuse. La première étape lors d'une lésion nerveuse est une dégradation de la gaine de myéline entourant l'axone, menant à une démyélinisation. La présence de débris de myéline au niveau de la lésion entraîne une inflammation et par conséquent le recrutement de macrophages à ce niveau. De plus, la dédifférenciation des cellules de Schwann ainsi que leur capacité de myélinophagie sont essentielles lors de ce processus. Les cellules de Schwann dédifférenciées prolifèrent et s'alignent en bandes de Büngner afin de guider la repousse axonale, favorisant la réparation de la gaine de myéline et la remyélinisation de l'axone. *Adapté de Boerboom et al.(2017)*

Tyro3, Axl et Mer. Un autre mode de dégradation de la myéline est l'autophagie, au cours de laquelle les cellules de Schwann transportent directement des débris de myéline dans des vésicules formées de doubles membranes lipidiques qui fusionneront par la suite avec les lysosomes^{57,59}. Il faut entre 12 et 14 jours environ pour avoir une dégradation complète de la gaine de myéline chez des souris non-modifiées⁵.

1.4.2. Remyélinisation et repousse axonale :

La remyélinisation n'est possible que lorsque l'environnement cellulaire post-lésionnel est favorable. C'est notamment grâce à l'alignement rectiligne des cellules de Schwann dédifférenciées en bandes de Büngner (adoptant une morphologie allongée et de type bipolaire) que l'environnement sera propice à une reprise de la myélinisation⁵⁷. La mise en place des cellules en bandes de Büngner est possible suite à l'expression de certains gènes spécifiques tels que *EphB2*, *Sox2* et *N-Cadhérine*, qui a lieu lors de la dédifférenciation des cellules de Schwann. Ce processus dépend notamment des fibroblastes. Ceux-ci expriment l'éphrine B à leur surface, favorisant l'activation de EphB2 au niveau des cellules de Schwann. Il en résulte une relocalisation de la N-cadhérine, par l'intermédiaire de Sox2, au niveau des jonctions cellulaires, permettant d'attirer les autres cellules de Schwann et entraînant leur alignement en bandes de Büngner⁵⁵. Les cellules de Schwann réparatrices expriment de nombreuses cytokines favorables à la reprise de la myélinisation et à la repousse axonale comme NT-3 (Neurotrophine 3), GDNF et BDNF. Mais d'autres types cellulaires comme les macrophages recrutés peuvent également produire des cytokines telles que IL-6 (Interleukine 6) ou LIF (Leukemia Inhibitory Factor) qui vont agir positivement au niveau axonal pour favoriser sa croissance⁵⁷. Cette repousse axonale est longue et exige un maintien des cellules réparatrices sur le long terme afin d'optimiser la régénération. Dans ce contexte, il a été récemment décrit que STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3) était impliqué dans la survie à long terme des cellules de Schwann réparatrices⁵⁶.

Stratégie expérimentale et objectifs

2. Objectifs du travail et stratégie expérimentale :

J'ai été accueilli dans le laboratoire du Dr Rachelle Franzen afin de travailler dans la continuité des travaux de recherches effectués par l'équipe, sur l'étude du rôle de Cdk7 dans la myélinisation du système nerveux périphérique, ainsi que dans un contexte de lésion au niveau du nerf. Mon projet s'inscrit dans la lignée des travaux de la thèse de doctorat de M^{lle} Nathalie Schumacher, qui démontrent un rôle de Cdk7 dans le développement des cellules de Schwann ainsi que dans la myélinisation du SNP.

Certaines observations ont été faites dans un premier modèle de souris, CNP-Cre, chez lesquelles l'invalidation de *Cdk7* est présente aussi bien dans les oligodendrocytes que dans les cellules de Schwann, grâce au croisement de souris *Cdk7^{lox/lox}* avec des souris exprimant la Cre recombinase sous la dépendance du promoteur du gène *CNP1* (enzyme associée à la myéline). Parmi celles-ci, on a pu démontrer que l'invalidation de *Cdk7* entraînait des défauts lors du tri radial, étape primordiale lors du développement des cellules de Schwann. Une diminution de l'épaisseur de la gaine de myéline produite par les cellules de Schwann a également été mise en évidence, tout comme une diminution de l'expression de protéines de la myéline qui lui sont associées. Ce modèle a également révélé l'existence de problèmes fonctionnels chez ces animaux.

Afin de confirmer que ces observations étaient bien dues à l'invalidation de Cdk7 au niveau du SNP, un nouveau modèle murin DHH-Cre a été mis en place afin de pouvoir étudier l'effet de Cdk7 uniquement dans le SNP.

Mon premier objectif a donc été d'effectuer une analyse de l'expression des protéines de la myéline au sein du nerf sciatique murin, à différents âges définis, par Western Blot, afin de confirmer les résultats obtenus dans le modèle précédent.

Mon second objectif a été d'investiguer le rôle de Cdk7 dans un contexte mimant le phénotype des cellules de Schwann dédifférenciées et en conditions post-lésionnelles. Pour ce faire, la stratégie développée a reposé sur l'utilisation de plusieurs techniques.

Tout d'abord, nous avons réalisé des explants de nerfs *ex vivo* provenant de souris DHH-Cre ainsi que d'un modèle de souris où l'invalidation de *Cdk7* est inducible (modèle PLP-CreERT). Le but de ces expériences était de mimer une lésion nerveuse afin d'étudier certains phénomènes qui surviennent dans le contexte post lésionnel. En parallèle, des tests de démyélinisation sur des cultures primaires de cellules de Schwann murines provenant du modèle DHH-Cre ont également permis d'étudier l'impact de la perte de *Cdk7* sur des phénomènes post-lésionnels, notamment la perte de myéline survenant suite à la dédifférenciation des cellules de Schwann.

Enfin, nous avons également utilisé et exploré un modèle qui repose sur l'utilisation de la lignée cellulaire de Schwann appelée MSC80. Les cellules de cette lignée prolifèrent et ne sont pas différenciées, deux caractéristiques fondamentales des cellules de Schwann réparatrices qui apparaissent après lésion. Pour pouvoir étudier le rôle de *Cdk7* chez ces cellules MSC80, nous avons réalisé des tests de prolifération et avons investigué leur profil d'expression génique par RT-qPCR. Ceci a été réalisé dans 2 modèles différents : chez des cellules pour lesquelles nous avons tenté d'invalider *Cdk7* par l'utilisation de shRNA dirigés contre *Cdk7*, et chez des cellules pour lesquelles *Cdk7* a été inactivé par l'utilisation d'un inhibiteur pharmacologique spécifique, YKL-5-124⁶⁰.

Matériel et Méthodes

3. Matériel et Méthodes :

3.1. Modèles expérimentaux (Figure 9) :

Afin d'obtenir un modèle de souris chez laquelle le gène de *Cdk7* est spécifiquement invalidé dans les cellules de Schwann, la technologie Cre/lox a été utilisée. Chez des souris de fond génétique C57BL/6-SV129, une séquence contenant des sites LoxP de sens opposés encadrant une séquence de polyadénylation inversée ont été insérés entre les exons 2 et 3 du gène *Cdk7*, permettant l'obtention des souris *Cdk7^{lox/lox}*. Ces souris ont été croisées avec des souris *Dhh^{Cre/+}* chez lesquelles le gène codant pour la recombinaise Cre est placé en aval du promoteur du gène *Dhh* (Desert hedgehog) (FVB(Cg)-Tg(DHH-cre)1Mejr/J ;The Jackson Laboratory), permettant une expression spécifique de la Cre recombinaise dans les cellules de Schwann, à partir du stade précurseur. Ce promoteur est actif aux alentours de E12 dans les nerfs sciatiques murins. On obtient donc un modèle de souris avec un génotype *Dhh^{Cre/+} Cdk7^{lox/lox}* (dénommées cKO dans la suite du travail) et leurs congénères contrôles *Dhh^{+/+} Cdk7^{lox/lox}*.

Un second modèle de souris transgéniques a été utilisé. Des souris *Cdk7^{lox/lox}* ont été croisées avec des souris exprimant la Cre recombinaise inducible par le Tamoxifène, exprimée sous la dépendance du promoteur du gène *PLP* (protéine protéolipidique). Cela permet une expression spécifique de la Cre recombinaise dans les cellules de Schwann, uniquement en présence de Tamoxifène. On obtient donc un modèle de souris avec un génotype *PLP^{CreERT/+} Cdk7^{lox/lox}* (dénommées iKO dans la suite de ce travail) et leurs congénères contrôles *PLP^{+/+} Cdk7^{lox/lox}*. Toutes les expérimentations ont été approuvées par le Comité d'Éthique pour l'utilisation des animaux de laboratoire de l'Université de Liège.

3.2. Prélèvements :

Après sacrifice par dislocation cervicale, les souris sont placées en position ventrale et disséquées sous binoculaire. Un morceau de queue est prélevé pour génotypage. Les nerfs sciatiques sont délicatement séparés des tissus avoisinants et prélevés en respectant des repères anatomiques. Les nerfs sciatiques sont sectionnés d'une part au niveau de l'échancrure sciatique et d'autre part au niveau distal, avant la trifurcation du nerf sciatique en nerf sural, tibial et péronéal. Les nerfs ont ensuite soit été placés dans du milieu de culture pour réaliser les expériences d'explants *ex vivo*, soit dans un Eppendorf et directement

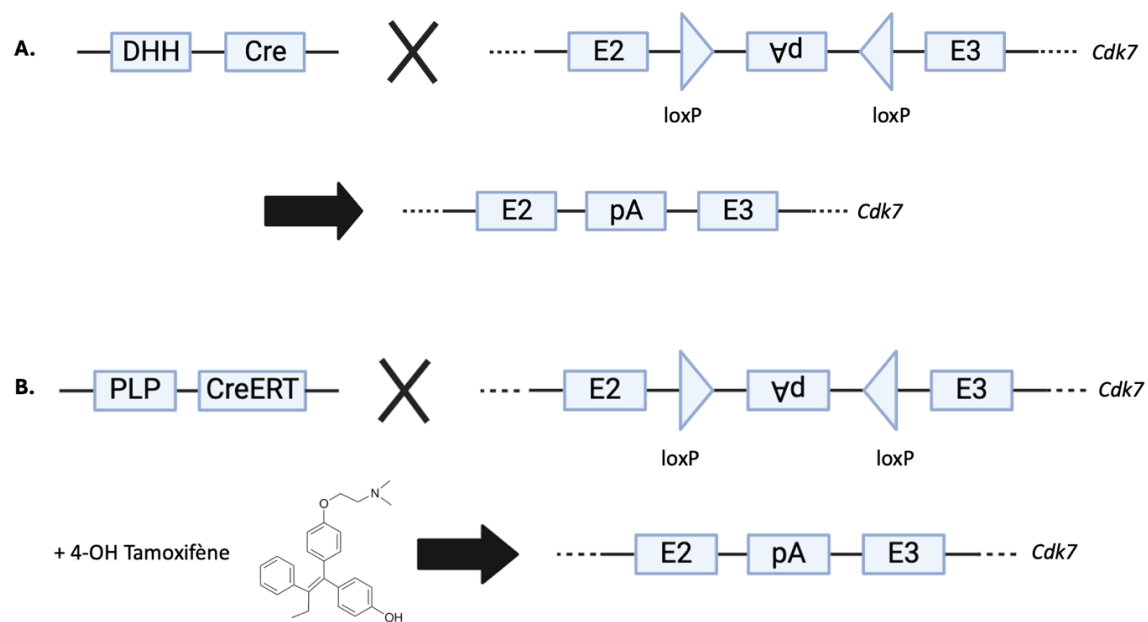


Figure 9: Représentation schématique des modèles in vivo invalidés pour Cdk7. A. Modèle DHH-Cre B. Modèle PLP-CreERT

snap-freezés dans de l'azote liquide pour extraction de protéines, soit directement fixés dans du tampon cacodylate(0,1M)-glutaraldéhyde(2,5%) pour la réalisation de coupes destinées aux colorations au bleu de toluidine.

3.3. Extraction d'ADN et géotypage :

Les morceaux de queues de souris ont été digérés pendant une nuit à 55°C dans du tampon TENS (100mM Tris-HCl pH 8.5, 5mM EDTA, 0,2% SDS, 200mM NaCl) mélangé à de la protéinase K (Promega U302B ; 100µg/ml).

Plusieurs étapes ont permis l'extraction de l'ADN : tout d'abord une précipitation à l'isopropanol à 4°C, ensuite, une centrifugation de 10 minutes à 12 000g et 4°C, puis l'élimination du surnageant et lavage du culot à l'éthanol 70%. Par la suite, le surnageant, obtenu après une nouvelle centrifugation de 10 minutes à 12 000 g et à 4 °C, a également été éliminé. Le culot restant a été séché à l'air libre pour éliminer les résidus d'éthanol, puis resuspendu dans 350 µL d'eau autoclavée.

Chaque tube PCR contient 1µL d'ADN à géotyper et 25µL de mix PCR composé de 5µL de 5X Green GoTaq® Reaction Buffer (Promega, M791A) 2,5µL de dNTPs (Promega U1420 - 2mM), 1,25µL d'amorces (Integrated DNA Technologies ; stock 100µM) (**Annexe 1**), d'eau autoclavée, de 0,125µL de GoTaq® G2 DNA Polymerase (Promega, M7845) ainsi que 0,5µL de MgCl₂ (stock : 25mM). L'amplification de l'ADN s'effectue selon le protocole présenté dans l'**Annexe 2** pour les différents gènes. Une PCR « sexage » est réalisée (pour les souris non sevrées, P6) afin de respecter l'équité mâle/femelle dans les groupes expérimentaux. Une fois le programme de PCR terminé, les ADN amplifiés sont récupérés et chargés sur un gel de 1,5% agarose (Nippon Genetics, AG02) - TBE 1X (VWR, 0658-4L stock : 10X) - Midori green (Nippon Genetics, MG04 ; 1/10 000). La migration est ensuite effectuée à 135 Volts pendant 30 minutes. La révélation est effectuée sur l'ImageQuant LAS 4000 à une longueur d'onde d'excitation de 490nm.

3.4. Western Blot :

Les nerfs sciatiques prélevés chez les souris et snap-freezés, sont stockés à -80°C jusqu'à l'étape d'extraction protéique. A cette fin, ils sont transférés dans 50 à 100 µL de Tampon RIPA (10mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,1% SDS, 1% NP40, 0,1% désoxycholate de sodium, 1mM EDTA, inhibiteurs de phosphatases (« Phosphatase inhibitor cocktail 3 » dilué à 1/100 (Sigma, P0044) et « Phosphatase inhibitor cocktail 2 » dilué à 1/100 (Sigma, P5726)) et

protéases (« cOmplete™ ULTRA Tablets, Mini, EDTA-free, EASYpack Protease Inhibitor Cocktail » 1 tablette pour 10ml de RIPA (Roche, 05892791001) dans des tubes MagNA Lyser (Roche, 03358941001) contenant 10 billes de céramique. La lyse des nerfs est effectuée en plaçant les tubes MagNA Lyser dans l'homogénéisateur broyeur de tissu (Precellys Evolution, Bertin Technologies) à 7400 rpm pendant 1 minute. Après récupération sur glace pendant 20 minutes et une brève centrifugation, le lysat est transféré dans un nouvel Eppendorf avant d'être soniqué durant 4 cycles de 30 secondes puis centrifugé à 15 000 g pendant 10 minutes et à 4°C. Le surnageant contenant les protéines est ensuite récupéré et stocké à -80°C.

Le dosage des protéines se fait via le kit de dosage Pierce BCA Protein Assay Reagent Kit (Thermoscientific, 23227) selon le protocole fourni avec le kit. L'absorbance est mesurée à 562 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Thermoscientific, Multiskan Ascent) et du logiciel « Ascent » (Thermo Electron Corporation). Les échantillons sont ensuite préparés en mélangeant entre 10 et 20 µg de protéines avec du tampon de chargement « Pierce™ Lane Marker Reducing Sample Buffer » (ThermoFisher Scientific, 39000) dilué à 1/5 et de l'eau MilliQ. Les protéines sont dénaturées 5 minutes à 95°C. Les échantillons ainsi que le marqueur de poids moléculaire (PAGERuler Restrained Protein Ladder, Thermoscientific, 26616) sont ensuite chargés dans les puits d'un gel SDS-Page (Acrylamide de 10 à 12%). Après une migration à 80 volts afin de passer le gel de compression, suivie d'une migration à 120-150 Volts, les protéines sont transférées sur une membrane PVDF (polyfluorure de vinylidène) (Roche, 03010040001) pendant 2h à 300mA. La membrane est ensuite bloquée pendant 1 heure dans une solution de lait 10% à température ambiante avant d'être incubée pendant une nuit sous agitation à 4°C avec l'anticorps primaire adéquat (**Tableau 1**). Après 3 lavages de 10 minutes au TTBS (Tween Tris Buffered Saline, 50mM Tris, 0,15M NaCl, Tween 0,1%), la membrane est incubée avec l'anticorps secondaire adéquat (**Tableau 1**) pendant 1h à température ambiante sous agitation. Après 3 lavages de 10 minutes au TTBS, la révélation de la membrane est effectuée soit avec le kit « Pierce™ ECL Western Blotting Substrate » (Thermo Scientific, 32106), soit « ECL Prime Western Blotting Detection Reagents » (Cytiva, RPN2232), soit « SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate » (Thermo Scientific, 34095) et la chemiluminescence est mesurée grâce à l'Amersham ImageQuant 800 (Cytiva).

Pour tester la spécificité des anticorps secondaires, des échantillons protéiques issus de souris wild-type de même âge et aux mêmes concentrations en protéines chargées sur le gel, sont utilisés et incubés uniquement dans l'anticorps secondaire comme contrôles.

Tableau 1 : *Anticorps utilisés pour les Western Blots*

Anticorps	Dilution	Source
Lapin anti-MPZ	1/1000	Abcam, ab31851
Souris anti-Cdk7	1/500	Santa Cruz, sc-7344
Rat anti-MBP	1/500	Millipore, MAB386
Anti-lapin HRP	1/5000	Sigma, NA394
Anti-rat HRP	1/5000	GE Healthcare, NA935V
Anti-souris HRP	1/5000	Santa Cruz, sc-516102
Anti-vinculine HRP	1/1000	Santa Cruz, sc-73614
Anti Beta actine HRP	1/20000	Sigma, A3854

3.5. Lignée cellulaire MSC80 :

La lignée de cellules de Schwann MSC80⁶¹ utilisée dans le cadre de ce mémoire a été fournie par le Dr Anne Baron van Evercooren (Inserm U975, Hopital de la Pitié Salpêtrière, Paris, France). Les cellules sont maintenues dans un milieu de culture composé de DMEM High Glucose (Biowest, L0104-500), 10% de FBS décomplémentarisé (Fetal Bovine Serum ; Gibco, 10270-106) et un mélange de 100 U/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine (Biowest, L0022-100, 1/100), dans un incubateur à une température de 37°C et 5% de CO₂.

3.6. Transduction lentivirale :

Les vecteurs lentiviraux utilisés pour la transduction des cellules MSC80 ont été produits par la plateforme des vecteurs viraux du GIGA à l'Université de Liège. Les plasmides proviennent de VectorBuilder GmbH (**Tableau 2**). 100 000 cellules sontensemencées par puit dans une plaque 24 puits afin d'obtenir une confluence d'environ 40% au moment de la transduction. Ces cellules sont ensuite transduites grâce à l'utilisation de protamine sulfate (MP Biomedicals 0219472901) à une concentration finale de 8µg/ml, en utilisant un MOI de transduction de 200. Après 72 heures, le milieu contenant les virus est remplacé par du milieu classique et si confluentes, les cellules sont passées en flasque T25. Une sélection avec de la puromycine (InvivoGen, ant-pr-1, QLL-44-08) à une concentration de 1,5µg/ml est ensuite réalisée pendant 3 jours. Suite à cette sélection, et après avoir vérifié que les cellules non transduites soient mortes, les cellules sont amplifiées dans le milieu de culture décrit au point 3.5.

Tableau 2 : *shRNAs utilisés pour les infections lentivirales des cellules MSC80*

shRNA	Séquence
Luciférase	5'-TGTCCGGTTATGTAAACAATC-3'
Cdk7-shRNA1	5'-CTGTCCGGTGGAGGCATTAAA-3'
Cdk7-shRNA2	5'-CTTCCCGATTATGTGACATTT-3'
Cdk7-shRNA3	5'-GCTGACACCATCCCACATTAA-3'
Cdk7-shRNA6	5'-CCAACCAAATCGTCGCCATTA-3'

3.7. Inhibiteur de Cdk7 :

L'inhibition de Cdk7 a été effectuée grâce à l'utilisation d'un inhibiteur spécifique, YKL-5-124⁶⁰. Pour ce faire, 200 000 cellules sontensemencées par puit dans une plaque 6 puits. Après une nuit, le milieu est remplacé par du milieu de culture décrit au point 3.5 et 0,1% de DMSO (Sigma-Aldrich, 276855) pour les conditions contrôles ou 250nM de YKL-5-124 dans une concentration finale de 0,1% DMSO pour les conditions traitées. Après 1h, 2h, 24h et 72h les cellules sont rincées 1 fois au PBS sur glace. Afin de réaliser des extractions protéiques, 100µL de tampon RIPA sont ajoutés avant de scrapper les cellules. Afin d'extraire l'ARN, 350 µL de tampon RLT (Quiagen, 74104) + Beta mercaptoéthanol (Sigma, M3148 ; dilution de 1/100) sont ajoutés avant de scrapper les cellules. Les échantillons sont conservés à -80°C jusqu'à l'étape d'extraction.

3.8. Test de prolifération – MSC80 :

L'analyse de la prolifération est réalisée à l'aide de l'Incucyte®SX1 Live-Cell Analysis System (Sartorius). Pour ce faire 5000 cellules sontensemencées par puit dans une plaque 96 puits. Pour suivre précisément l'évolution du nombre de cellules, un marqueur nucléaire fluorescent, le Spy650DNA (Spirochrome, SC501 ; dilution 1/4000) ainsi qu'un marqueur de mort nucléaire, le SYTOX™ Green nucleic acid stain (Invitrogen, S7020 ; dilution 1/5000), sont ajoutés dans le milieu de culture après que les cellules aient adhéré. Afin de pouvoir vérifier la viabilité cellulaire, un contrôle positif de mort cellulaire (condition avec milieu classique + 5% DMSO) est ajouté dans la plaque. Les cellules sont ensuite placées dans l'Incucyte®SX1 Live-Cell Analysis System (Sartorius) pendant 72h, durant lesquelles une image est capturée toutes les 3h, permettant d'observer la fluorescence ainsi que la morphologie des cellules. L'analyse est effectuée avec le logiciel « Live-Cell Imaging & Analysis Software » (Sartorius).

L'analyse de la prolifération cellulaire a été effectuée pour les cellules MSC80 traitées ou non avec l'inhibiteur YKL-5-124 comme décrit au point 3.7. Elle a également été testée pour les cellules MSC80 transduites avec les shRNA dirigés contre Cdk7 ou la luciférase (tel que décrit au point 3.6).

3.9. Extraction d'ARN et RT-qPCR :

L'extraction d'ARN des cellules MSC80 a été réalisée avec le kit « RNeasy Mini Kit » (Quiagen, 74104) et la transcription inverse a été réalisée avec le kit « RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit » (Thermo Scientific, 01168489), en suivant les protocoles fournis avec ces kits. Après la transcription inverse, les ADN complémentaires (ADNc) obtenus sont conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation. Un volume identique de chaque échantillon d'ADNc est utilisé pour réaliser une gamme étalon, utilisée pour vérifier l'efficacité de chaque amplification. Cette gamme est réalisée par dilution sériée et comporte 7 concentrations différentes : 40ng, 20ng, 10ng, 5ng, 2,5ng, 1,25ng d'ADNc et un échantillon négatif uniquement composé d'eau nucléase-free.

Chaque amplification est réalisée sur une quantité de 10ng d'ADNc dans un volume de 4µL, mélangé à un mix réactionnel composé de 5µL de GoTaq® qPCR Master Mix 2X (Promega, A600A) et 1µL de mix de primers sens/antisens (concentration stock de 3µM) (**Tableau 3**).

Les différentes étapes de l'amplification réalisée sur le LightCycler 480 (Roche) comprennent une préincubation à 95°C pendant 10 minutes, suivie de 45 cycles d'amplification (10 secondes à 95°C suivies de 45 secondes à 60°C pour chaque cycle). Une courbe de fusion a systématiquement été réalisée afin de vérifier la spécificité des amorces utilisées.

La quantification relative a été réalisée en utilisant la méthode de Plaffl et l'expression de chaque gène a été normalisée par rapport à celle de deux gènes de référence, la *β-actine* et la *HPRT*.

Tableau 3 : Amorces utilisées pour les PCR quantitatives

Gène	Sens	Anti-sens
<i>Krox-20</i>	5'-CAGGAGTGACGAAAGGAA -3'	5'-ACCAGAGGCTGAAGACTG -3'
<i>C-Jun</i>	5'-TTGAAAGCGCAAACTCC -3'	5'-CTGCTGCGTTAGCATGAGTT -3'
<i>Oct 6</i>	5'-GTTCTCGCAGACCACCATCT -3'	5'-GTCTCCTCCAGCCACTTGTT -3'
<i>Egr1</i>	5'-CACCTGACCACAGAGTCCTTT -3'	5'-GGGAGAAGCGGCCAGTATAG -3'
<i>Hes1</i>	5'-CACCGGACAAACCAAAGACG-3'	5'-GGAATGCCGGGAGCTATCTT-3'
<i>Notch 1</i>	5'-ACAGTGCAACCCCTGTATG-3'	5'-TCTAGGCCATCCCCTCACA-3'
<i>GAPDH</i>	5'-GTATCCGTTGTGGATCTGACA-3'	5'-GCCTGCTTCACCACCTTCTTG-3'
<i>β-actine</i>	5'-GAGCGCAAGTACTCTGTG-3'	5'-AAGGGTGTAACCGCAGC-3'
<i>HPRT</i>	5'-TGCTGACCTGCTGGATTA-3'	5'-TTATGTCCCCCGTTGACT-3'

3.10. Cultures primaires de cellules de Schwann :

Les nerfs sciatiques et les plexus brachiaux ont été prélevés chez des souris DHH-Cre âgées de 8 jours sous hotte à flux horizontal. Une fois sectionnés, les nerfs sont directement placés dans du milieu Leibovitz's L15 (Gibco, 11415-049) sur glace, afin d'y être nettoyés en enlevant la graisse, le sang, l'épinèvre et le périnèvre. Les nerfs sont ensuite transférés dans un mélange contenant de la trypsine (SAFC, 85450C ;2mg/ml) et de la collagénase (Worthington, LS004176 ; 300 U/ml) dans du milieu sans Ca^{2+} et Mg^{2+} (10% de solution de Krebs (133mM NaCl, 177mM KCL, 1,75mM NaH_2PO_4), 1% de solution de MEM contenant des acides aminés non essentiels (Gibco, 11130-051), 0,5% de solution de Phénol rouge (Sigma-Aldrich, P0290), 0,2% de NaHCO_3 et 0,2% de glucose). Ils sont digérés dans l'incubateur pendant une heure puis triturés à l'aide d'une pipette P1000 puis P100 avant d'ajouter 2ml de milieu de culture composé de « DMEM low glucose + glutamate + pyruvate » (Biowest, 21885025), 5% de sérum de cheval (Gibco, 26050-088) et un mélange de 100 U/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine (Biowest, L0022-100, 1/100), afin d'inactiver les enzymes. Après transfert dans un tube de 15ml et centrifugation à 260g pendant 10 minutes, le culot de cellules est resuspendu dans 1 ml de milieu de culture défini. Ce milieu est composé de 50% de F-12 (Gibco, 11765-054), 50% de « DMEM low glucose + glutamate + pyruvate » (Biowest, 21885-025), 2mM de glutamine (Sigma, G3126), 0,035% de BSA (Sigma, A7979), 16µg/ml de Putrescine (Sigma, P5780), 100 µg/ml de transférine (Sigma, T1283), 400ng/ml de T4(L-Thyroxine) (Sigma, T1775), 60ng/mL de progestérone (Sigma, P0130), 10^{-6}M d'Insuline (Sigma, I9278), 38ng/ml de Dexaméthasone (Sigma, D8893), 10,1ng/ml de T3(L-Thyronine) (Sigma, T6397), 160ng/ml de sélénium (Sigma, S5261), 0,5% de Sérum de cheval

décomplémentarisé (Gibco-Encompass, 16-050-130) et un mélange de 100 U/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine (Biowest, L0022-100). Ces cellules ont ensuite été utilisées pour réaliser des tests de démyélinisation tel que décrit au point 3.11.

3.11. Tests de démyélinisation :

Des plaques 24 puits sont remplies de lamelles en verre coatées pendant 1 nuit à température ambiante avec de la poly-L-lysine à une concentration de 0,5mg/ml (Sigma, P1274), avant d'être rincées 3 fois à l'eau stérile puis séchées. Un deuxième coatage est effectué avec une goutte de 15µL de laminine (Sigma, L2020 ; stock 1-2mg/ml, dilution 1/50 dans du milieu composé de DMEM low glucose et de Sérum de cheval 5%) incubée pendant minimum 1h à 37°C. Cette goutte est ensuite aspirée extemporanément avant d'y déposer une goutte de 15µL de suspension cellulaire contenant 5000 cellules. Par la suite, les cellules sont soit directement fixées après adhésion de 2h, soit 485µL de milieu défini est ajouté et les cellules sont fixées après 5 jours et 10 jours en culture (75% du milieu de culture est remplacé tous les 2 jours). Les cellules sont fixées au paraformaldéhyde à 4% pendant 15 minutes avant d'être rincées 3 fois au PBS. Les plaques 24 puits sont ensuite conservées de manière hermétique à 4°C, emballées dans du parafilm, jusqu'à la réalisation des immunomarquages.

3.12. Immunocytochimies :

Les immunocytochimies ont été réalisées sur les lamelles obtenues au point 3.11. Après une heure de blocage à température ambiante, dans un tampon composé de 5% de sérum normal d'âne (Jackson ImmunoResearch, 017-000-121), 0,25% de Triton™ X-100 (Sigma, T8787) et de PBS, les lamelles sont incubées pendant une nuit à température ambiante avec les anticorps primaires (**Tableau 4**), dilués dans la solution de blocage. Elles sont ensuite rincées 3x5 minutes au PBS puis incubées 2h à température ambiante à l'obscurité avec les anticorps secondaires (**Tableau 4**), dilués dans la solution de blocage. Après 3 nouveaux rinçages de 5 minutes au PBS, les lamelles sont incubées 5 minutes avec une solution de DAPI (Sigma, D9542 ; stock à 1mg/ml) à une dilution 1/10 000 dans de l'eau MilliQ. Après 3 rinçages au PBS et un rinçage à l'eau MilliQ, les lamelles sont montées au Safemount (QPath, 00647520) sur des lames SuperFrost™ (Epredia, J1800AMNZ). Les images ont ensuite été réalisées sur un microscope Zeiss Imager Z1 à un grossissement 20X. 10 champs distincts recouvrant l'entièreté de chaque lamelle ont été imagés et quantifiés.

Tableau 4 : *Anticorps utilisés pour les immunocytochimies*

Anticorps	Dilution	Source
Lapin anti-S100	1/500	Dako, ZO311
Rat anti-MBP	1/250	Merck Millipore, MAB386
Anti-lapin Alexa Fluor 555	1/500	Invitrogen, A31572
Anti-rat Alexa Fluor 488	1/500	Invitrogen, A21208

3.13. Explants de nerfs :

3.13.1. DHH-Cre :

Après prélèvement des nerfs sciatiques chez des souris âgées de 60 jours sous hotte à flux horizontal, en utilisant les repères anatomiques décrits au point 3.2, ceux-ci sont soit mis en culture soit fixés directement dans du tampon cacodylate 0, 1M glutaraldéhyde 2,5% (LADD Research Industries, 20100 ; stock 70%) pendant 2h à 4°C (contrôles au temps 0) avant d'être placés dans du tampon cacodylate à 4°C, jusqu'à leur enchâssement en résine. Dans les deux cas, les nerfs sont nettoyés et ajustés à une longueur de 5mm dans du milieu Leibovitz L15 (Gibco, 11415 049). Si mis en culture, les nerfs sont transférés dans du milieu de culture composé de DMEM F12 (Gibco, 31331-028), de N2 (Gibco, 17502-048) dilué à 1/100 et d'un mélange de 100 U/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine (Biowest, L0022-100, 1/100), pendant 4 jours. Ceux-ci seront ensuite processés comme décrit ci-dessus. Avant enchâssement en résine les nerfs sont rincés 2x10 minutes dans du tampon cacodylate, puis placés 30 minutes dans de l'osmium 2% à 4°C avant un nouveau rinçage de 2x10 minutes au tampon cacodylate. Deux rinçages de 10 minutes à l'eau MilliQ à 4°C sont réalisés après le dernier rinçage au tampon cacodylate avant déshydratation progressive des nerfs dans des bains d'alcools successifs : (1) 10 minutes à 30% d'éthanol à 4°C, (2) 10 minutes à 70% d'éthanol à 4°C (3) une nuit à 70% d'éthanol à 4°C, (4) 10 minutes à 90% d'éthanol à température ambiante, (5) 3 fois 20 minutes à 100% d'éthanol à température ambiante. La dernière étape avant l'enchâssement dans de l'épon, une résine hydrophobe, consiste à immerger les nerfs 2x10 minutes dans du propylène oxyde. Les nerfs sont ensuite enchâssés dans une résine d'épon en passant par des mélanges d'épon/propylène oxyde de proportions croissantes en épon : (1) 1 heure dans un mélange à proportion 50/100 d'épon et de propylène oxyde, (2) 1h30 dans un mélange à proportion 100/100, (3) 2 heures dans un mélange à proportion 200/100, (4) une nuit complète dans un bain d'épon pur. La résine est ensuite solidifiée pendant minimum 48h à 60°C. Finalement, des coupes transversales de nerfs sciatiques de

1µm d'épaisseur (semi-fines) seront réalisées grâce à l'ultra microtome Leica Ultracut UTC (Leica Microsystems).

3.13.2. PLP-CreERT :

La réalisation d'explants de nerfs issus de souris PLP-CreERT suit le même protocole que celui décrit au point 3.13.1. La seule différence étant qu'après prélèvement, les nerfs sont placés dans du milieu de culture composé de DMEM F12 (Gibco, 31331-028), de N2 (Gibco, 17502-048) dilué à 1/100, et de 4-OH Tamoxifène, dilué dans de l'éthanol absolu, à une concentration finale de 1µM pendant 48h afin d'invalider *Cdk7*. Après ces 48h, les nerfs sont transférés dans du milieu sans 4-OH Tamoxifène dans lequel ils resteront 4 jours. Ensuite, un nerf est récupéré et snap-freezé dans de l'azote liquide pour effectuer une extraction protéique tandis que l'autre nerf est fixé.

3.14. Coloration au bleu de Toluidine :

Les coupes semi-fines de nerf sciatique sont colorées avec une solution de Bleu de Toluidine (Merck, 1.15930 ; concentration finale de 0,5%) pendant 10 à 15 secondes sur plaque chauffante, permettant de mettre les gaines de myéline en évidence. Après rinçage à l'eau de ville, et séchage, les coupes sont montées avec du Safemount (QPath, 00647520). Les images recouvrant les surfaces complètes des nerfs ont été réalisées sur un microscope Olympus AX-70, à un grossissement de 40x.

3.15. Statistiques :

Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes \pm écart-types. Les comparaisons de deux conditions sont réalisées à l'aide de tests t de Student non appariés ou de tests de Mann Whitney. Des ANOVA à un ou deux facteurs sont utilisés afin de réaliser les comparaisons multiples. La normalité a été vérifiée via les tests de Shapiro-Wilk et de Kolmogorov-Smirnov. Toutes les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism (version 10.1.1) * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$, **** = $p < 0,0001$

Résultats

4. Résultats :

4.1. Validation du modèle DHH-Cre :

Pour rappel, le modèle de souris DHH-Cre permet d'invalider le gène *Cdk7* de manière spécifique dans les cellules de Schwann, sans invalidation dans les oligodendrocytes. Ainsi, afin de valider ce modèle, une analyse de l'expression de *Cdk7* a été effectuée par Western Blot. Celle-ci a été réalisée sur des extraits protéiques de nerfs sciatiques murins totaux, prélevés au 6ème jour de vie (P6), chez des individus WT et cKO. Les résultats obtenus ont permis de mettre en évidence une diminution significative ($p = 0,0012$) de l'expression de *Cdk7* au jour 6 (**Figure 10**). Cela permet donc d'affirmer que dans ce modèle DHH-Cre, *Cdk7* a bien été invalidé.

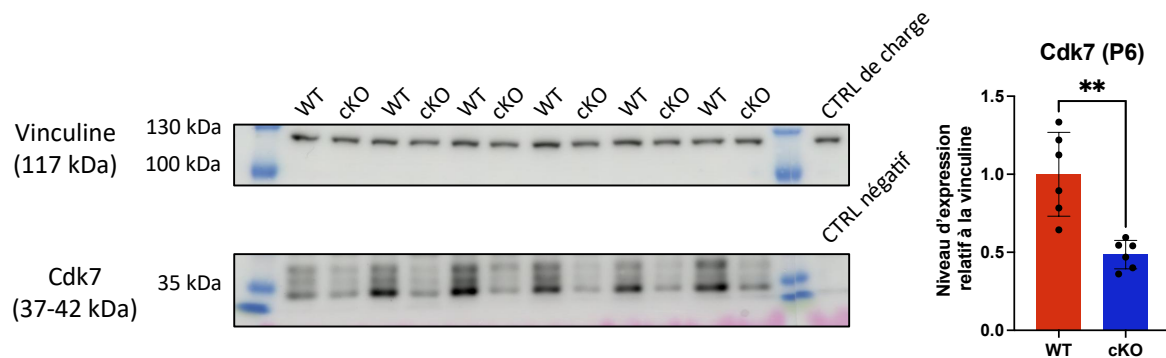


Figure 10 : Analyse de l'expression de *Cdk7* sur extraits protéiques de nerfs sciatiques totaux de souris DHH-Cre à P6 par Western Blot. Comparaison de l'expression de *Cdk7* chez des individus cKO par rapport aux WT. Test t de Student non apparié ($p = 0,0012$). La normalité a été vérifiée dans les 2 groupes par les tests de Shapiro-Wilk et Kolmogorov-Smirnov. $N = 6$ par génotype. Les données sont exprimées en moyenne \pm écart-type. (** = $p < 0.01$)

4.2. Implication de Cdk7 dans l'expression de protéines de la myéline :

L'expression de deux protéines de la myéline, MPZ et MBP, a été étudiée dans le modèle de souris DHH-Cre chez des individus WT et cKO. L'analyse de leur expression a été réalisée à 3 âges différents : P6, âge où la différenciation des cellules de Schwann et la myélinisation sont en cours dans les nerfs sciatiques murins, P28 lorsque la différenciation est terminée et P60 quand la myélinisation est achevée.

4.2.1. P6 :

A P6, une tendance à la diminution est observée pour l'expression de la protéine MPZ chez les individus cKO par rapport aux WT lorsqu'on normalise par rapport à l'expression de la vinculine ($p = 0,15$). Cette tendance se confirme lorsque la normalisation est effectuée par rapport à l'expression de la β -actine. En effet, dans ce cas, une diminution significative de l'expression de MPZ ($p = 0,0114$) est observée chez les individus cKO par rapport aux WT (**Figure 11A-B**).

Plusieurs isoformes de la protéine de la myéline MBP sont connues (21,5kDa, 18,5kDa, 17kDa, 14kDa). Néanmoins, seules les expressions des isoformes de 18,5 et 17kDa montrent une diminution significative chez les cKO comparés aux WT en normalisant par rapport à l'expression de la vinculine. Alors qu'une forte tendance est observée pour l'isoforme de 21,5kDa ($p = 0,0609$), cette diminution n'est pas significative pour l'isoforme de 14kDa ($p = 0,1943$) (**Figure 11A-C**).

Lorsque la quantification de l'expression des différents isoformes de MBP est réalisée en normalisant par rapport à l'expression de la β -actine, on observe une diminution significative de toutes les isoformes chez les cKO par rapport aux WT (**Figure 11A-C**).

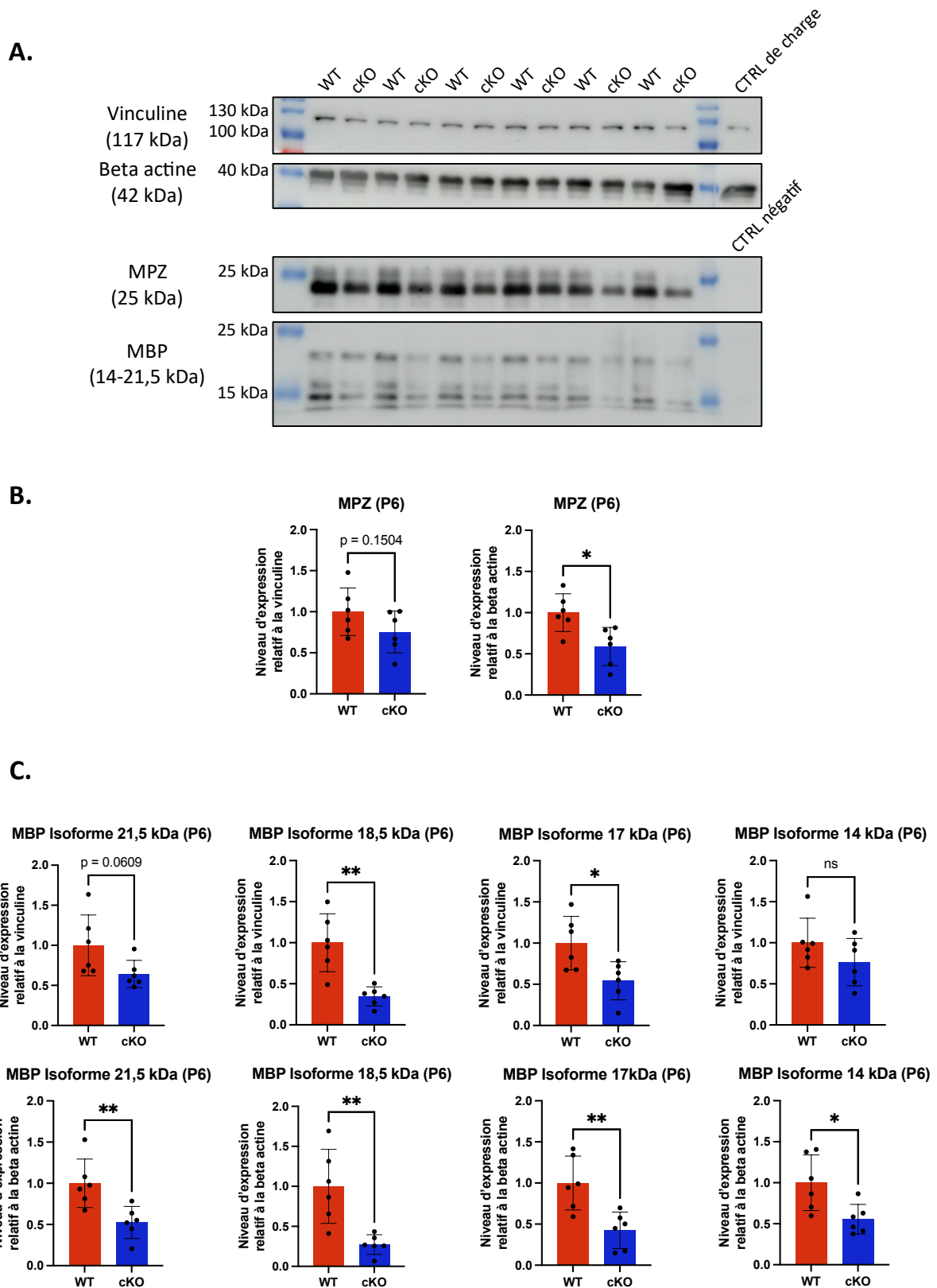


Figure 11 : Analyse de l'expression de MPZ et MBP sur des extraits protéiques de nerfs sciatiques totaux de souris DHH-Cre à P6 par Western Blot. A. Images représentatives des bandes obtenues. **B.** Comparaison de l'expression de MPZ chez des individus WT et cKO, normalisée par rapport à l'expression de la vinculine et de la β -actine. Normalisation par rapport à la vinculine : Test t de Student non apparié ($p = 0,1504$). Normalisation par rapport à la β -actine : Test t de Student non apparié ($p = 0,0114$). La normalité a été vérifiée par les tests de Shapiro-Wilk et de Kolmogorov-Smirnov. $N = 6$ par génotype. **C.** Comparaison de l'expression des différentes isoformes de MBP chez des individus WT et cKO, normalisée par rapport à l'expression de la vinculine et de la β -actine. Test t de student non apparié. $N = 6$ par génotype. La normalité a été vérifiée dans tous les groupes par les tests de Shapiro-Wilk et de Kolmogorov Smirnov. Les données sont exprimées en moyenne \pm écart-type. (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$)

4.2.2. P28 :

A P28, une tendance à la diminution de l'expression de MPZ est observée chez les individus cKO par rapport aux WT ($p=0,0571$) (**Figure 12A-B**).

De manière surprenante, la différence d'expression des différentes isoformes de MBP observée chez les individus à P6 n'est plus aussi marquée à P28. En effet, à P28 on observe uniquement une diminution significative de l'expression de l'isoforme de 14kDa ($p=0,04$), mais aucune différence n'est observée pour les autres isoformes. De plus, la distinction entre l'isoforme de 17kDa et de 18,5 kDa n'est plus possible à partir de P28 (**Figure 12A-C**).

4.2.3. P60 :

Lorsque l'analyse est effectuée à P60, les résultats obtenus vont dans le même sens, l'expression de la protéine MPZ tend à diminuer chez les individus cKO par rapport aux individus WT, mais de manière non significative ($p=0,0988$) (**Figure 13A-B**).

L'analyse de l'expression des différentes isoformes de MBP à P60, indique quant à elle une diminution significative de l'expression des isoformes de 17-18,5 et de 14 kDa ($p=0,0042$ et $0,001$ respectivement), alors que l'expression de l'isoforme de 21,5 kDa ne diminue pas ($p=0,5191$) chez les individus cKO par rapport aux WT (**Figure 13A-C**).

Ces résultats indiquent donc que l'invalidation de Cdk7 chez les souris cKO a un effet au niveau de l'expression de protéines de la myéline, avec une expression de la protéine MPZ qui a tendance à diminuer aux 3 âges étudiés. De plus, ces résultats suggèrent également une diminution de l'expression de certaines isoformes de MBP dans les nerfs sciatiques de souris invalidées pour l'expression de Cdk7 dans les cellules de Schwann.

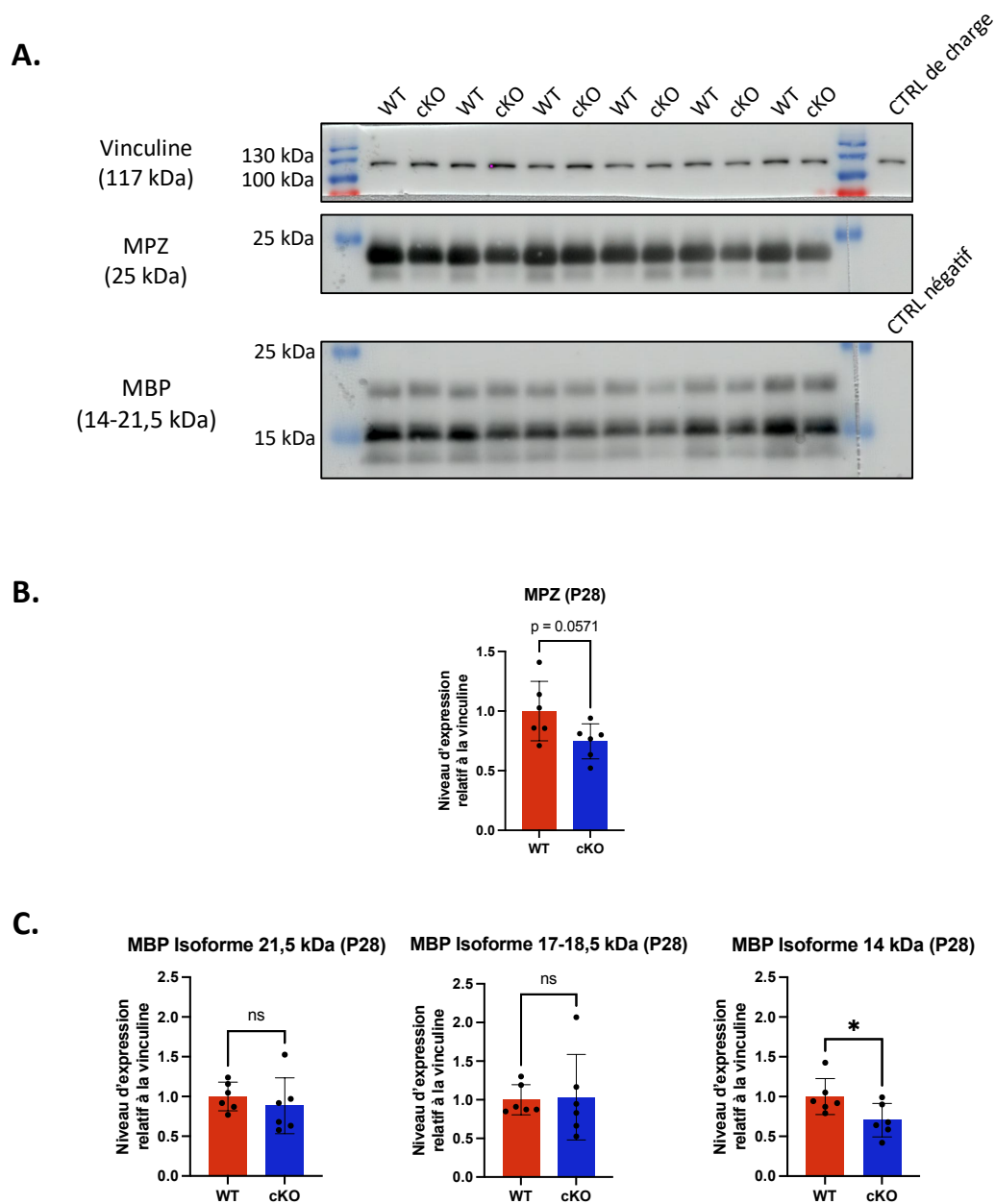


Figure 12 : Analyse de l'expression de MPZ et MBP sur des extraits protéiques de nerfs sciatiques totaux de souris DHH-Cre à P28 par Western Blot. **A.** Images représentatives des bandes obtenues. **B.** Comparaison de l'expression de MPZ chez des individus WT et cKO, normalisée par rapport à l'expression de la vinculine. Test t de Student non apparié ($p = 0,0571$). La normalité a été vérifiée par les tests de Shapiro-Wilk et de Kolmogorov-Smirnov. $N = 6$ par génotype. **C.** Comparaison de l'expression des différentes isoformes de MBP chez des individus WT et cKO, normalisée par rapport à l'expression de la vinculine. Test t de student non apparié. $N = 6$ par génotype. La normalité a été vérifiée dans tous les groupes par les tests de Shapiro-Wilk et de Kolmogorov Smirnov. Les données sont exprimées en moyenne \pm écart-type. (* = $p < 0.05$)

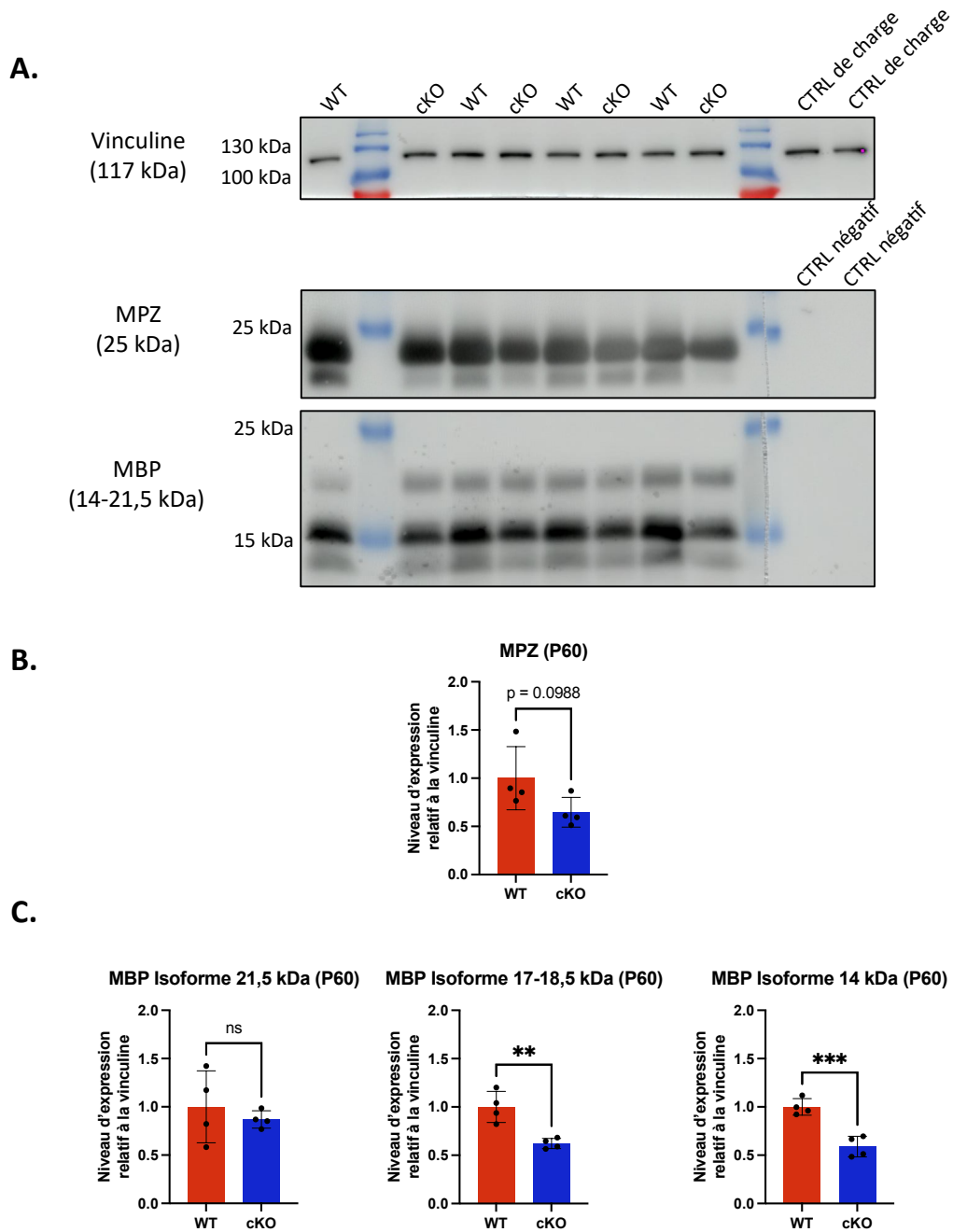


Figure 13 : Analyse de l'expression de MPZ et MBP sur des extraits protéiques de nerfs sciatiques totaux de souris DHH-Cre à P60 par Western Blot. **A.** Images représentatives des bandes obtenues. **B.** Comparaison de l'expression de MPZ chez des individus WT et cKO, normalisée par rapport à l'expression de la vinculine. Test t de Student non apparié ($p = 0,0988$). La normalité a été vérifiée par le test de Shapiro-Wilk. $N = 4$ par génotype. **C.** Comparaison de l'expression des différentes isoformes de MBP chez des individus WT et cKO, normalisée par rapport à l'expression de la vinculine. Test t de student non apparié. $N = 4$ par génotype. La normalité a été vérifiée dans tous les groupes par le test de Shapiro-Wilk. Les données sont exprimées en moyenne \pm écart-type. (** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$)

4.3. Étude de l'effet de l'invalidation de Cdk7 dans la démyélinisation :

4.3.1. Le nombre d'axones correctement myélinisés diffère-t-il, après lésion chez des individus cKO par rapport aux individus WT ?

Afin d'investiguer le rôle de Cdk7 dans le phénomène de démyélinisation post-lésionnelle, des explants *ex vivo* de nerfs sciatiques de souris DHH-Cre (WT et cKO) ont été réalisés à P60. L'aire totale de la section transversale des nerfs sciatiques a été quantifiée, pour les nerfs directement fixés après prélèvement (T0), ainsi que pour les nerfs ayant été maintenus 4 jours en culture (T4). L'analyse des mesures obtenues ne met aucune différence en évidence, ni à T0, ni à T4, chez les individus cKO par rapport aux individus WT (respectivement, $p=0,8546$ et $p=0,1517$) (**Figure 14A**).

Parmi l'ensemble des gaines de myéline, colorées grâce au Bleu de Toluidine, seul le nombre de gaines de myéline intactes a été quantifié, pour les nerfs à T4, chez les individus WT et cKO. La quantification a été réalisée sur la surface totale de la section de nerf transversale colorée au Bleu de Toluidine.

Les gaines de myélines qui ont été considérées comme normales ont été sélectionnées selon différents critères : n'étant pas des ovoïdes de démyélinisation, ne présentant pas d'invagination ou d'évagination, ni de décompaction au niveau de la gaine (coloration uniforme de celle-ci), ayant une gaine continue sur tout le périmètre (pas de cassures), épaisseur similaire sur tout le périmètre.

Cette quantification n'a pas permis de mettre en évidence une différence du nombre de gaines de myélines intactes dans les nerfs sciatiques des individus WT et cKO, après 4 jours de dégénérescence en culture ($p=0,5368$) (**Figure 14B-C**).

La même expérience a été réalisée sur des nerfs sciatiques prélevés sur des souris PLPcreERT (WT et iKO), et traités pendant 48h au 4-OH Tamoxifène *in vitro*. Afin de vérifier l'invalidation de Cdk7, un Western Blot a été réalisé. Les résultats obtenus n'ont pas permis de mettre en évidence une diminution significative de l'expression de Cdk7 chez les individus iKO par rapport aux WT ($p=0,7723$)(**Figure 20-Annexe 3A**).

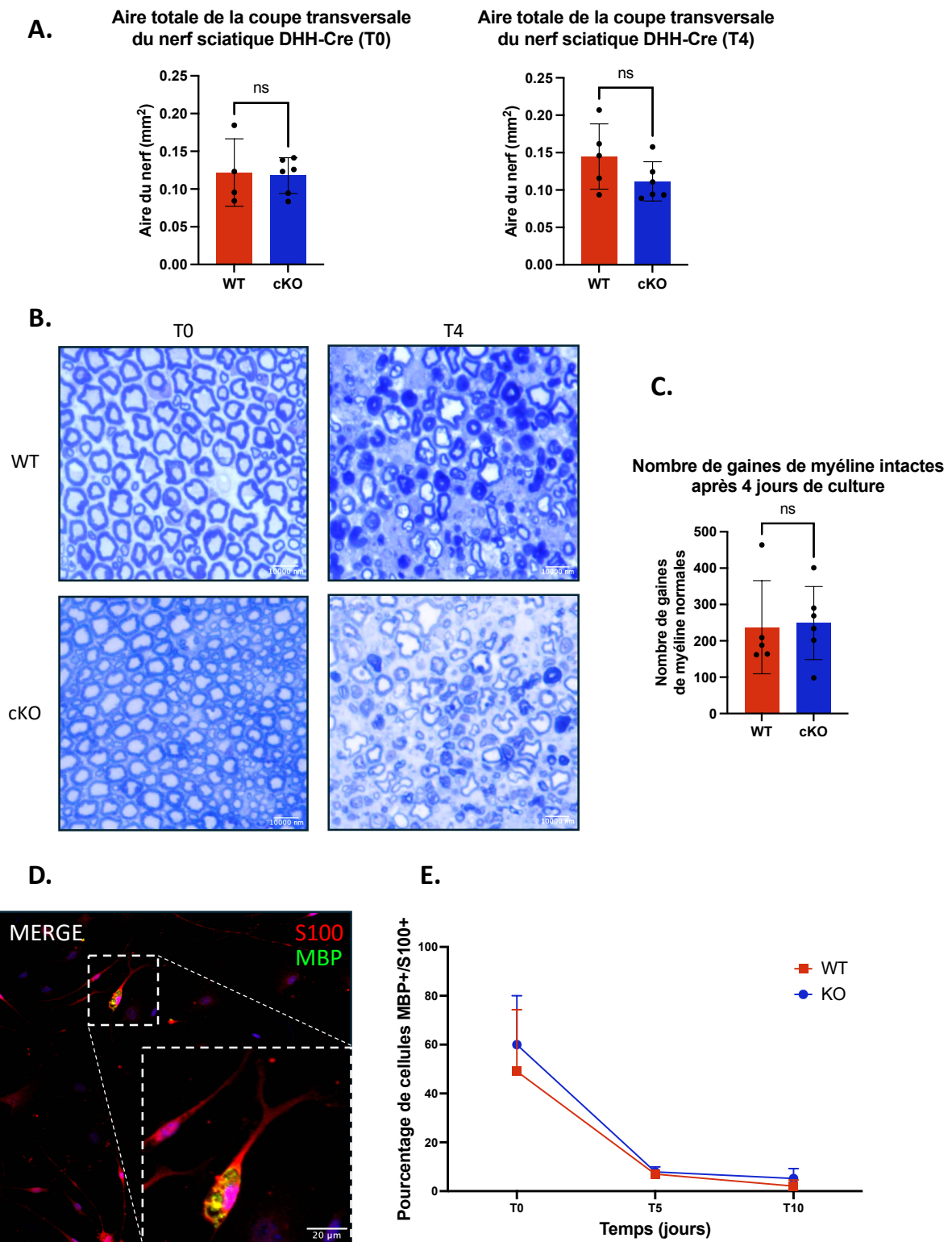


Figure 14 : Explants de nerfs et test de démyélinisation. A-C. Images représentatives de colorations au Bleu de Toluidine réalisées sur des coupes semi fines d'explants de nerfs sciatiques provenant de souris DHH-Cre WT et cKO, directement après prélèvement (T0) ou après 4 jours en culture (T4). A. Quantification de la surface totale du nerf en coupe transversale à T0 et à T4. Test t de student. La normalité a été vérifiée dans tous les groupes par les tests de Shapiro-Wilk et de Kolmogorov-Smirnov. N=4 pour WT à T0, N=6 pour cKO à T0, N=5 pour WT à T4, N=6 pour cKO à T4. B. Images représentatives d'une partie de coupe transversale de nerf sciatique, à T0 et T4, de souris WT et cKO. Grossissement 40X. C. Quantification du nombre de gaines de myéline intactes, sur l'entièreté de la surface du nerf en coupe transversale, après 4 jours de culture chez les individus WT et cKO. Test de Mann-Whitney. La normalité a été vérifiée dans tous les groupes par le test de Shapiro-Wilk et le test de Kolmogorov-Smirnov. N=5 pour les WT et N=6 pour les cKO. D-E. Tests de démyélinisation sur cellules de Schwann primaires de souris DHH-Cre à P8. D. Illustration de l'immunocytochimie S100 (rouge) /MBP (vert) sur des cellules de Schwann primaires isolées des nerfs sciatiques et trigéminaux de souris DHH-Cre à P8. Grossissement 10X. E. Pourcentage de cellules de Schwann (S100 positives) exprimant MBP chez les individus WT et cKO après différents temps de culture. ANOVA 2 avec comparaisons multiples réalisées par le test de Sidak. N=3 par génotype. Les données sont exprimées en moyenne \pm écart type.

Après 48h de traitement au 4-OH Tamoxifène (1 μ M), les nerfs sciatiques sont maintenus 4 jours supplémentaires en culture avant d'être fixés et colorés au Bleu de Toluidine. Le comptage des gaines de myéline intactes après 6 jours en culture (T6) a également été réalisé. Les résultats obtenus n'ont pas permis de mettre en évidence une différence du nombre gaines de myéline intactes dans les explants de nerfs iKO par rapport aux WT ($p=0,5111$) (**Figure 20-Annexe 3B**). De la même manière que pour les explants de nerfs de souris DHH-Cre, la surface totale de la coupe transversale du nerf a été mesurée. Celle-ci n'a pas montré de différence significative chez les individus iKO par rapport aux WT ($p=0,0784$) (**Figure 20-Annexe 3C**).

4.3.2. Fonction de Cdk7 sur la vitesse de démyélinisation *in vitro* :

Afin de mettre en évidence un rôle potentiel de Cdk7 dans la cinétique de démyélinisation des cellules de Schwann, dans des conditions mimant un environnement post lésionnel, des tests de démyélinisation ont été réalisés sur des cellules de Schwann primaires de souris DHH-Cre à P8. Pour ce faire, des immunocytochimies mettant en évidence S100 (marqueur spécifique des cellules de Schwann) et MBP (protéine de la myéline) (**Figure 14D**) ont été réalisées après adhésion des cellules (T0), après 5 jours (T5) et après 10 jours (T10) en culture. A chaque timing, une quantification du nombre de cellules de Schwann exprimant MBP (S100+/MBP+) a été réalisée en calculant la moyenne du nombre de cellules positives sur 10 champs distincts pour chaque individu. Les résultats obtenus n'ont pas montré de différence dans la vitesse de démyélinisation chez les individus cKO par rapport aux individus WT aux timing analysés, ($p=0,9891$ à T10) (**Figure 14E**).

Ensemble ces résultats suggèrent qu'aux différents timings étudiés ici, un rôle de Cdk7 dans la démyélinisation des cellules de Schwann après une lésion nerveuse ne peut pas être mis en évidence.

4.4. Rôle de Cdk7 dans des cellules de Schwann en conditions non différenciées :

4.4.1. Déplétion de Cdk7 dans une lignée de cellules de Schwann MSC80 par utilisation de shRNA :

La lignée cellulaire MSC80 a été transduite avec des vecteurs lentiviraux, afin d'invalider l'expression de *Cdk7* grâce à des shRNA (tel que décrit au point 3.6). Une confirmation de l'invalidation a été effectuée par transcription inverse suivie d'une PCR quantitative (RT-qPCR). Les résultats obtenus montrent une diminution significative, d'environ 50%, de l'expression de l'ARN messager de *Cdk7* pour 2 des 4 shRNA testés lors de la transduction (shRNA3 ($p=0,028$) et shRNA6 ($p=0,0171$)) par rapport à la condition contrôle (shRNA dirigé contre la luciférase, shLuc). Les shRNA1 et shRNA2 n'ont pas montré de diminution significative de l'expression de *Cdk7* par rapport au contrôle (**Figure 15A**).

Un Western Blot a également été réalisé afin de valider la diminution d'expression de *Cdk7* au niveau protéique. Les résultats obtenus indiquent une diminution de l'expression de *Cdk7*, également d'environ 50%, pour les shRNA3 ($p=0,1968$) et shRNA6 ($p=0,2329$), mais celle-ci n'est pas significative. De même, les shRNA1 et shRNA2 n'ont pas montré de différence significative au niveau de l'expression protéique de *Cdk7* par rapport au shLuc contrôle (**Figure 15B**). La condition RFP représentée sur la figure est une condition de contrôle de transduction dans laquelle les cellules expriment la RFP (Red Fluorescent Protein).

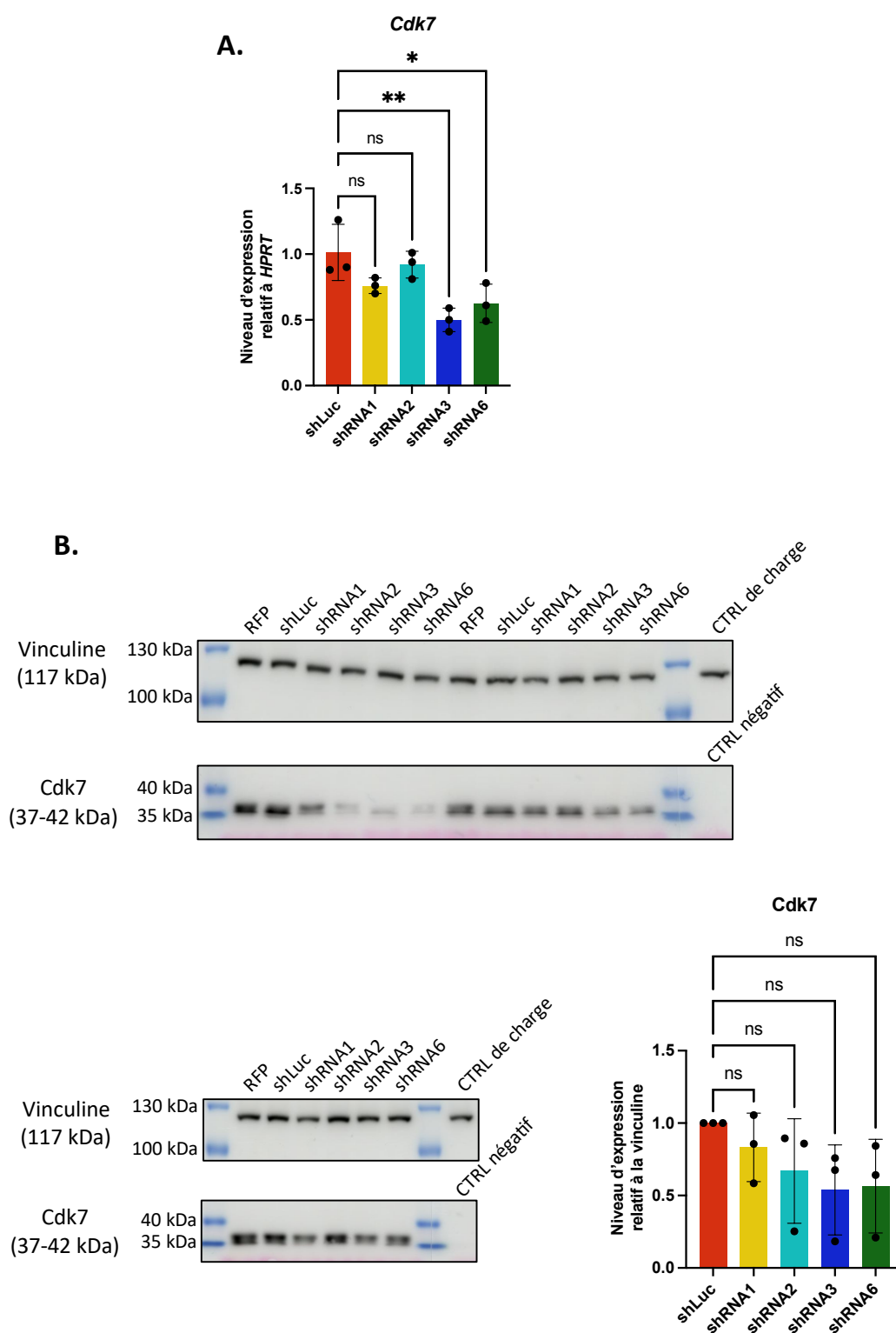


Figure 15 : Validation de la déplétion de Cdk7 dans des cellules MSC80 par shRNA. **A.** Analyse par RT-qPCR de l'expression relative de *Cdk7* par rapport à l'expression du gène de référence *HPRT*. Anova 1 avec comparaisons multiples réalisées par le test de Dunnet. N=3 par condition. (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$). Les données sont exprimées en moyenne \pm écart-type. **B.** Analyse par Western Blot de l'expression protéique relative de Cdk7 par rapport à la vinculine. ANOVA 1 avec comparaisons multiples réalisées par le test de Dunnet. N=3 par condition. Les données sont exprimées en moyenne \pm écart-type.

4.4.1.1. Implication de Cdk7, dans les MSC80, sur l'expression de gènes impliqués en conditions post lésionnelles :

Puisque Cdk7 est capable d'agir au niveau transcriptionnel, nous avons étudié l'expression de différents gènes dans les cellules MSC80 transduites. Nous avons vérifié l'expression relative des ARN messagers de 6 gènes par RT-qPCR : **Krox20** (impliqué dans la myélinisation par les cellules de Schwann)⁶², **c-Jun** (sur-exprimé après lésion, dans les cellules de Schwann réparatrices dédifférenciées)⁵⁴, **Egr1** (exprimé par les cellules de Schwann non myélinisantes et surexprimé après lésion)⁶³, **Notch1** (impliqué dans la prolifération des cellules de Schwann immatures pendant le développement, l'inhibition de la myélinisation et la dédifférenciation après lésion)⁴⁰ et **Hes1** (cible de la voie Notch et exprimé après lésion)^{64,65}. Les quantifications ont été effectuées uniquement pour les cellules transduites par les shRNA3 et shRNA6, ayant montrés une diminution significative de l'expression de Cdk7 au niveau de l'ARN messenger. Les résultats obtenus n'indiquent pas de différence significative pour l'expression des différents gènes étudiés, ni en condition shRNA3, ni shRNA6, par rapport à la condition contrôle transduite par le shLuc (**Figure 16**). En raison de l'inefficacité de l'invalidation de Cdk7 au niveau protéique, les résultats obtenus ici doivent être interprétés avec prudence.

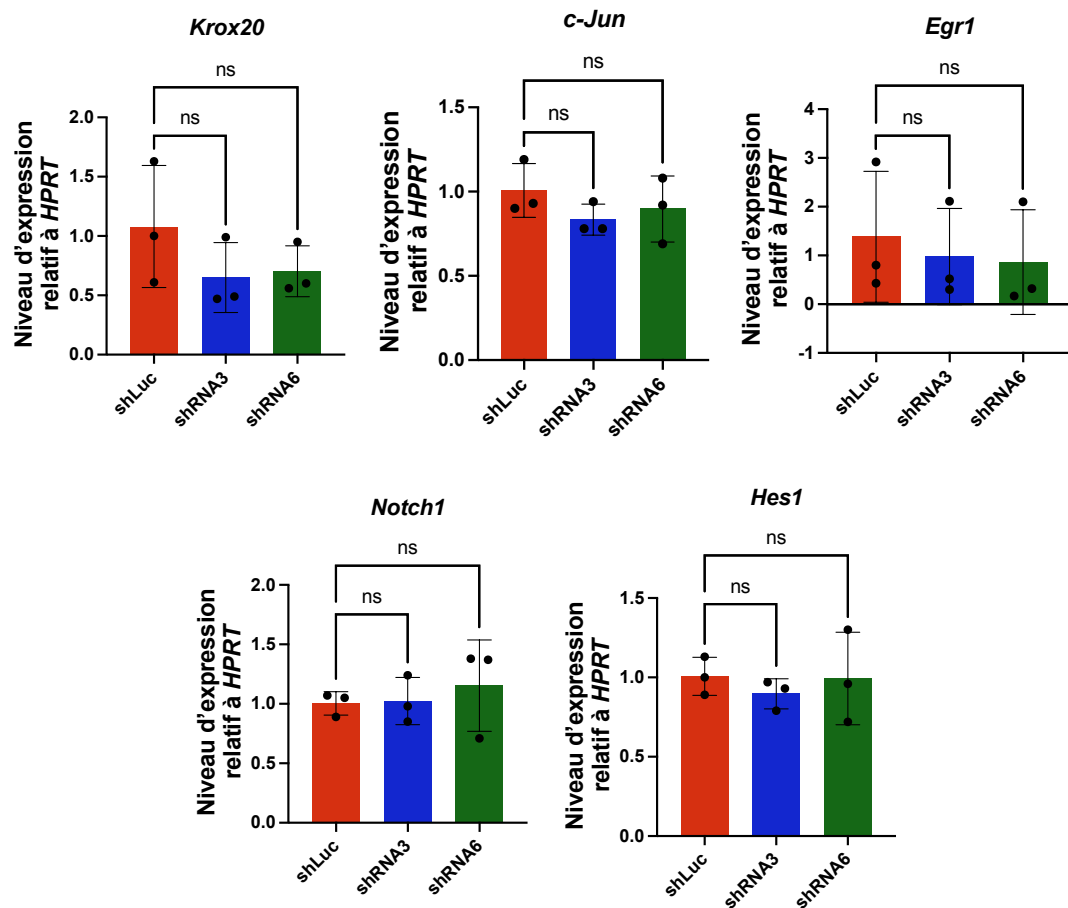


Figure 16 : Quantification par RT-qPCR de l'expression en ARN messager de *Krox20*, *c-Jun*, *Egr1*, *Notch1* et *Hes1*. Expression relative des gènes par rapport à l'expression du gène de référence *HPRT*. ANOVA 1 avec comparaisons multiples effectuées par le test de Dunnett. N=3 par condition. Les mêmes résultats ont été obtenus en normalisant l'expression par rapport au gène de référence de la β -actine. Les données sont exprimées en moyenne \pm écart-type.

4.4.1.2. Rôle de Cdk7 dans la prolifération des MSC80 :

Étant donné que Cdk7, au sein du complexe CAK, peut moduler la progression du cycle cellulaire en phosphorylant les Cdks 1, 2, 4 et 6, nous nous sommes intéressés à l'impact que pourrait avoir son invalidation au niveau de la prolifération cellulaire dans les cellules MSC80 transduites. Aucune différence significative n'a été observée dans le nombre de cellules après 72h pour les cellules transduites par le shRNA3 ($p > 0,99$) par rapport au shLuc. Les cellules shRNA6 quant à elles sont significativement moins nombreuses après 72h par rapport à la condition contrôle shLuc ($p = 0,0203$) (**Figure 17A-C**). De plus, la mortalité cellulaire ne diffère pas pour les cellules en conditions shRNA3 et shRNA6 par rapport aux cellules shLuc. En outre, la mortalité cellulaire de ces 3 groupes est significativement plus faible par rapport au contrôle de mort cellulaire, DMSO 5% ($p < 0,0001$) (**Figure 17B-C**).

Ces résultats montrent donc que la mortalité des MSC80 n'est pas affectée en conditions shRNA3 et shRNA6. Néanmoins, les MSC80 semblent moins proliférer suite à l'invalidation partielle de Cdk7 par le shRNA6.

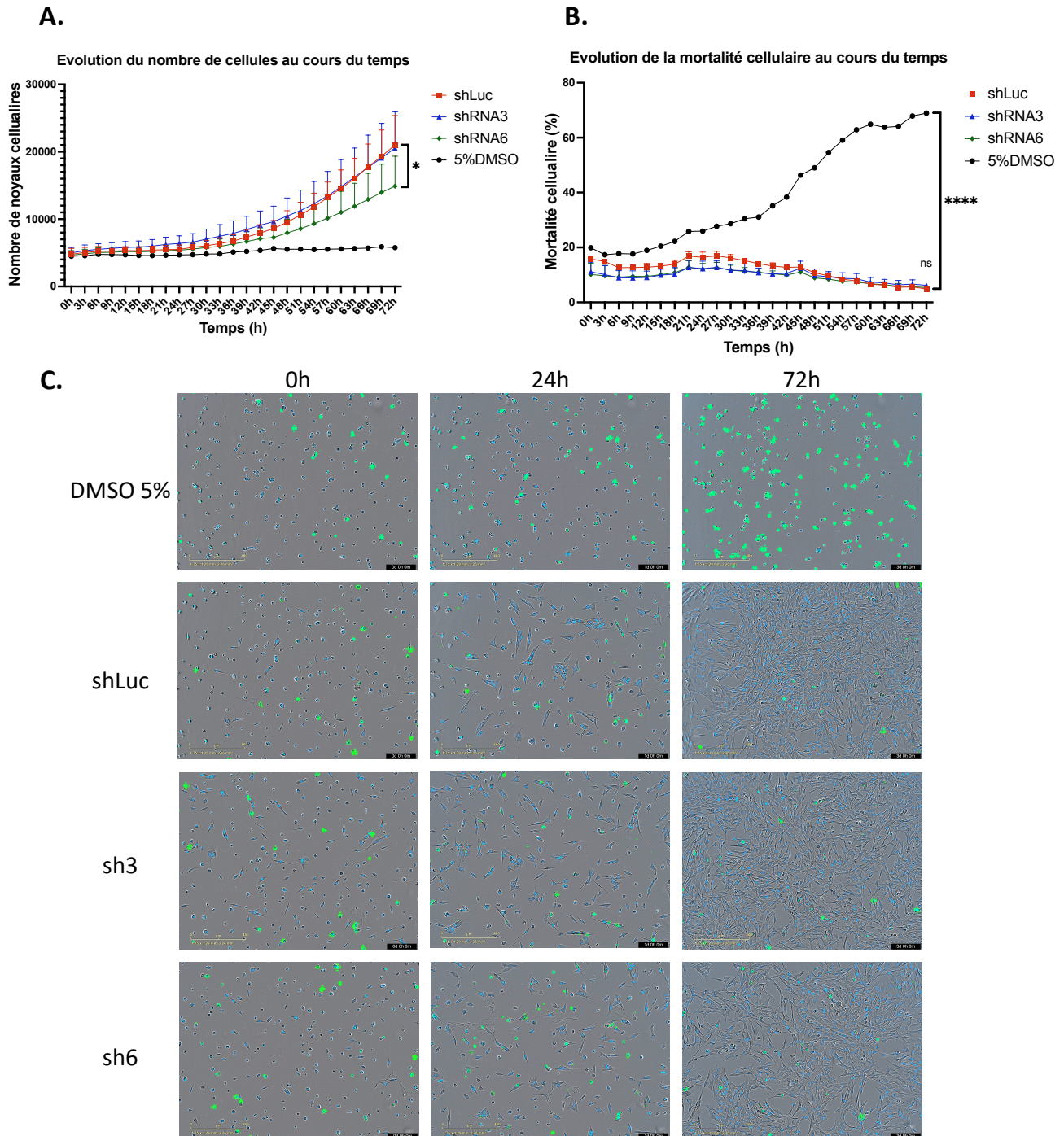


Figure 17 : Test de prolifération sur les cellules MSC80 transduites. A. Évolution du nombre de noyaux cellulaires au cours du temps pour les cellules MSC80 transduites (shLuc, shRNA3, shRNA6). La condition 5% DMSO est utilisée comme contrôle de mort cellulaire. ANOVA 2 avec comparaisons multiples effectuées par le test de Dunnet. N=3 par condition **B.** Évolution de la mortalité cellulaire au cours du temps pour les cellules MSC80 transduites (shLuc, shRNA3, shRNA6) La condition DMSO 5% est utilisée comme contrôle de mort cellulaire. Quantification du rapport entre le nombre de cellules mortes sur le nombre total de noyaux cellulaires. ANOVA 2 avec comparaisons multiples effectuées par le test de Dunnet. N=3 par condition. Les données sont exprimées en moyenne \pm écart-type. **C.** Images représentatives de l'évolution du nombre de cellules au cours du temps, après 0h, 24h et 72h dans toutes les conditions testées. Les noyaux cellulaires sont marqués en bleu et les cellules mortes sont marquées en vert. (* = $p < 0.05$, **** = $p < 0.0001$)

4.4.2. Inhibition de Cdk7 dans les MSC80 par l'inhibiteur spécifique YKL-5-124 :

Puisque la déplétion de Cdk7 par utilisation des shRNA n'était pas supérieure à 50%, ni même significative au niveau protéique, une autre stratégie a été mise en place afin d'étudier l'effet de la perte fonctionnelle de Cdk7. La stratégie choisie a été l'inhibition de Cdk7 en utilisant un inhibiteur spécifique, YKL-5-124.

Une quantification de l'expression relative en ARN messager des mêmes gènes analysés pour les cellules MSC80 transduites (voir point 4.4.1.1) a été réalisée pour les cellules MSC80 traitées à l'YKL-5-124, par RT-qPCR. Celle-ci a été effectuée sur des échantillons traités durant 1h, 2h, 24h et 72h avec l'inhibiteur YKL-5-124 à une concentration de 250nM. Le choix de cette concentration se base sur des résultats obtenus préalablement au laboratoire, démontrant que l'IC₅₀ de YKL-5-124 sur les MSC80 était de 250nM (résultats obtenus par des tests MTT). Les résultats obtenus ont permis de mettre en évidence une diminution significative de l'expression de *c-Jun*, après 2h, dans les cellules traitées comparées aux cellules contrôles non traitées (véhicule) ($p=0,0369$). Une diminution de l'expression de *Krox20*, de plus ou moins 50%, est observée dans les cellules traitées par rapport au contrôle après 1h et 2h de traitement, mais celle-ci n'est pas significative ($p= 0,2239$ et $0,1808$ respectivement). L'expression de *Egr1* diminue également après 1h et 2h de traitement mais de manière non significative ($p= 0,4887$ et $0,2882$ respectivement). L'expression de *Notch1* ne varie pas de manière significative par rapport au contrôle peu importe le temps de traitement par YKL-5-124. *Hes1* quant à lui montre une diminution d'expression d'environ 50% après 2h de traitement mais celle-ci n'est pas significative ($p=0,0954$) (**Figure 18**).

Ces résultats suggèrent donc un effet aigu de l'inhibition de Cdk7 sur l'expression de certains gènes étudiés, avec une variation qui n'est pas stable dans le temps. Après 72h l'ensemble des gènes étudiés semblent avoir retrouvé leur niveau d'expression basal.

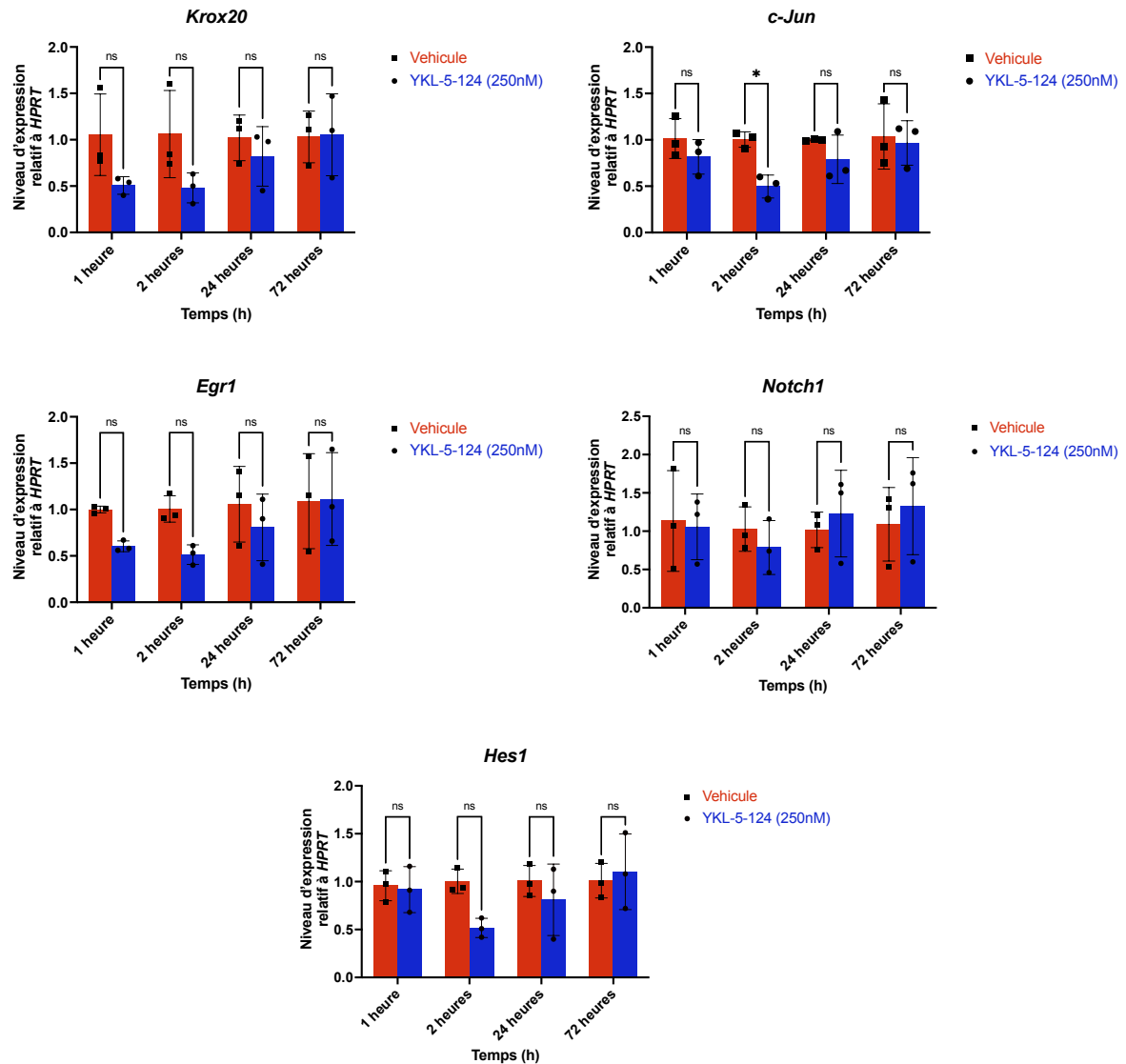


Figure 18 : Quantification par RT-qPCR de l'expression en ARN messager de *Krox20*, *c-Jun*, *Egr1*, *Notch1* et *Hes1* après 1h, 2h, 24h et 72h de traitement avec l'inhibiteur YKL-5-124, à une concentration de 250nM. Expression relative des gènes par rapport à l'expression du gène de référence *HPRT*. ANOVA 2 avec comparaisons multiples effectuées par le test de Sidak. N=3 par condition. Les mêmes résultats ont été obtenus en normalisant l'expression par rapport au gène de référence de la β -actine. Les données sont exprimées en moyenne \pm écart-type. (* = $p < 0.05$)

4.4.2.1. Effet de l'inhibition de Cdk7 sur la prolifération cellulaire des MSC80 :

Les tests de prolifération, effectués sur des cellules MSC80 traitées par YKL-5-124 à une concentration de 250nM, ont permis de mettre en évidence une différence significative dans l'évolution du nombre de cellules au cours du temps. Les cellules traitées par YKL-5-124 prolifèrent moins vite que les cellules contrôles non traitées ($p < 0,0001$) (**Figure 19A-C**). La mortalité cellulaire n'est pas significativement différente chez les cellules traitées par rapport aux cellules contrôles ($p = 0,9995$). En outre, la mortalité cellulaire des MSC80 traitées au YKL-5-124 est significativement plus faible par rapport au contrôle de mort cellulaire, DMSO 5% ($p < 0,0001$) (**Figure 19B-C**).

Ces résultats indiquent que l'inhibition de Cdk7, dans des cellules de Schwann non différenciées, diminue de manière significative leur vitesse de prolifération sans affecter la mortalité cellulaire.

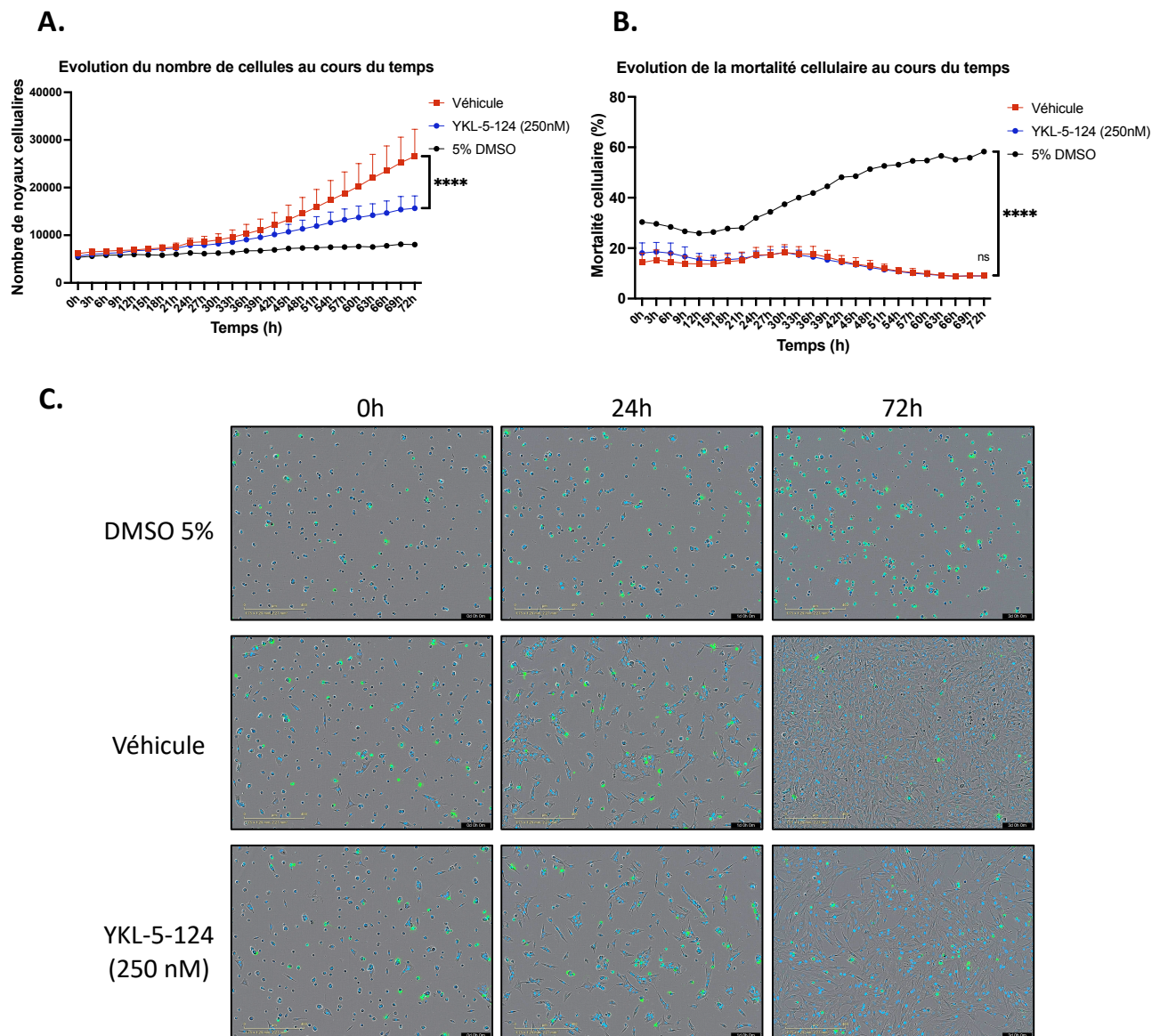


Figure 19 : Test de prolifération sur les cellules MSC80 traitées avec l'inhibiteur de Cdk7, YKL-5-124, à une concentration de 250nM. A. Évolution du nombre de noyaux cellulaires au cours du temps. La condition 5% DMSO est utilisée comme contrôle de mort cellulaire. ANOVA 2 avec comparaisons multiples effectuées par le test de Dunnett. N=3 par condition. **B.** Évolution de la mortalité cellulaire au cours du temps pour les cellules MSC80 traitées et non traitées. La condition DMSO 5% est utilisée comme contrôle de mort cellulaire. Quantification du rapport entre le nombre de cellules mortes sur le nombre de noyaux cellulaires total. ANOVA 2 avec comparaisons multiples effectuées par le test de Dunnett. N=3 par condition. Les données sont exprimées en moyenne \pm écart-type. **C.** Images représentatives de l'évolution du nombre de cellules au cours du temps, après 0h, 24h et 72h dans toutes les conditions testées. Les noyaux cellulaires sont marqués en bleu et les cellules mortes sont marquées en vert. (**** = $p < 0.0001$)

Discussion et Perspectives

5. Discussion et perspectives :

La validation du modèle DHH-Cre permet d'étudier spécifiquement l'effet de l'inactivation de Cdk7 dans les cellules de Schwann, à partir du stade précurseur, au jour embryonnaire E12/E13 (**Figure 10**). Les résultats que nous avons obtenus lors de l'analyse de l'expression de plusieurs protéines de la myéline, indiquent que l'inactivation de Cdk7 jouerait un rôle dans la myélinisation, comme déjà démontré dans le modèle CNP-Cre, et ce dès sa mise en place.

L'intensité et la largeur des bandes obtenues pour l'expression de MBP et de MPZ, pour une même quantité de protéines et avec une acquisition des images identique, semble beaucoup plus importante à P28 et P60 qu'à P6. Malheureusement la façon dont nous avons réalisé l'expérience ne permet pas d'affirmer que l'expression protéique est plus importante aux âges les plus avancés. Il faudrait pour cela charger les échantillons des différents âges, avec la même quantité de protéines, sur un même gel pour pouvoir comparer l'évolution de l'expression des protéines aux différents âges⁶⁶. Néanmoins l'intensité plus forte des bandes et donc de la quantité de protéines de la myéline, pourrait s'expliquer notamment par l'état de myélinisation plus avancé à P28 et P60. En effet, à P6, la myélinisation développementale des cellules de Schwann est en cours même si toutes les cellules n'ont pas encore terminé leur différenciation et toutes ne myélinisent donc pas encore. A P28 toutes les cellules sont différenciées et la myélinisation de celle-ci, toujours en cours, est très avancée. Enfin, l'intensité est la plus forte à P60 lorsque la myélinisation est complètement achevée.

De plus, comme on peut remarquer sur la **figure 12B** certaines isoformes de MBP sont plus exprimées que d'autres. Il a déjà été décrit que les isoformes de 14 et 18,5 kDa sont les formes les plus abondantes qui sont exprimées chez la souris, elles représentent à elles seules plus de 90% de la composition en MBP dans les gaines de myéline⁶⁷. La diminution des protéines MBP et MPZ (représentant respectivement 18% et 50% des protéines totales dans le SNP)⁶⁸ observée chez les individus cKO, indiquerait donc un défaut dans la myélinisation en cas de perte de Cdk7. Dans le modèle CNP-Cre, une diminution significative de la protéine MPZ avait déjà été démontrée. Dans notre cas la diminution obtenue n'est pas significative mais elle tend vers la même conclusion. Une augmentation de la population sur laquelle l'analyse a été effectuée pourrait permettre de mettre en évidence une diminution significative.

Notamment à P60 où le nombre d'échantillons par condition était plus réduit qu'à P6 et P28, dû à une limitation d'échantillons disponibles pour cette expérience.

Une différence est observée entre la normalisation effectuée par rapport à la vinculine et celle réalisée par rapport à la β -actine, pour les Western Blot réalisés à P6 (**Figure 11**). Celle-ci pourrait s'expliquer par une intensité beaucoup plus faible des bandes obtenues pour la vinculine par rapport à celles observées pour la β -actine. Cela pourrait être dû à une plus grande abondance de la β -actine au sein du nerf sciatique que de la vinculine⁶⁹. Cependant, le poids moléculaire de la β -actine étant plus proche de celui des protéines que l'on souhaite étudier, la quantification par rapport à la β -actine pourrait être plus fiable que celle de la vinculine.

Avec les résultats que nous avons obtenus, nous pouvons donc suggérer un effet de l'inactivation de Cdk7 sur la composition protéique de la gaine de myéline.

Les conséquences d'une modification de la composition en protéines de la gaine de myéline peuvent entraîner une déstabilisation de celle-ci et *in fine* la démyélinisation des axones. C'est notamment le cas dans des maladies neurodégénératives, comme la maladie de Charcot-Marie Thoot de type 1, dans laquelle la protéine PMP22 est surexprimée, ou dans un autre sous type de la maladie où le gène *MPZ* est muté et ne permet pas la production de la protéine. Dans les 2 cas cela entraîne une démyélinisation dans les cellules de Schwann et l'apparition de neuropathies sensorielles et motrices^{70,71}

L'étude des protéines de la myéline en immunohistochimie sur des coupes de nerfs sciatiques aurait également été possible, mais celle-ci aurait donné une quantification moins précise de la quantité relative en protéines sur le nerf complet que celle que l'on peut obtenir en Western-Blot.

Dans la mesure où la majorité de la myéline est composée de lipides, il serait donc également intéressant d'investiguer l'impact de la perte d'expression de Cdk7 sur l'expression de ces lipides constituant la gaine. Cependant, l'extraction et l'analyse de la composition lipidique est plus complexe que l'analyse protéique et n'entre pas dans le cadre de ce mémoire. Une autre expérience envisageable, consisterait à réaliser des immunohistochimies sur des coupes de nerfs sciatiques, à P28, lorsque la différenciation des cellules de Schwann est toujours en cours. Cela permettrait d'évaluer si la proportion de cellules de Schwann myélinisantes par rapport aux cellules de Schwann non myélinisantes (respectivement

marquées par Sox10/Krox20 et Sox10/L1) est affectée par l'invalidation de Cdk7 dès le stade précurseur des cellules de Schwann. Cela pourrait permettre de mettre en évidence un éventuel effet de Cdk7 sur l'étape de différenciation des cellules de Schwann.

Nous nous sommes intéressés au rôle potentiel de Cdk7 dans la vitesse de démyélinisation, qui survient dans un nerf après lésion, en utilisant un modèle d'explant de nerf sciatique *ex vivo*. L'analyse du nombre de gaines de myéline intactes qui sont présentes au sein des explants de nerfs après 4 jours de culture n'a montré aucune différence entre les individus WT et cKO dans le modèle DHH-Cre (**Figure 14A-B**). Cependant, l'analyse que nous avons effectuée aurait pu être plus complète et robuste. En effet, il aurait été plus judicieux d'effectuer la quantification du nombre de gaines de myéline intactes à T0, chez les individus WT et cKO, afin de vérifier qu'aucun biais n'était déjà observable à ce moment. Il aurait été intéressant de normaliser notre analyse par rapport au nombre de gaines normales à T0 puisque comme décrit plus haut, l'invalidation de Cdk7 dans les cellules de Schwann altère la myélinisation, en affectant l'expression de protéines de la myéline. Ce phénotype pourrait être associé à une proportion différente de fibres normalement myélinisées par rapport au nombre de fibres totales, dans les nerfs des individus cKO par rapport aux WT à T0. En plus d'une quantification de la densité d'axones myélinisés et de la proportion d'axones associés à une gaine de myéline anormale, le calcul du G ratio (rapport entre le diamètre axonal interne sur le diamètre total de l'axone entouré de la gaine de myéline) en fonction du diamètre axonal, pourrait également être réalisé dans le but de voir si certains diamètres de fibres peuvent être plus touchés par une hypomyélinisation que d'autres. En raison d'un manque de temps, ces analyses n'ont malheureusement pas pu être réalisées dans le cadre de ce mémoire. De plus, si nous avions pu observer une différence au niveau du nombre de gaines de myélines anormales avec apparition de plus d'ovoïdes de démyélinisation à T4 chez les cKO par rapport aux WT, cela aurait pu laisser penser que la vitesse de démyélinisation était plus rapide⁷², créant un environnement favorable à la réparation de la gaine^{73,74} plus rapidement après lésion.

Afin de s'affranchir du biais existant au départ, quant à une éventuelle différence du nombre de fibres normalement ou anormalement myélinisées, ainsi qu'une densité de gaines potentiellement différente chez les individus cKO par rapport aux WT à T0, nous avons réalisé des explants sur le modèle de souris iKO, PLPCreERT. Malheureusement les résultats obtenus

pour l'invalidation de Cdk7 en Western Blot n'ont pas permis d'obtenir de différence significative de l'expression de Cdk7 chez les individus iKO par rapport aux individus WT (**Figure 20 Annexe 2A**). À partir de ce constat, les conclusions tirées de l'analyse de la surface totale du nerf, ou de la quantification du nombre de gaines de myéline intactes après six jours de culture, où aucune différence significative n'a été observée, pourraient simplement s'expliquer par l'absence d'invalidation de Cdk7 dans ce modèle. Une augmentation du nombre d'individus dans l'expérience est nécessaire pour pouvoir mettre en évidence une éventuelle différence d'expression de Cdk7 dans les explants iKO. Néanmoins une optimisation du protocole d'invalidation sera certainement nécessaire également.

Une autre hypothèse pourrait être que l'invalidation n'a pas été efficace après 48h de traitement au 4-OH tamoxifène en raison d'une concentration trop faible de ce dernier, ou encore que l'invalidation, n'étant que partielle dans les cellules de Schwann, était trop faible pour être observée en Western-Blot sur des extraits de nerfs complets dans lesquels les cellules de Schwann ne représentent qu'environ 60% des cellules totales⁷⁵.

Une autre méthode que nous aurions pu mettre en œuvre, pour vérifier que la recombinaison avait bien eu lieu, aurait été de réaliser des croisements de souris PLP-CreERT avec des souris rapportrices exprimant, par exemple, la YFP. Après ajout de tamoxifène, en cas de recombinaison efficace, une expression de YFP aurait pu être observée⁷⁶.

Le test de démyélinisation, effectué sur les cellules de Schwann primaires, n'a pas mis en évidence de différence significative dans la vitesse de démyélinisation *in vitro* (**Figure 14D-E**). Il serait nécessaire de réaliser le test avec des timings intermédiaires, après par exemple 1 jour, 3 jours et 7 jours afin d'éventuellement pouvoir observer un effet plus précoce de l'invalidation de Cdk7 sur la perte de myéline dans les cellules de Schwann. Puisque l'on sait que la réponse des cellules de Schwann suite à une lésion, est mise en place très rapidement et que 50% de la myéline est déjà dégradée après 5 à 7 jours⁵⁷.

Bien qu'aucune différence majeure n'ait pu être mise en évidence dans l'expression des différents gènes étudiés dans les cellules transduites, une des hypothèses pourrait être que l'invalidation par shRNA n'est pas assez efficace. En effet, l'analyse par RT-qPCR de l'expression de l'ARNm de *Cdk7* nous permet d'observer une diminution d'uniquement 50% de celle-ci, ce qui pourrait être insuffisant pour observer un effet majeur (**Figure 15**). Les quantifications des

RT-qPCR ont également été réalisées sur un deuxième gène de ménage, la *β-actine*, avec laquelle les mêmes résultats sont obtenus. De plus, l'analyse de l'expression protéique de *Cdk7* dans ces cellules n'a pas permis de montrer de différence significative par rapport aux cellules contrôles, ce qui pourrait également expliquer qu'aucun effet ne soit observable. L'utilisation d'autres séquences de shRNA, d'un protocole de transduction différent, ou d'une autre approche pour invalider *Cdk7* dans les cellules pourraient être intéressants afin d'avoir une plus forte invalidation que celle obtenue ici. L'effet pourrait peut-être également être aigu, observable juste après l'invalidation de *Cdk7* dans la cellule et celle-ci pourrait avoir mis en place des phénomènes compensatoires par la suite, ce qui pourrait expliquer qu'aucune différence ne soit observée dans l'expression génique.

En ce qui concerne la prolifération, celle-ci est diminuée chez les cellules transduites par rapport au contrôle, ce qui indiquerait éventuellement un effet à long terme de la perte de *Cdk7* sur le fonctionnement du cycle cellulaire mais pas sur la transcription (**Figure 17**). Cependant, dans notre cas cette différence de prolifération n'est visible que pour les cellules transduites par le shRNA6 et non pas pour le shRNA3 alors que tous deux avaient montré une diminution d'expression de *Cdk7*. Ce résultat doit donc être validé en utilisant d'autres séquences de shRNA afin de pouvoir affirmer un effet sur la prolifération des cellules de Schwann.

L'utilisation d'un inhibiteur de *Cdk7*, quant à lui, a montré un effet significatif sur la prolifération des cellules, qui est réduite lorsque *Cdk7* est inhibée (**Figure 19**). Cette observation est en accord avec les résultats d'études menées sur des cellules cancéreuses, avec mise en évidence d'une sortie du cycle cellulaire en phase G1 pour rentrer en sénescence lors de l'inhibition de *Cdk7*⁷⁷. Puisque l'inhibition de *Cdk7* diminue la prolifération, nous pourrions émettre comme hypothèse qu'une surexpression de *Cdk7*, après lésion nerveuse, dans les cellules de Schwann, pourrait permettre une meilleure prolifération de celles-ci et donc une mise en place plus rapide de la réparation de la gaine de myéline. Il pourrait donc être intéressant de tester un modèle de souris, chez lesquelles une surexpression de *Cdk7* serait possible de manière inductible après lésion, afin de voir quelles sont les conséquences fonctionnelles de cette surexpression et si celle-ci pourrait améliorer la vitesse ainsi que l'efficacité de la régénération. Cependant, des risques pourraient également liés à une

surexpression de *Cdk7*. En effet, elle pourrait induire une trop forte prolifération des cellules de Schwann, ce qui pourrait mener au développement de tumeurs bénignes appelées Schwannomes qui peuvent, même si elles ne sont pas cancéreuses, entraîner des problèmes par compression des nerfs et des tissus ce qui pourrait générer des douleurs⁷⁸.

Une tendance générale est observée sur l'expression des gènes étudiés (**Figure 18**), après traitement par YKL-5-124, avec une diminution de l'expression de ceux-ci après 2h de traitement avant de voir une ré-augmentation afin de retrouver un niveau basal après 72h, suggérant une adaptation des cellules à l'inhibition de *Cdk7*. D'autres Cdk pourraient compenser le rôle de *Cdk7* sur le fonctionnement de la transcription comme les Cdk8 ou 9²¹. Une diminution de l'expression de *c-Jun* est observée et celle-ci pourrait signifier une atténuation du phénotype et des capacités réparatrices des cellules de Schwann après inhibition de *Cdk7*, malgré que son invalidation n'ait pas d'effet significatif sur le développement des nerfs ou sur la fonction nerveuse à l'âge adulte⁵⁴. *Krox20*, quant à lui, en tant que facteur de transcription pro myélinisant, subit une diminution de son expression après lésion, ce qui explique la perte de différenciation des cellules de Schwann vers un phénotype réparateur. *Egr1* est associé aux cellules de Schwann non myélinisantes mais après lésion il est surexprimé dans les cellules de Schwann, on devrait donc logiquement observer une augmentation de son expression⁴². *Hes1* quant à lui qui est une cible de Notch devrait suivre la même tendance que ce dernier, ce que l'on observe bien dans ce cas⁶⁵. Dans notre cas l'expression de *Krox 20* semble suivre la même tendance que pour *c-Jun*, ce qui est plutôt surprenant étant donné que *Krox20* est un gène pro-myélinisant alors que *c-Jun* et les autres gènes étudiés sont associés au transcriptome des cellules de Schwann dédifférenciées. Afin de pouvoir tirer une conclusion quant à l'effet de l'invalidation de *Cdk7* sur l'expression des différents gènes étudiés, il est nécessaire d'augmenter la population sur laquelle est réalisée l'analyse.

Dans ce cas-ci la diminution bien que non significative observée pour la majorité des gènes étudiés après 2h pourrait s'expliquer, par le fait que l'inhibition de *Cdk7*, en plus d'empêcher la prolifération normale des cellules, pourrait également réduire l'activité transcriptionnelle dont elle est responsable au sein du complexe TFIIH. Cette réduction de l'activité pourrait n'être que transitoire, puisque l'on sait que d'autres Cdk peuvent également

agir sur l'ARN polymérase 2 et donc éventuellement compenser la perte fonctionnelle de Cdk7 sur la transcription.

Nous aurions pu effectuer toutes nos recherches directement sur des cultures primaires de cellules de Schwann. Cependant, nous aurions été limités au niveau de la quantité de cellules que nous aurions pu obtenir, et par conséquent la quantité d'ARN ou de protéines recueillies, alors que la validation de la déplétion de Cdk7 nécessite déjà une quantité de protéines élevée. De plus, la manipulation de ces cellules est plus complexe que l'utilisation de la lignée cellulaire MSC80. En effet, les cellules demandent des conditions de culture beaucoup plus complexes pour leur maintien que les lignées cellulaires. L'utilisation d'une lignée cellulaire n'est pas la solution parfaite. Ces cellules immortalisées peuvent présenter un biais car elles peuvent avoir subi des modifications génétiques et mutations qui les éloignent du phénotype réel des cellules que l'on souhaite étudié, ce qui ne serait pas le cas en utilisant des cultures primaires comme cela a déjà été décrit pour d'autres types cellulaires⁷⁹. Malgré tout, l'utilisation des cultures primaires n'est pas non plus une solution parfaite car après 3 à 4 passages elles changent de phénotype ce qui les rend inutilisables par la suite.

Les perspectives de ce travail pourraient être de continuer à investiguer d'autres caractéristiques des cellules de Schwann réparatrices lorsque Cdk7 est invalidé. Par exemple leur capacité à migrer, puisque l'on sait qu'après lésion les cellules vont devoir migrer afin de s'aligner en bandes de Büngner pour favoriser la remyélinisation. Cette caractéristique pourrait être étudiée par des tests *in vitro* tels que le scratch assay par exemple⁸⁰.

Au-delà des rôles de Cdk7 dans la transcription ou dans la prolifération cellulaire, on pourrait également imaginer des recherches qui se focaliseraient sur l'effet potentiel que pourrait avoir l'invalidation de Cdk7, via les récepteurs nucléaires sur lesquels elle est également capable d'agir. On sait que les récepteurs PPARs, sont impliqués dans la régulation de la synthèse des oligodendrocytes au niveau du SNC et également dans la régulation de l'expression des gènes liés au métabolisme lipidique qui sont importants dans la myélinisation. Il a été mis en évidence que l'activation de certains sous types de PPARs, entraînait une augmentation de l'ARNm de MBP et de la protéine PLP au niveau des oligodendrocytes immatures. Ces récepteurs pourraient donc également jouer un rôle dans la myélinisation au niveau du SNC dans les cellules de Schwann⁸¹

Enfin, la meilleure technique pour étudier les phénomènes post lésionnels serait de réaliser une lésion *in vivo* (ou un écrasement du nerf), puis de laisser la remyélinisation s'effectuer. Des tests fonctionnels permettraient d'évaluer l'efficacité de régénération et de comparer celle-ci chez des souris cKO et WT. La réalisation d'images en microscopie électronique, de coupes de nerfs, permettrait également une meilleure résolution et des informations supplémentaires grâce à l'obtention de l'ultrastructure des nerfs (notamment la proportion des différentes tailles de fibres présentes dans le nerf), l'état de compaction de la gaine de myéline. Le calcul du G ratio, pourrait nous permettre de comparer l'efficacité de remyélinisation entre différentes conditions. Des immunohistochimies pourraient également être réalisées sur des coupes de nerfs remyélinisés, afin de mettre en évidence différents marqueurs au sein des cellules de Schwann. Malheureusement, ces techniques demandent une très grande expertise et de nombreuses connaissances au niveau de la chirurgie chez les souris ce qui est compliqué à mettre en place dans le cadre d'un mémoire.

Bibliographie

6. Bibliographie :

1. Goldstein, B. Anatomy of the Peripheral Nervous System. *Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of North America* **12**, 207–236 (2001).
2. Wolfgram, F. & Kotorii, K. THE COMPOSITION OF THE MYELIN PROTEINS OF THE PERIPHERAL NERVOUS SYSTEM^{1 2}. *Journal of Neurochemistry* **15**, 1291–1295 (1968).
3. Simons, M. & Nave, K.-A. Oligodendrocytes: Myelination and Axonal Support. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **8**, a020479 (2016).
4. Spiryda, L. Myelin protein zero and membrane adhesion. *J. Neurosci. Res.* **54**, 137–146 (1998).
5. Rotshenker, S. Wallerian degeneration: the innate-immune response to traumatic nerve injury. *J Neuroinflammation* **8**, 109 (2011).
6. Malumbres, M. & Barbacid, M. Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends in Biochemical Sciences* **30**, 630–641 (2005).
7. Russell, P. & Nurse, P. Schizosaccharomyces pombe and saccharomyces cerevisiae: A look at yeasts divided. *Cell* **45**, 781–782 (1986).
8. De Bondt, H. L. et al. Crystal structure of cyclin-dependent kinase 2. *Nature* **363**, 595–602 (1993).
9. Malumbres, M. Cyclin-dependent kinases. *Genome Biol* **15**, 122 (2014).
10. Morgan, D. O. CYCLIN-DEPENDENT KINASES: Engines, Clocks, and Microprocessors. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **13**, 261–291 (1997).
11. Lees, E. Cyclin dependent kinase regulation. *Current Opinion in Cell Biology* **7**, 773–780 (1995).
12. Guo, Z. & Stiller, J. W. Comparative genomics of cyclin-dependent kinases suggest co-evolution of the RNAP II C-terminal domain and CTD-directed CDKs. *BMC Genomics* **5**, 69 (2004).
13. Schafer, K. A. The Cell Cycle: A Review. *Vet Pathol* **35**, 461–478 (1998).
14. Witzel, I.-I., Koh, L. F. & Perkins, N. D. Regulation of cyclin D1 gene expression. *Biochemical Society Transactions* **38**, 217–222 (2010).
15. Zhang, X., Song, S. & Peng, W. Cell cycle deregulation in neurodegenerative diseases. *International Journal of Neuroscience* **133**, 408–416 (2023).
16. Evan, G. I. & Vousden, K. H. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* **411**, 342–348 (2001).
17. Sava, G. P., Fan, H., Coombes, R. C., Buluwela, L. & Ali, S. CDK7 inhibitors as anticancer drugs. *Cancer Metastasis Rev* **39**, 805–823 (2020).

18. Nigg, E. A. Cyclin-dependent kinase 7: at the cross-roads of transcription, DNA repair and cell cycle control? *Current Opinion in Cell Biology* **8**, 312–317 (1996).
19. Teng, Y. *et al.* Recent advances in the development of cyclin-dependent kinase 7 inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry* **183**, 111641 (2019).
20. Ganuza, M. *et al.* Genetic inactivation of Cdk7 leads to cell cycle arrest and induces premature aging due to adult stem cell exhaustion: Cdk7 is essential for cell proliferation. *The EMBO Journal* **31**, 2498–2510 (2012).
21. Palancade, B. & Bensaude, O. Investigating RNA polymerase II carboxyl-terminal domain (CTD) phosphorylation. *European Journal of Biochemistry* **270**, 3859–3870 (2003).
22. Lolli, G. & Johnson, L. N. CAK—Cyclin-Dependent Activating Kinase: A Key Kinase in Cell Cycle Control and a Target for Drugs? *Cell Cycle* **4**, 565–570 (2005).
23. Fisher, R. P. Secrets of a double agent: CDK7 in cell-cycle control and transcription. *Journal of Cell Science* **118**, 5171–5180 (2005).
24. Huibregtse, J. M., Yang, J. C. & Beaudenon, S. L. The large subunit of RNA polymerase II is a substrate of the Rsp5 ubiquitin-protein ligase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 3656–3661 (1997).
25. Eick, D. & Geyer, M. The RNA Polymerase II Carboxy-Terminal Domain (CTD) Code. *Chem. Rev.* **113**, 8456–8490 (2013).
26. Korsisaari, N. *et al.* Conditional ablation of the Mat1 subunit of TFIIF in Schwann cells provides evidence that Mat1 is not required for general transcription. *Journal of Cell Science* **115**, 4275–4284 (2002).
27. Dion, V. *et al.* Cyclin-dependent kinase 7 contributes to myelin maintenance in the adult central nervous system and promotes myelin gene expression. *Glia* **70**, 1652–1665 (2022).
28. Compe, E. *et al.* Neurological defects in trichothiodystrophy reveal a coactivator function of TFIIF. *Nat Neurosci* **10**, 1414–1422 (2007).
29. Schwann, T., Smith, H. & Schleiden, M. J. *Microscopical Researches into the Accordance in the Structure and Growth of Animals and Plants*. (Sydenham Society, London, 1847). doi:10.5962/bhl.title.17276.
30. Nave, K.-A. & Werner, H. B. Myelination of the Nervous System: Mechanisms and Functions. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **30**, 503–533 (2014).
31. Hartline, D. K. & Colman, D. R. Rapid Conduction and the Evolution of Giant Axons and Myelinated Fibers. *Current Biology* **17**, R29–R35 (2007).
32. Cohen, C. C. H. *et al.* Saltatory Conduction along Myelinated Axons Involves a Periaxonal Nanocircuit. *Cell* **180**, 311–322.e15 (2020).
33. Brown, A. M., Evans, R. D., Black, J. & Ransom, B. R. Schwann cell glycogen selectively supports myelinated axon function. *Annals of Neurology* **72**, 406–418 (2012).

34. Jessen, K. R. & Mirsky, R. The origin and development of glial cells in peripheral nerves. *Nat Rev Neurosci* **6**, 671–682 (2005).
35. Mirsky, R. & Jessen, K. R. Schwann cell development, differentiation and myelination. *Current Opinion in Neurobiology* **6**, 89–96 (1996).
36. Bolino, A. Myelin Biology. *Neurotherapeutics* **18**, 2169–2184 (2021).
37. Ghislain, J. & Charnay, P. Control of myelination in Schwann cells: a *Krox20* cis - regulatory element integrates Oct6, Brn2 and Sox10 activities. *EMBO Reports* **7**, 52–58 (2006).
38. Fledrich, R., Kungl, T., Nave, K.-A. & Stassart, R. M. Axo-glial interdependence in peripheral nerve development. *Development* **146**, dev151704 (2019).
39. Feltri, M. L., Poitelon, Y. & Previtali, S. C. How Schwann Cells Sort Axons: New Concepts. *Neuroscientist* **22**, 252–265 (2016).
40. Woodhoo, A. *et al.* Notch controls embryonic Schwann cell differentiation, postnatal myelination and adult plasticity. *Nat Neurosci* **12**, 839–847 (2009).
41. Jaegle, M. *et al.* The POU proteins Brn-2 and Oct-6 share important functions in Schwann cell development. *Genes Dev.* **17**, 1380–1391 (2003).
42. Svaren, J. & Meijer, D. The molecular machinery of myelin gene transcription in Schwann cells. *Glia* **56**, 1541–1551 (2008).
43. Zorick, T. S., Syroid, D. E., Brown, A., Gridley, T. & Lemke, G. Krox-20 controls SCIP expression, cell cycle exit and susceptibility to apoptosis in developing myelinating Schwann cells. *Development* **126**, 1397–1406 (1999).
44. LeBlanc, S. E., Ward, R. M. & Svaren, J. Neuropathy-Associated Egr2 Mutants Disrupt Cooperative Activation of Myelin Protein Zero by Egr2 and Sox10. *Molecular and Cellular Biology* **27**, 3521–3529 (2007).
45. Decker, L. *et al.* Peripheral Myelin Maintenance Is a Dynamic Process Requiring Constant *Krox20* Expression. *J. Neurosci.* **26**, 9771–9779 (2006).
46. Salzer, J. L. Schwann Cell Myelination. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **7**, a020529 (2015).
47. Boerboom, A., Dion, V., Chariot, A. & Franzen, R. Molecular Mechanisms Involved in Schwann Cell Plasticity. *Front. Mol. Neurosci.* **10**, (2017).
48. Poitelon, Y., Kopec, A. M. & Belin, S. Myelin Fat Facts: An Overview of Lipids and Fatty Acid Metabolism. *Cells* **9**, 812 (2020).
49. Verheijen, M. H. G., Chrast, R., Burrola, P. & Lemke, G. Local regulation of fat metabolism in peripheral nerves. *Genes Dev.* **17**, 2450–2464 (2003).
50. Eberlé, D., Hegarty, B., Bossard, P., Ferré, P. & Foufelle, F. SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie* **86**, 839–848 (2004).
51. LeBlanc, S. E. *et al.* Regulation of cholesterol/lipid biosynthetic genes by Egr2/Krox20 during peripheral nerve myelination. *Journal of Neurochemistry* **93**, 737–748 (2005).

52. Harty, B. L. & Monk, K. R. Unwrapping the unappreciated: recent progress in Remak Schwann cell biology. *Current Opinion in Neurobiology* **47**, 131–137 (2017).
53. Mirsky, R. *et al.* Novel signals controlling embryonic Schwann cell development, myelination and dedifferentiation. *J Peripheral Nervous Sys* **13**, 122–135 (2008).
54. Arthur-Farraj, P. J. *et al.* c-Jun Reprograms Schwann Cells of Injured Nerves to Generate a Repair Cell Essential for Regeneration. *Neuron* **75**, 633–647 (2012).
55. Jessen, K. R., Mirsky, R. & Lloyd, A. C. Schwann Cells: Development and Role in Nerve Repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **7**, a020487 (2015).
56. Jessen, K. R. & Arthur-Farraj, P. Repair Schwann cell update: Adaptive reprogramming, EMT, and stemness in regenerating nerves. *Glia* **67**, 421–437 (2019).
57. Jessen, K. R. & Mirsky, R. The repair Schwann cell and its function in regenerating nerves. *The Journal of Physiology* **594**, 3521–3531 (2016).
58. Burnett, M. G. & Zager, E. L. Pathophysiology of peripheral nerve injury: a brief review. *FOC* **16**, 1–7 (2004).
59. Brosius Lutz, A. *et al.* Schwann cells use TAM receptor-mediated phagocytosis in addition to autophagy to clear myelin in a mouse model of nerve injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **114**, (2017).
60. Olson, C. M. *et al.* Development of a Selective CDK7 Covalent Inhibitor Reveals Predominant Cell-Cycle Phenotype. *Cell Chemical Biology* **26**, 792–803.e10 (2019).
61. Boutry, J. -M. *et al.* Establishment and characterization of a mouse Schwann cell line which produces myelin in vivo. *J of Neuroscience Research* **32**, 15–26 (1992).
62. Reiprich, S., Kriesch, J., Schreiner, S. & Wegner, M. Activation of *Krox20* gene expression by Sox10 in myelinating Schwann cells. *Journal of Neurochemistry* **112**, 744–754 (2010).
63. Topilko, P. *et al.* Differential regulation of the zinc finger genes *Krox-20* and *Krox-24* (*Egr-1*) suggests antagonistic roles in Schwann cells. *J. Neurosci. Res.* **50**, 702–712 (1997).
64. Cao, Y. *et al.* Gastrodin protects porcine sertoli cells from zearalenone-induced abnormal secretion of glial cell line-derived neurotrophic factor through the NOTCH signaling pathway. *Reproductive Biology* **23**, 100781 (2023).
65. Zhang, S., Wu, W., Yang, K., Chen, Y. & Liu, H. Phenotypic changes of Schwann cells on the proximal stump of injured peripheral nerve during repair using small gap conduit tube. *Neural Regen Res* **12**, 1538 (2017).
66. Müller, C., Hochhaus, N. M., Fontana, X., Luhmann, H. J. & White, R. SncRNA715 Inhibits Schwann Cell Myelin Basic Protein Synthesis. *PLoS ONE* **10**, e0136900 (2015).
67. De Ferra, F. *et al.* Alternative splicing accounts for the four forms of myelin basic protein. *Cell* **43**, 721–727 (1985).

68. Kister, A. & Kister, I. Overview of myelin, major myelin lipids, and myelin-associated proteins. *Front. Chem.* **10**, 1041961 (2023).
69. Gerber, D. *et al.* Transcriptional profiling of mouse peripheral nerves to the single-cell level to build a sciatic nerve ATLAS (SNAT). *eLife* **10**, e58591 (2021).
70. Kamil, K., Yazid, M. D., Idrus, R. B. H., Das, S. & Kumar, J. Peripheral Demyelinating Diseases: From Biology to Translational Medicine. *Front. Neurol.* **10**, 87 (2019).
71. Pennuto, M. *et al.* Ablation of the UPR-Mediator CHOP Restores Motor Function and Reduces Demyelination in Charcot-Marie-Tooth 1B Mice. *Neuron* **57**, 393–405 (2008).
72. Lee, H. K. *et al.* Proteasome inhibition suppresses Schwann cell dedifferentiation *in vitro* and *in vivo*. *Glia* **57**, 1825–1834 (2009).
73. Jungnickel, J., Haase, K., Konitzer, J., Timmer, M. & Grothe, C. Faster nerve regeneration after sciatic nerve injury in mice over-expressing basic fibroblast growth factor. *J. Neurobiol.* **66**, 940–948 (2006).
74. Jha, M. K. *et al.* Macrophage monocarboxylate transporter 1 promotes peripheral nerve regeneration after injury in mice. *Journal of Clinical Investigation* **131**, e141964 (2021).
75. Ittner, E. *et al.* SoxD transcription factor deficiency in Schwann cells delays myelination in the developing peripheral nervous system. *Sci Rep* **11**, 14044 (2021).
76. Boerboom, A., Reusch, C., Pieltain, A., Chariot, A. & Franzen, R. KIAA1199: A novel regulator of MEK/ERK-induced Schwann cell dedifferentiation. *Glia* **65**, 1682–1696 (2017).
77. Wilson, G. A. *et al.* Active growth signaling promotes senescence and cancer cell sensitivity to CDK7 inhibition. *Molecular Cell* **83**, 4078–4092.e6 (2023).
78. Hilton, D. A. & Hanemann, C. O. Schwannomas and Their Pathogenesis. *Brain Pathology* **24**, 205–220 (2014).
79. Lee, J. *et al.* Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines. *Cancer Cell* **9**, 391–403 (2006).
80. Negro, S., Pirazzini, M. & Rigoni, M. Models and methods to study Schwann cells. *Journal of Anatomy* **241**, 1235–1258 (2022).
81. Sandoval-Hernández, A., Contreras, M. J., Jaramillo, J. & Arboleda, G. Regulation of Oligodendrocyte Differentiation and Myelination by Nuclear Receptors: Role in Neurodegenerative Disorders. in *Glial Cells in Health and Disease of the CNS* (ed. Von Bernhardi, R.) vol. 949 287–310 (Springer International Publishing, Cham, 2016).