



**HAL**  
open science

# **Effets neuroprotecteurs et neurorégénérateurs d'un nouveau ligand de TSPO et des canaux potassiques Kv7.2/3 dans le système nerveux périphérique**

Léa El Chemali

## **► To cite this version:**

Léa El Chemali. Effets neuroprotecteurs et neurorégénérateurs d'un nouveau ligand de TSPO et des canaux potassiques Kv7.2/3 dans le système nerveux périphérique. Neurosciences. Université Paris-Saclay, 2023. Français. <NNT : 2023UPASL141>. <tel-04478283>

**HAL Id: tel-04478283**

**<https://theses.hal.science/tel-04478283v1>**

Submitted on 26 Feb 2024

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



HAL Authorization

# Effets neuroprotecteurs et neurorégénérateurs d'un nouveau ligand de TSPO et des canaux potassiques Kv7.2/3 dans le système nerveux périphérique

*Neuroprotective and Neuroregenerative effects of a novel TSPO and voltage-gated potassium channels Kv7.2/3 ligand in the peripheral nervous system*

**Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay**

École doctorale n° 568, Signalisation et réseaux intégratifs en biologie (BIOSIGNE)  
Spécialité de doctorat : Sciences de la santé  
Graduate School : Sciences de la vie et santé  
Réfèrent : Faculté de médecine

Thèse préparée dans l'unité Maladies et Hormones du Système Nerveux (INSERM, Université Paris-Saclay),  
sous la direction de **Liliane MASSADE, DR1, CNRS**  
Et de **Michael SCHUMACHER, DR1, INSERM**

**Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 22 décembre 2023, par**

**Lea EL CHEMALI**

## Composition du Jury

### Membres du jury avec voix délibérative

<b>Fabrice PARKER</b> PU-PH, Université Paris-Saclay (AP-HP)	Président
<b>Fathia NOTHIAS-CHAHIR</b> DR, Sorbonne Université, UPMC (CNRS UMR 8246, Inserm U1130)	Rapporteuse et examinatrice
<b>Vassilios PAPAPOPOULOS</b> PU, University of Southern California	Rapporteur et examinateur
<b>Frédéric CHARBONNIER</b> PU, Université Paris Cité (UMR 1124)	Examineur
<b>Steven KNAFO</b> MCU-PH, Université Paris-Saclay (AP-HP)	Examineur

## Table des matières

Table des matières .....	1
Liste des figures .....	3
Liste des tableaux .....	6
Remerciements .....	7
Abréviations .....	10
Introduction Générale .....	12
Introduction.....	15
I. Les nerfs : développement, anatomie, et myélinisation .....	15
1. Cellules de Schwann et myélinisation des nerfs périphériques .....	16
1.1 Profil des cellules de Schwann dans les cultures de DRG embryonnaires .....	20
1.2 Régénération et remyélinisation axonales suite à des lésions .....	23
1.3 Limitations de la régénération axonale et de la récupération fonctionnelle .....	25
II. Douleur neuropathique chronique (DNC) .....	25
1. Définition de la DNC .....	25
2. Traitements disponibles pour la DNC et effets secondaires.....	28
III. Le composé GRT-X .....	29
1. Les cibles du GRT-X.....	30
1.1 TSPO .....	31
1.1.1 Article de synthèse.....	34
1.2 Les canaux potassiques voltage-dépendants Kv7.2/3.....	60
2. Etudes récentes sur les rôles du GRT-X .....	62
2.1 Effet antiépileptique du GRT-X .....	62
2.2 Effet neuroprotecteur du GRT-X.....	63
But de l'étude .....	65
Matériels et Méthodes.....	67
I. Produits chimiques.....	67
II. Test de viabilité cellulaire MTT ((bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium)).....	67
III. Animaux.....	68
IV. Préparation des lamelles (culture d'explants de ganglions spinaux) ou des boîtes de culture (cultures dissociées de ganglions spinaux) .....	68
V. Extraction des DRG à E13.5 .....	69
1. Cultures d'explants de DRG .....	70

2. Cultures dissociées de DRG .....	72
VI. Marquage immunocytochimique.....	73
VII. Microscopie confocale, analyse des images par Neurite-J, et calcul des aires sous la courbe	74
VIII. PCR quantitative en temps réel (Real Time PCR ; RT-qPCR) .....	75
1. Extraction de l'ARNm.....	75
2. Réverse transcriptase - quantitative PCR (RT-qPCR) .....	75
3. Construction des amorces.....	76
4. Test d'efficacité des amorces .....	77
IX. Analyses statistiques .....	78
Résultats.....	79
I. Le GRT-X n'affecte pas la viabilité cellulaire des cellules PC12.....	79
II. Les amorces construites ont une efficacité d'amplification comprise entre 95 et 110%	80
III. L'anticorps primaire anti-NFH est un bon marqueur axonal .....	81
IV. Le composé GRT-X permet de promouvoir la poussée axonale des DRG embryonnaires C57BL/6 à DIV4.....	82
V. La poussée axonale d'explants de DRG C57BL/6 embryonnaires est favorisée par le GRT-X et inhibée par l'étifoxine, mais n'est pas affectée par les composés XBD173, ICA-27243, et XE991 à DIV4 .....	84
VI. Le composé GRT-X maintient son effet positif sur la poussée axonale à DIV8 et après une seule dose de traitement .....	86
VII. Les composés GRT-X et XBD173 ont tendance à promouvoir la poussée axonale à DIV8 après deux doses de traitements.....	88
VIII. Le composé GRT-X induit une augmentation de l'expression de gènes impliqués dans la myélinisation, le développement et la différenciation des cellules de Schwann et des neurones, ainsi que dans la structure axonale dans des cultures dissociées de DRG C57BL/6 embryonnaires à DIV4 .....	90
IX. Le composé GRT-X n'a pas d'effet sur la poussée axonale dans les explants DRG embryonnaires TSPO-KO à DIV4.....	93
X. Le composé GRT-X induit une augmentation de l'expression de certains gènes impliqués dans la myélinisation, le développement et la différenciation des cellules de Schwann et des neurones, mais pas celle de gènes impliqués dans la structure axonale dans des cultures dissociées de DRG TSPO-KO embryonnaires à DIV4.....	95
Article .....	99
Discussion .....	134
Conclusion et perspectives.....	141
Bibliographie .....	142

## Liste des figures

<b>Figure 1.</b> Effets connus de GRT-X. GRT-X est un ligand de TSPO et Kv7.2/3. Des effets antiépileptique et anti-hyperalgésique ont été montrés (Bloms-Funke, Bankstahl et al. 2022) .....	12
<b>Figure 2.</b> Structure et anatomie d'un nerf périphérique.....	15
<b>Figure 3.</b> Transition des cellules de Schwann durant le développement et l'implication des facteurs de transcription. ↓: diminution d'expression ; + : sécrétion élevée ; - : sécrétion faible. ....	18
<b>Figure 4.</b> Expression d'ARNm des marqueurs de la lignée des cellules de Schwann dans les nerfs périphériques embryonnaires La quantification empirique présentée ici a été extrapolée à partir d'études de microarray réalisées sur des nerfs embryonnaires murins (Buchstaller, Sommer et al. 2004) ; (D'Antonio, Michalovich et al. 2006). Figure tirée de l'article de Sundaram et al. 2021.....	22
<b>Figure 5.</b> Résumé des facteurs principaux qui ont lieu lors de la réparation axonale suite à une lésion, ainsi que les principaux facteurs responsables de la régénération axonale.....	24
<b>Figure 6.</b> Structure du GRT-X (N-[(3-fluorophenyl)-methyl]-1-(2-methoxyethyl)-4-methyl-2-oxo-(7-trifluoromethyl)-1H-quinoline-3-carboxylic acid amide). (A) Structure chimique du GRT-X. (B) Représentation 2D du GRT-X.....	30
<b>Figure 7.</b> Localisation des canaux potassiques voltage-dépendants Kv7.2/3 au niveau du segment initial de l'axone.....	60
<b>Figure 8.</b> Notre but est d'une part de montrer les effets de GRT-X sur la poussée et axonal, et d'autre part sur la modulation de l'expression les gènes cibles (Tspo, Kv7.2/), et sur les gènes impliqués dans la différenciation Schwannienne (Dhh, Krox20, CNPase), la myélinisation (Mpz, Mbp, Plp), et la structure neuronale (Tfap2 $\alpha$ , Stmn2, Périphérine, Nfh).....	66
<b>Figure 9.</b> Protocole d'extraction des DRG embryonnaires à E13.5 .....	70
<b>Figure 10.</b> Extraction des DRG embryonnaires à E13.5. (A) Culture d'explants de DRG, et (B) Culture dissociée de DRG .....	73
<b>Figure 11.</b> Les différentes étapes permettant le calcul des aires sous la courbe.....	75
<b>Figure 12.</b> Effet du GRT-X sur la viabilité cellulaire des cellules PC12. Les données représentent la moyenne $\pm$ S.D. (analyse ANOVA suivie du 'Multiple Comparison Test' de Tukey) .....	79
<b>Figure 13.</b> Explant de DRG à DIV4 marqué à l'anti-NFH .....	81
<b>Figure 14.</b> GRT-X favorise la croissance axonale dans les explants DRG embryonnaires C57BL6/J à DIV4. Les images présentées dans cette figure représentent la moitié d'explants de DRG	

acquises en z-stacks par microscopie confocale à 20X. **(A)** représente le protocole expérimental, **(B)** représente un DRG non traité, **(C)** représente un DRG traité au GRT-X 10 µM, et **(D)** représente un DRG cultivé en présence du véhicule, l'éthanol à 0,1%. La quantification des neurites par Neurite-J **(E)** a montré une augmentation de la longueur et de la densité des neurites dans le DRG traité au GRT-X par rapport aux autres groupes. LE GRT-X a donc un effet positif sur la croissance axonale ..... 83

**Figure 15.** La poussée axonale d'explants de DRG C57BL/6 embryonnaires est favorisée par le GRT-X et inhibée par l'étifoxine, mais n'est pas affectée par les composés XBD173, ICA-27243, et XE991 à DIV4. **(A)** représente le protocole expérimental, **(B)** représente les images de microscopie confocale des explants de DRG à DIV4 suite à leurs traitements par les différentes molécules à DIV1. **(C)** représente le graphe tracé sur 3 expériences indépendantes suite à la quantification par Neurite-J des neurites de 3 ou 4 DRG par traitement. **(D)** représente les aires sous la courbe des différents groupes après normalisation au groupe non traité. Les résultats montrent une augmentation significative de l'AUC du groupe traité au GRT-X et une diminution significative suite au traitement à l'étifoxine en comparaison aux autres groupes. Cependant, les composés XE991, ICA-27243, et l'EtOH n'affectent pas la poussée axonale. Les données représentent la moyenne ± S.D sur trois expériences indépendantes. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*\*p < 0.0001 (analyse ANOVA suivie du 'Multiple Comparison Test' de Tukey) ..... 85

**Figure 16.** Le GRT-X maintient un effet positif sur la poussée axonale des explants de DRG C57BL/6 à DIV8 après une seule dose de traitement. **(A)** représente le protocole expérimental, **(B)** représente les images de microscopie confocale des DRG à DIV8 suite à leurs traitements par les différentes molécules à DIV1. **(C)** représente le graphe tracé sur 3 expériences indépendantes suite à la quantification par Neurite-J des neurites de 3 ou 4 DRG par traitement. **(D)** représente les aires sous la courbe des différents groupes après normalisation au groupe non traité. L'AUC du groupe traité au GRT-X est significativement supérieure à celles des autres groupes. Les données représentent la moyenne ± S.D. sur 3 expériences indépendantes. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*\*p < 0.0001 (analyse ANOVA suivie du 'Multiple Comparison Test' de Tukey) ..... 87

**Figure 17.** GRT-X et XBD-173 augmentent significativement la poussée axonale des DRG embryonnaires C57BL/6 à DIV8 après 2 traitements. **(A)** représente le protocole expérimental, **(B)** représente les images de microscopie confocale des DRG à DIV8 suite à leurs traitements par les différentes molécules à DIV1 et DIV4. **(C)** représente le graphe tracé sur 3 expériences indépendantes suite à la quantification par Neurite-J des neurites de 3 ou 4 DRG par traitement. **(D)** représente les aires sous la courbe des différents groupes après normalisation au groupe non traité. L'AUC des groupes traités par le GRT-X et XBD-173 sont significativement supérieurs à celle des autres groupes. Les données représentent la moyenne ± S.D. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*\*p < 0.0001 (analyse ANOVA suivie du 'Multiple Comparison Test' de Tukey). ..... 89

**Figure 18.** Quantification relative des taux d'ARNm de Tspo, Kv7.2, Kv7.3, Mpz, Mbp, Plp, Dhh, Krox20, CNPase, Tfp2α, Périphérine, Cad19, et Nfh de cultures dissociées de DRG embryonnaires C57BL/6 à DIV4 suite aux différents traitements. Les données représentent la moyenne ± S.D sur 3 manipulations effectuées indépendamment. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*\*p < 0.0001 (analyse ANOVA suivie du 'Multiple Comparison Test' de Tukey) ..... 92

**Figure 19.** Le GRT-X n'a pas d'effet sur la poussée axonale d'explants de DRG embryonnaires TSPO-KO à DIV4. **(A)** représente le protocole expérimental, **(B)** représente les images de microscopie confocale des explants de DRG à DIV4 suite à leurs traitements par les différentes molécules à DIV1. **(C)** représente le graphe tracé sur 3 expériences indépendantes suite à la quantification par Neurite-J des neurites de 3 ou 4 DRG par traitement. **(D)** représente les aires sous la courbe des différents groupes après normalisation au groupe non traité. Les résultats ne montrent pas d'effets des composés GRT-X et XBD173 sur la poussée axonale. Cependant, les composés XE991 et ICA27243 inhibent la poussée axonale. Les données représentent la moyenne  $\pm$  S.D sur 3 expériences indépendantes. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  (analyse ANOVA suivie du 'Multiple Comparison Test' de Tukey)..... 94

**Figure 20.** Quantification relative des taux d'ARNm de Kv7.2, Kv7.3, Mpz, Mbp, Plp, Dhh, Krox20, CNPase, Tfp2 $\alpha$ , Périphérine, Cad19, et Nfh de cultures dissociées de DRG embryonnaires TSPO-KO à DIV4 suite aux différents traitements. Les données représentent la moyenne  $\pm$  S.D de 3 expériences effectuées indépendamment. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  (analyse ANOVA suivie du 'Multiple Comparaison Test' de Tukey)..... 97

**Figure 21.** Les effets antiépileptique, anti-hyperalgésique du GRT-X décrits par Bloms-Funke et al sont probablement médiés par la stimulation de la poussée axonale et la modulation des gènes impliqués dans la myélinisation, la différenciation Schwannienne et la structure neuronale ..... 141

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1.</b> Récepteurs, canaux, et processus impliqués dans la douleur neuropathique chronique .....	27
<b>Tableau 2.</b> Composition du milieu 'DRG plating media.....	71
<b>Tableau 3.</b> Composition du milieu neurobasal.....	71
<b>Tableau 4.</b> Répartition des groupes de cultures d'explants de DRG .....	72
<b>Tableau 5.</b> Liste des anticorps primaires et secondaires.....	74
<b>Tableau 6.</b> Séquences des amorces de RT-qPCR .....	77
<b>Tableau 7.</b> Efficacité d'amplification des amorces utilisées dans l'étude .....	80
<b>Tableau 8.</b> Comparaison des effets des différents traitements sur les taux d'expression de l'ARNm des différents gènes dans les cultures dissociées de DRG à DIV4 provenant de souris C57BL/6 et TSPO-KO gestantes à E13.5.....	98

## Remerciements

Pour commencer, je tiens à remercier le Dr. Liliane Massade de m'avoir donné la chance et l'honneur de diriger ma thèse. Je suis arrivée dans votre laboratoire en septembre 2020, à 23 ans, avec peu d'expérience en recherche mais avec de grands rêves. Vous m'avez accueillie, formée, et soutenue au cours de ces trois dernières années. Votre intégrité scientifique et votre rigueur me marqueront à jamais. Votre patience, et votre mentorat dévoué ont été une source d'inspiration pour moi tout au long de cette aventure. Vous avez été mon mentor et m'avez beaucoup appris scientifiquement, mais aussi humainement. Merci d'avoir été compréhensive quand les choses se sont un peu compliquées pour moi. Votre influence sur ma carrière et ma formation restera inestimable. Encore une fois, merci du fond du cœur pour cette opportunité, j'en suis profondément reconnaissante.

Je tiens à remercier également le Dr. Michael Schumacher de m'avoir ouvert les portes du laboratoire en 2020. Merci d'avoir cru en moi lors de notre premier entretien par zoom lorsque j'étais toujours au Liban. Merci d'avoir dirigé ma thèse, et de m'avoir guidée par vos conseils scientifiques pertinents. Travailler avec vous a été un honneur pour moi.

Je remercie également tous les membres du jury pour le temps accordé pour ma thèse. Merci au Professeur Vassilios Papadopoulos pour tous les conseils scientifiques ainsi que pour l'intérêt porté envers ce projet. Merci d'avoir accepté de lire et de rapporter ma thèse. Je remercie Docteur Fathia Nothias d'avoir accepté de lire et de rapporter ma thèse, ainsi que pour tous les conseils scientifiques. Je souhaite remercier le professeur Frédéric Charbonnier et le Dr. Stephen Knafo d'avoir fait partie de mon comité de suivi de thèse durant ces trois dernières années. Vos conseils ainsi que les discussions scientifiques que nous avons eues m'ont été très enrichissantes. Merci d'avoir également accepté d'évaluer mes travaux en tant qu'examineurs. Merci au professeur Fabrice Parker d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse, et d'avoir accepté d'évaluer mes travaux en tant qu'examineur.

Je remercie le Docteur Charbel Massaad de m'avoir ouvert les portes de son laboratoire à l'université de Paris lorsque j'ai commencé ma thèse. C'est là où j'ai été formée par le Docteur

Venkat Krishnan Sundaram que je remercie infiniment de m'avoir appris la technique d'extraction des DRG embryonnaires.

Merci à tous les membres de l'unité U1195 d'avoir fait partie de mon aventure. Mon expérience serait complètement différente sans les discussions que nous avons échangées, les rires, et les bons moments que nous avons partagés ensemble.

Je tiens à remercier Guy Khalaf, sans trop savoir par où commencer. On s'est connus il y a presque 10 ans, à la FS, le jour de la pré-rentree. Depuis notre premier échange, j'ai su que tu occuperas une grande partie dans ma vie. Nous avons fait notre licence ensemble à l'USJ, notre master ensemble à l'AUB, et puis nous avons changé de pays ensemble pour faire notre thèse à Paris, à l'U1195. Nous voilà aujourd'hui, tous les deux presque docteurs, 9 ans plus tard. Tu as été mon repère et mon pilier durant toutes ces années. Merci de m'avoir soutenue durant tous les moments difficiles, merci d'avoir partagé mes sourires, mes larmes, mes joies, et mes peines. Merci d'avoir fait partie de ma famille, d'avoir été mon frère, mon meilleur ami, mais aussi mon collègue. Notre amitié m'inspire et me donne de la force. Sans toi, cette expérience serait complètement différente. Je serai toujours là pour toi, comme tu l'as été pour moi.

Un grand merci au Docteur Suzan Boutary, la chercheuse post-doctorante de mon équipe, ma collègue, mais aussi mon amie. Tu as ajouté beaucoup de bonheur à cette expérience. Tu m'as guidée scientifiquement durant la thèse et tu m'as toujours encouragée. Tu m'as formée, m'as appris beaucoup de techniques, et tu as toujours cru en moi. Merci pour tes conseils scientifiques, pour ton soutien moral, et pour les fou-rires incessants. Les journées ne pouvaient pas commencer sans notre petite pause-café matinale et sans nos 'quick life update'. Tu es une collègue et une amie en or.

Je remercie également Docteur Marie Caillaud, mon ancienne collègue, qui a fait sa thèse dans le laboratoire du Docteur Massade. Tu m'as accueilli avec un très grand sourire et beaucoup de gentillesse. Je n'oublierai jamais ton énergie et ta bonne humeur.

A ma famille, mon père Pierre, ma mère Joumana, mes sœurs Gaia, Sasha, et Rasha, et mon frère, Yorgo, rien de tout ça n'aurait été possible sans vous. Je puise ma force de vous. Vous m'avez toujours soutenue, encouragée, et poussée à accomplir tous mes rêves. Vous êtes mon pilier, ma constante, mon réconfort, et la douceur dans l'amertume. Merci d'avoir cru en moi, merci de m'avoir motivée depuis le début, merci d'avoir toujours été à l'écoute, d'avoir toujours été présents et proches malgré la distance qui nous sépare. J'espère vous rendre fiers.

A tous mes amis, je vous remercie du plus profond de mon cœur sans savoir par où commencer. Merci d'avoir été à mes côtés durant ces trois dernières années, et bien avant. Merci de m'avoir écouté parler pendant des heures de ma thèse et de mes expériences, sans que cela ne vous intéresse spécialement. Merci de m'avoir soutenue psychologiquement durant tout ce temps. Votre présence m'a rendue, et me rend toujours, forte.

## Abréviations

10,10-bis (4-pyridinylmethyl)-9(10H)-anthracenone dihydrochloride (XE991)

Acide gamma-aminobutyrique (GABA)

Bone Morphogenetic Protein (BMP4)

Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)

C57BL/6-Tspotm1GuWu (GuwiyangWurra)-knockout mice (TSPO-KO)

Cadhérine 19 (Cad19)

Canal anionique voltage-dépendant (VDAC)

Cellules de Schwann immatures (Immature Schwann Cells, iSC)

Connexine 32 (Cx32)

Day *in vitro* (DIV)

Desert hedgehog (DHH)

Dorsal root ganglion, ou ganglion spinal (DRG)

Douleur neuropathique chronique (DNC)

Early growth response protein (Egr)

Ethanol (EtOH)

Ganglions de la racine dorsale (dorsal root ganglia, DRG)

Glial cell-derived neurotrophic factor' (GDNF)

Glial fibrillary acidic protein (GFAP)

Hélice transmembranaire 5 (TM5)

Histone désacétylases 1 and 2 (HDAC1/2)

Interleukine-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ) et -1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )

Jonction neuromusculaire (JNM)

Leukemia inhibitory factor (LIF)

Mode d'action (MoA)

Monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1)

Myelin associated glycoprotein (MAG)

Myelin basic protein (MBP)

Myelin protein zero (PO)

N-(6-chloro-pyridin-3-yl)-3,4-difluoro-benzamide (ICA-27243)

N-[(3-fluorophenyl)-methyl]-1-(2-methoxyethyl)-4-methyl-2-oxo-(7-trifluoromethyl)-1H-quinoline-3-carboxylic acid amide (GRT-X)

Nerf crânien (NC)

Neural crest cells (NCC)

Nerve growth factor (NGF)

N-Ethyl-7,8-dihydro-7-methyl-8-oxo-2-phenyl-N-(phenylmethyl)-9H-purine-9-acetamide (XBD173)

Neural cell adhesion molecule (NCAM)

Neurotrophin-3 (NT3)

Neurofilaments lourds (Heavy neurofilaments, NFH)

Nuclear factor-kappa B (NF-kB)

P75 neurotrophin receptor (p75NTR)

Paraformaldéhyde (PFA)

Pentylène-tétrazole (PTZ)

Peripheral myelin protein (PMP22)

Pore de transition de perméabilité mitochondriale (mPTP)

Précurseurs des cellules de Schwann ('Schwann Cell Precursors, SCP)

Protéine transmembranaire mitochondriale, ou translocator protein (TSPO)

Sonic hedgehog (SHH)

SRY-related HMG-box (Sox)

Streptozotocine (STZ)

Système nerveux central (SNC)

Système nerveux périphérique (SNP)

Système nerveux sympathique (SNS)

Transcription factor AP-2 alpha (Tfap2 $\alpha$ )

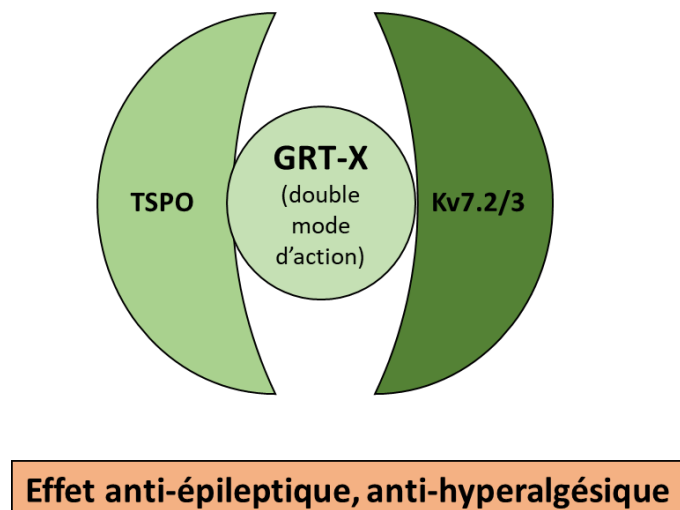
Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ )

Vascular endothelial growth factor (VEGF)

## Introduction Générale

Le système nerveux périphérique (SNP), est caractérisé par sa plasticité suite aux lésions. Les nerfs lésés, moteurs et sensoriels, ont la capacité de se régénérer et de réinnervent leurs organes cibles (Gordon 2016). Néanmoins, la régénération axonale est souvent insuffisante et engendre des dysfonctionnements fonctionnels, qui sont à l'origine de douleurs neuropathiques chroniques (DNC) (Bernatoniene, Sciupokas et al. 2023). Pour ménager la douleur des patients, les traitements actuelles, tels que les opioïdes sont prescrits. Cependant, des effets secondaires indésirables tels que l'hyperalgésie, l'immunosuppression, et l'addiction (Finnerup, Attal et al. 2015) sont notés. De plus, ils ne traitent pas l'origine du problème (Bloms-Funke, Schumacher et al. 2022). Pour cela, il devient urgent de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques permettant de traiter la cause et d'améliorer la qualité de vie des patients.

Récemment, une nouvelle classe de molécules, GRT-X (N-[(3-fluorophenyl)-methyl]-1-(2-methoxyethyl)-4-methyl-2-oxo-(7-trifluoromethyl)-1H-quinoline-3-carboxylic acid amide), a été développée par la compagnie pharmaceutique Grünenthal. GRT-X cible à la fois la protéine translocatrice mitochondriale (TSPO, 18 kDa) et les canaux potassiques Kv7.2/3 (KCQN2/3) voltage-dépendants, deux cibles prometteuses pour favoriser la régénération des nerfs périphériques, la récupération fonctionnelle et prévenir la chronicisation des douleurs neuropathiques, sans risque d'addiction.



*Figure 1. Effets connus de GRT-X. GRT-X est un ligand de TSPO et Kv7.2/3. Des effets antiépileptique et anti-hyperalgésique ont été montrés (Bloms-Funke, Bankstahl et al. 2022)*

TSPO (translocator protein, 18 kDa), précédemment connue sous le nom de PBR (peripheral benzodiazepine receptor), est une protéine ubiquitaire se trouvant au niveau de la membrane externe de la mitochondrie (Gavish and Veenman 2018). Elle est constituée de cinq hélices  $\alpha$  transmembranaires hydrophobes qui s'étirent sur la bicouche lipidique, avec une extrémité C-terminale dans le cytosol et une courte extrémité N-terminale qui se trouve dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie. L'un des rôles les plus discutés de TSPO est l'internalisation du cholestérol à l'intérieur de la mitochondrie. En effet, cela est possible grâce à son interaction avec ce dernier par l'intermédiaire du domaine de reconnaissance du cholestérol (CRAC) situé au niveau du C-terminal. Cependant, les études portant sur le rôle de TSPO dans la stéroïdogenèse sont controversées : certaines montrent que la TSPO permet l'internalisation du cholestérol à l'intérieur de la mitochondrie et est donc indispensable à la stéroïdogenèse, alors que d'autres montrent que l'absence de la protéine mitochondriale n'affecte pas la synthèse de stéroïdes (Lacapère, Duma et al. 2020). De plus, l'expression basale de TSPO est nécessaire pour le maintien de l'homéostasie. En effet, TSPO est fortement exprimée dans les tissus synthétisant les hormones stéroïdiennes et faiblement exprimée dans le cerveau (Bonsack and Sukumari-Ramesh 2018). La modification de l'expression basale de TSPO pourrait être le signe d'une pathologie. Pour cela, TSPO est de plus en plus utilisée comme biomarqueur de certaines maladies en PET scan (position emission tomography) (Nutma, Ceyzériat et al. 2021).

Les canaux potassiques Kv7 voltage-dépendants, en particulier les Kv7.2/3, sont codés par les gènes KCNQ2 et 3 et sont localisés au niveau du segment initial de l'axone (Hefting, D'Este et al. 2020). Ils permettent la sortie du potassium vers l'extérieur des cellules, et jouent des rôles physiologiques importants dans plusieurs types cellulaires (neurones, cellules cardiaques, et cellules bêta du pancréas) (Bloms-Funke, Schumacher et al. 2022). Initialement appelés 'canaux-M', les Kv7.2/3 ne s'inactivent pas puisqu'ils possèdent un seuil bas d'activation (60 mV). Cela génère un courant sortant voltage-dépendant régulier et permet donc de stabiliser le potentiel de la membrane en présence de courants dépolarisants. Des mutations des gènes KCNQ2 et KCNQ3 ont été associées à des formes néonatales héréditaires d'épilepsie (Wang, Lin et al. 2017). La modulation de l'excitabilité neuronale par les Kv7.2/3 en fait d'eux une cible intéressante pour le traitement de formes héréditaires et acquises d'épilepsie, et de pathologies impliquant des altérations de l'excitabilité neuronale telle que la douleur neuropathique chronique (Greene and Hoshi 2017).

Il a été montré que GRT-X est un ligand de TSPO et des Kv7.2/3 (Bloms-Funke, Bankstahl et al. 2022, Bloms-Funke, Schumacher et al. 2022). Dans le système nerveux central, GRT-X accélère le taux de récupération fonctionnelle suite à une lésion sévère des nerfs cervicaux, sans présenter d'indices de dépendance (Bloms-Funke, Schumacher et al. 2022) et régule l'hyperexcitabilité neuronale dans des modèles expérimentaux d'épilepsie (Bloms-Funke, Bankstahl et al. 2022). Dans le système nerveux périphérique, une atténuation de l'hyperalgésie induite par la neuropathie diabétique est observée par le GRT-X (Bloms-Funke, Schumacher et al. 2022) (**Figure 1**). Cependant dans ces deux études, **le rôle du GRT-X dans la poussée axonale n'a pas été évalué**. De plus, la modulation de l'expression des gènes cibles (TSPO et kv7.3/2) et ceux impliqués dans la différenciation Schwannienne (Plp, Mpz et Mbp), dans la myélinisation (crox20, CNPase et Dhh) et dans la structure axonale (Stmn2, Péripherine, Nfh et Cad19) par le GRT-X, n'ont pas été évalué.

Cette étude a pour but de montrer les effets cellulaires et moléculaires de GRT-X sur des ganglions spinaux (ou Dorsal Root Ganglia, DRG) qui représente un bon modèle pour les études pharmacologiques.

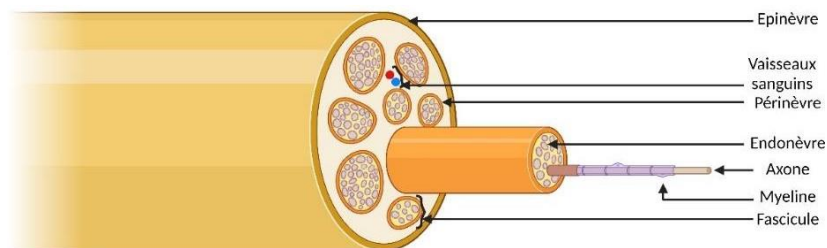
Dans les paragraphes suivants nous introduirons, les processus de myélinisation du système nerveux périphérique, les limites de la régénération axonale et récupération fonctionnelle suite à un traumatisme, les traitements actuels disponibles et leurs limitations. Ensuite j'introduirai le GRT-X et son mode d'action sur la TSPO et sur Les Kv7.2/3.

# Introduction

## I. Les nerfs : développement, anatomie, et myélinisation

Le développement des neurones périphériques et de leurs cellules de support est un processus complexe qui débute lors de la neurulation durant la troisième et la quatrième semaine du développement embryonnaire. Ce processus implique les interactions de plusieurs facteurs trophiques, de transcription, et chimiotactiques nécessaires pour la migration des neuroblastes, l'extension des neurites, le guidage axonal, et la maintenance des axones au niveau des tissus cibles.

Les nerfs constituent un réseau complexe essentiel au fonctionnement du système nerveux. Les éléments de base des nerfs périphériques sont les fibres nerveuses (ou axones), qui sont des prolongements des neurones. Il existe six types de fibres nerveuses classées suivant leur diamètre, leur vitesse de conduction, et par la présence ou non d'un recouvrement de myéline : 2.1 Fibres A alpha (Aa), 2.2 Fibres A bêta (Ab), 2.3 Fibres A gamma (Ag), 2.4 Fibres A delta (Ad), 2.5 Fibres B, et 2.6 Fibres C. Les fibres précédemment décrites se regroupent en faisceaux et forment des fascicules. Les fascicules sont ensuite enveloppés dans des couches de tissus conjonctifs (**Figure 2**).



**Figure 2.** Structure et anatomie d'un nerf périphérique.

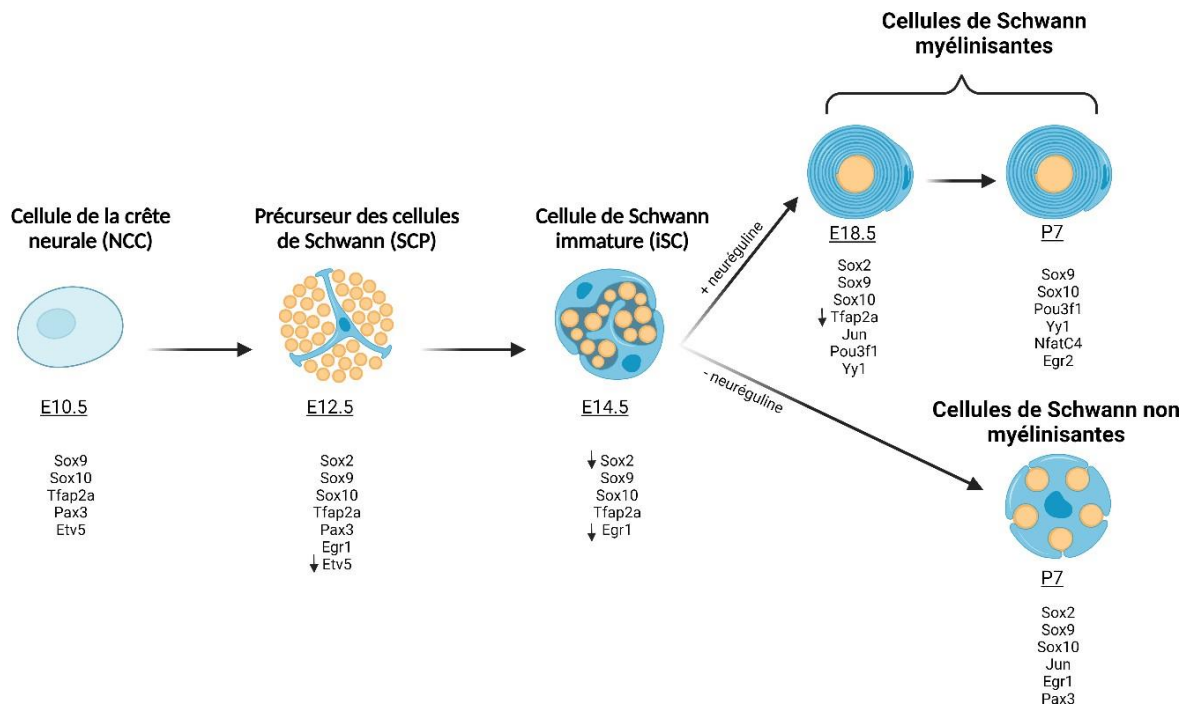
## 1. Cellules de Schwann et myélinisation des nerfs périphériques

La myéline est une membrane multilamellaire formée par les oligodendrocytes dans le SNC, et par les cellules de Schwann dans le SNP. La myéline est formée principalement de lipides (70 à 80%), mais contient également 20 à 30% de protéines (60% de glycoprotéines, 20 à 30% de protéines basiques, et 10 à 20% d'autres protéines) (Garbay, Heape et al. 2000). Dans le SNC, un oligodendrocyte myélinise plusieurs axones, tandis que dans le SNP, une cellule de Schwann ne myélinise qu'un seul axone (Salzer and Zalc 2016). En s'enroulant autour des axones, la myéline permet leur isolation, favorisant ainsi une propagation rapide des potentiels d'action par conduction saltatoire (Baba 2022). En effet, le potentiel d'action 'saute' d'un nœud de Ranvier (partie non myélinisée riche en canaux potassiques et sodiques) d'un axone vers le suivant. Ce type de transmission permet d'accélérer la conduction de l'influx nerveux et d'économiser de l'énergie et de l'espace. Il est important de noter que la gaine de myéline est subdivisée en deux sous-domaines structurellement et biochimiquement différents : la myéline compacte et la myéline non compacte. La myéline compacte correspond à des régions où les cellules de Schwann sont dépourvues de cytoplasme. Elle se trouve au niveau des internœuds, donc entre les nœuds de Ranvier. Elle contient du cholestérol, des sphingolipides, la 'peripheral myelin protein' (PMP22), la 'myelin protein zero' (P0), et la 'myelin basic protein' (MBP). La myéline non compacte quant à elle correspond à des zones où persiste du cytoplasme des cellules de Schwann. Elle est formée par les régions juxta-paranodales qui contiennent les canaux potassiques, et les régions paranodales qui contiennent la principale protéine de jonction lacunaire, la connexine 32 (Cx32), et la 'myelin associated glycoprotein' (MAG) (Garbay, Heape et al. 2000). En outre, il convient de noter que le rôle des cellules de Schwann va au-delà de la formation de myéline et de l'isolation des axones. Elles fournissent également le soutien métabolique nécessaire aux axones, ce qui est particulièrement important pour les longs axones des nerfs périphériques.

Les cellules de Schwann sont les cellules gliales du système nerveux périphériques, découvertes par Theodore Schwann en 1839 (Bhatheja and Field 2006). Elles sont responsables de la myélinisation des axones dans le SNP. Ce phénomène commence au début de la vie embryonnaire, lorsque les cellules de Schwann émergent de la crête neurale. Cette dernière subit deux étapes différentielles pour produire des précurseurs des cellules de Schwann ('Schwann Cell Precursors, SCP) ou des cellules de Schwann immatures (Immature

Schwann Cells, iSC) jusqu'à la naissance. Après la naissance, les cellules de Schwann immatures, sous l'effet de la neuréguline, se différencient en cellules de Schwann myélinisantes ou non myélinisantes. En effet, suite à la sécrétion importante de neuréguline par les axones de grand diamètre ( $\geq 1 \mu\text{m}$ ), les cellules de Schwann deviennent myélinisantes. Les axones de faible diamètre produisent des niveaux plus faibles de neuréguline induisant ainsi un enchevêtrement direct avec des cellules de Schwann non myélinisantes, également appelées cellules de Remak, qui enveloppent plusieurs petits axones séparés par des couches simples de membrane plasmique (Jessen and Mirsky 2005).

Plusieurs facteurs de transcription sont exprimés durant les phases transitoires depuis l'émergence des cellules de la crête neurale ('Neural Crest Cells', NCC), jusqu'à la différenciation en cellules de Schwann myélinisantes ou non myélinisantes, en passant par les SCP et les iSC (**Figure 3**). En effet, les facteurs de transcription Sox9, Sox10, Tfp2 $\alpha$ , Etv5, et Pax3 sont exprimés au stade des NCC. Ils restent tous exprimés durant la transition en SCP à l'exception d'Etv5 dont l'expression diminue. De plus, l'expression de Sox2 et Egr1 est initiée. Lors de la différenciation des SCP en iSC, les facteurs de transcription Sox9, Sox10, et Tfp2 $\alpha$  restent présents, tandis que l'expression de Pax3 est inhibée, et celle d'Egr1 et Sox2 est diminuée. Ensuite, la différenciation des iSC en cellules de Schwann myélinisantes est marquée par la présence des facteurs de transcription Sox9 et Sox10, la diminution de l'expression de Tfp2 $\alpha$ , et la présence de Jun, Pou3f1, et Yy1. Enfin, les cellules de Schwann myélinisantes continuent à exprimer Sox9, Sox10, Pou3f1 et Yy1 et initient l'expression de Nfatc4, et d'Egr2 (Balakrishnan, Belfiore et al. 2021). Egr2 n'est exprimé qu'à la fin du stade embryonnaire ou durant le début de la période postnatale au niveau des cellules de Schwann tapissant les nerfs périphériques. Il est important de noter que les cellules de Schwann non myélinisantes réexpriment Egr1, ainsi que Sox9, Sox10, Sox2, Jun et Pax3 (Balakrishnan, Belfiore et al. 2021).



**Figure 3.** Transition des cellules de Schwann durant le développement et l'implication des facteurs de transcription. ↓: diminution d'expression ; + : sécrétion élevée ; - : sécrétion faible.

Des études de perte et de gain de fonction ont permis d'élucider le rôle de ces facteurs de transcription dans le développement et le maintien des fonctions des cellules de Schwann.

- Gènes Sox (SRY-related HMG-box) : L'expression de Sox9 et Sox10 débute dans les NCC à E10.5 et persiste dans les cellules de Schwann matures tout au long de la vie (Balakrishnan, Stykel et al. 2016). Le rôle de Sox9 dans la lignée schwannienne n'est toujours pas clair puisque les mutants hétérozygotes présentent une létalité périnatale, et les mutants homozygotes ne peuvent être générés (Bi, Huang et al. 2001). Quant à Sox10, sa présence est nécessaire durant le développement embryonnaire pour générer des cellules de Schwann et des cellules gliales satellites entourant les corps cellulaires neuronaux dans les ganglions sensoriels (Paratore, Goerich et al. 2001). Les analyses *in vivo* de modèles animaux Sox10-knockout montrent que Sox10 ne joue pas de rôle dans la survie des cellules de Schwann au stade postnatal, mais plutôt dans la maintenance d'une gaine de myéline intacte et fonctionnelle (Finzsch, Schreiner et al. 2010). Cela est cohérent avec son rôle dans l'activation de gènes impliqués dans la formation de la myéline (tels que Egr2, MBP, MPZ, MAG, et S100β)

en agissant de manière synergique avec d'autres facteurs de transcription (Pou3f1, Nfatc4 et Egr2) (Balakrishnan, Belfiore et al. 2021).

L'expression de Sox2 est importante dans les cellules de l'ectoderme qui deviennent des NCC. Elle est maintenue mais en faible dose dans les SCP et les iSC ; ce qui est nécessaire pour maintenir une identité gliale et non neuronale des cellules. La présence de Sox2 est également importante pour inhiber l'expression de Mitf et favoriser ainsi la différenciation des SCP en cellules de Schwann myélinisantes et non pas en mélanocytes (Adameyko, Lallemand et al. 2012).

- Gènes Etv5 (Ets-domain) : Etv5 est exprimé dans les NCC et dans les cellules satellites gliales, mais est rapidement inhibé dans les SCP (Balakrishnan, Belfiore et al. 2021).
- Tfp2 $\alpha$  : Également exprimé dans les NCC et dans les SCP, puis rapidement inhibé dans les cellules de Schwann myélinisantes (Jessen and Mirsky 2019). Tfp2 $\alpha$  est un régulateur négatif de la différenciation des cellules de Schwann puisque son expression continue dans les SCP empêche leur transition en iSC (Stewart, Brennan et al. 2001).
- Pax3 : Également exprimé dans les NCC et est rapidement inhibé dans les SCP avant d'être réexprimé dans les cellules de Remak (Blake and Ziman 2013). La prolifération des cellules de Schwann et le blocage de l'apoptose sont induits par Pax3 durant le développement (Nakazaki, Shen et al. 2009). Lorsqu'il est surexprimé *in vitro*, Pax3 empêche la différenciation des cellules de Schwann en cellules myélinisantes en inhibant l'expression de MBP et Erg2 induite par MPZ (Doddrell, Dun et al. 2012). En effet, Pax3 favorise la différenciation en cellules de Schwann non myélinisantes, ce qui cohérent avec son expression dans les cellules de Remak (Kioussi, Gross et al. 1995).
- Pou3f1 (ou Oct-6), Jun, et Yy1 : L'expression de ces trois facteurs de transcription débute au stade des cellules de Schwann myélinisantes (Balakrishnan, Belfiore et al. 2021). Pou3f1 est exprimé dans les cellules de Schwann non myélinisantes et est inhibé lorsque commence la myélinisation. Cependant, Pou3f1 est nécessaire pour induire l'expression d'Egr2 et initier le programme de myélinisation au moins jusqu'au dixième jour postnatal, agissant ainsi en synergie avec Sox10 (Ghislain and Charnay 2006). La surexpression de Pou3f1 entraîne une hypomyélinisation persistante et une perte axonale progressive en agissant comme un répresseur de la transcription de MBP et de MPZ (Ryu, Wang et al. 2007).

Jun est exprimé dans les iSC tardifs à E17.5, et son expression est ensuite diminuée par Egr2 avec le début de la myélinisation (Parkinson, Bhaskaran et al. 2004). La surexpression de Jun

bloque la myélinisation en inhibant l'expression de Egr2 et MPZ, initiant ainsi un programme de dédifférenciation des cellules de Schwann (Parkinson, Bhaskaran et al. 2008). En revanche, Yy1 déclenche l'expression d'Egr2 de manière dépendante de la neuréguline et est un régulateur positif de la myélinisation (He, Kim et al. 2010).

- Egr1/Egr2 : Egr1 (ou Krox24) et Egr2 (ou Krox20) jouent des rôles opposés dans la myélinisation. En effet, l'activation d'Egr2 initie la différenciation finale en cellules de Schwann myélinisantes, induisant ainsi l'activation de gènes liés à la myéline tels que MBP, MPZ, et Pmp22 (Balakrishnan, Belfiore et al. 2021). Inversement, Egr1 est exprimé dans les cellules de Schwann non myélinisantes (Balakrishnan, Stykel et al. 2016).

### 1.1 Profil des cellules de Schwann dans les cultures de DRG embryonnaires

Il est bien connu qu'il existe des différences temporelles entre le développement des cellules de Schwann dans les cultures de DRG *in vitro* et dans les nerfs spinaux en développement *in vivo*. Dans les nerfs rachidiens en développement chez la souris, les NCC ayant à un destin glial se différencient en SCP et apparaissent dans les DRG vers E11 (Jacob 2015). Ensuite, les SCP commencent à migrer sur les axones naissants entre E12.5 et E13.5 pour peupler leurs cibles périphériques et subissent une transition à E15.5 en iSC qui se différencie ensuite en cellules de Schwann myélinisantes ou non myélinisantes, en périnatalité (Jessen and Mirsky 2019). Cependant, ces données ne peuvent pas être utilisées pour extrapoler la chronologie des transitions développementales des cellules de Schwann *in vitro* en raison de certains problèmes techniques. En effet, les DRG sont disséqués à partir d'embryons de souris vers la fin de la deuxième semaine de gestation (E12.5 ou E13.5). À ce stade, les SCP *in vivo* ont déjà commencé à quitter les DRG et à migrer sur les axones en développement (Jessen and Mirsky 2005). Une fois disséqués et dissociés, les DRG donnent naissance de nouveau à des neurones sensoriels et à des SCP *in vitro* (Kim and Kim 2018), ce qui est possible grâce à la présence d'un réservoir de neurones sensoriels et de SCP dans le DRG. Par conséquent, une grande partie des événements *in vivo* sont répétés avec une différence de phase *in vitro*.

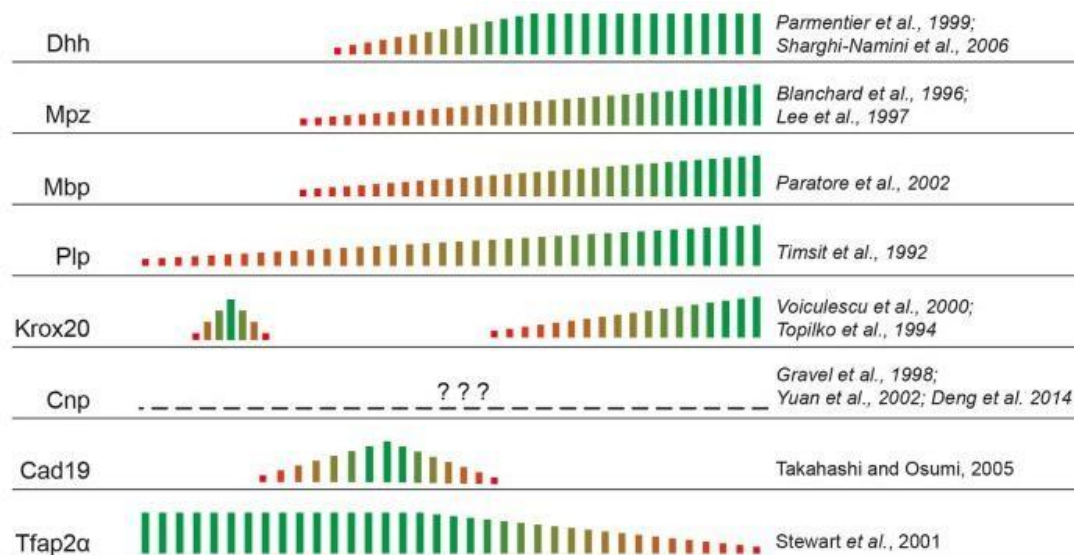
Une étude a été publiée en 2021 portant sur le développement et les transitions des cellules de Schwann dans les DRG embryonnaires en culture (Sundaram, El Jalkh et al. 2021). Comme indiqué précédemment, ce modèle de culture est souvent utilisé pour décrire le rôle de nouvelles molécules dans le développement et la myélinisation par les cellules de Schwann

(Taveggia and Bolino 2018). L'étude en question montre que les précurseurs des cellules de Schwann apparaissent entre le premier et le troisième jour *in vitro* (Day *in vitro* ; DIV), et continuent à peupler le milieu de culture durant les 7 premiers jours. De plus, la transition des SCP en iSC se fait entre DIV5 et DIV7 et les iSC se transforment en cellules de Schwann myélinisantes à partir du quatrième jour après l'induction de la myélinisation par ajout d'acide ascorbique dans le milieu de culture. Outre cela, l'étude a démontré que la différenciation en cellules de Schwann myélinisantes est comparable entre les iSC provenant de DRG embryonnaires et les cellules de Schwann néonatales provenant de nerfs sciatiques (Sundaram, El Jalkh et al. 2021). Le profil d'expression de gènes impliqués dans le développement des cellules de Schwann a également été étudié :

- Des gènes exprimés dans les SCP *in vivo* : *Dhh*, *Mpz*, *Mbp*, *Plp*, *Cnp*
- Des gènes exprimés dans les SCP mais dont l'expression diminue dans les iSC *in vivo* : *Cad19* et *Tfap2α*
- Un gène dont l'expression augmente lors de la transition des SCP en iSC dans les nerfs embryonnaires : *Krox20*

Les résultats montrent une augmentation importante de l'expression de *Dhh* entre DIV1 et DIV3, puis une stagnation de son niveau d'expression entre DIV3 et DIV7. Un pic d'expression de *Mpz* a lieu entre DIV1 et DIV3, et son expression continue à augmenter graduellement jusqu'à DIV7. *Mbp* montre une augmentation modeste mais statistiquement significative entre DIV1 et DIV3 mais ne change pas significativement au-delà de DIV3. *Plp* montre un pic initial d'expression à DIV3 mais qui a cependant chuté momentanément à DIV5 et a atteint un plateau à DIV7. L'expression de *Cnp* augmente modérément entre DIV1 et DIV3 et reste stable jusqu'à DIV7. L'expression de *Cad19* augmente de façon presque linéaire entre DIV1 et DIV5 mais baisse entre DIV5 et DIV7. L'expression de *Tfap2α* conserve un profil plat entre DIV1 et DIV3 et commence à décliner après DIV3 pour chuter significativement à DIV7. L'expression de *Krox20* ne varie pas entre DIV1 et DIV5, mais un pic d'expression est observé à DIV7 (Sundaram, El Jalkh et al. 2021). Ces résultats concordent avec l'ordre des événements moléculaires observés dans les nerfs spinaux embryonnaires. Par exemple, l'expression de *Dhh*, *Mpz*, *Mbp* et *Plp* augmente dans les SCP à E12.5 chez la souris (Woodhoo and Sommer 2008) et également à DIV3 dans les cultures de DRG embryonnaires (Sundaram, El Jalkh et al. 2021). Les résultats obtenus sur l'expression de *Cnp* ne permettent pas de tirer des conclusions. En

effet, une étude préalable montre que *Cnp* est exprimé dans les cellules satellites à E14.5 et dans les racines ventrales à E17.5, mais ne précise pas son niveau d'expression dans les SCP (Deng, Kim et al. 2014). Deux autres études portent sur des périodes post-natales (Gravel, Di Polo et al. 1998). Les observations de Sundaram *et al.*, suggèrent que l'expression de l'ARNm du *Cnp* diminue dans les SCP à partir de DIV3 en culture, mais cela doit être confirmé *in vivo*. De plus, il est connu que *Krox20* est exprimé à deux reprises durant le développement du SNP : une fois à E10.5 au niveau des racines dorsales et ventrales, et une deuxième fois à E15.5 lors de la transition des SCP en iSC dans les nerfs périphériques. Les résultats obtenus par Sundaram *et al.*, confirment ces évènements *in vitro* (pic d'expression entre DIV5 et DIV7, lors de la transition des SCP en iSC). En effet, la transition des SCP en iSC *in vitro* entre DIV5 et DIV7 a davantage été confirmée par la chute des niveaux d'expression de *Tfap2α* durant cette période (Sundaram, El Jalkh et al. 2021). L'ensemble de ces résultats donne une image claire des transitions développementales des cellules de Schwann dans les cultures embryonnaires de DRG au cours desquelles les SCP prolifèrent et migrent sur les neurites en développement entre DIV1 et DIV5. A DIV5, les SCP commencent leur transition en iSC et à DIV7, la plupart des cellules présentes sur les neurites sont des iSC.



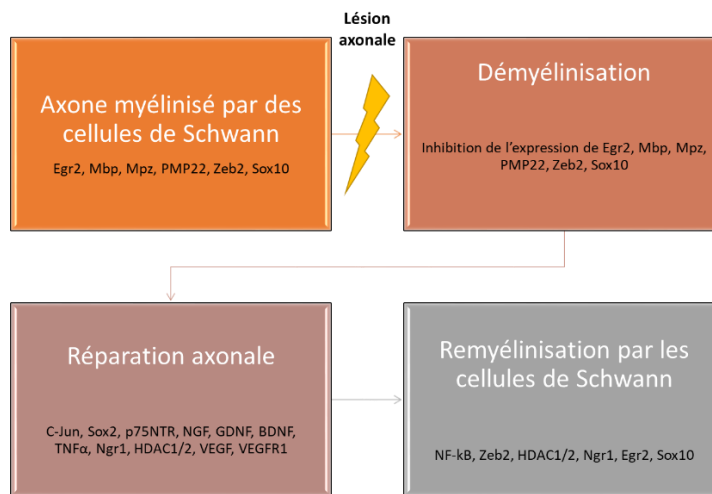
*Figure 4. Expression d'ARNm des marqueurs de la lignée des cellules de Schwann dans les nerfs périphériques embryonnaires* La quantification empirique présentée ici a été extrapolée à partir d'études de microarray réalisées sur des nerfs embryonnaires murins (Buchstaller, Sommer et al. 2004) ; (D'Antonio, Michalovich et al. 2006). *Figure tirée de l'article de Sundaram et al. 2021.*

## 1.2 Régénération et remyélinisation axonales suite à des lésions

Contrairement au SNC, le SNP présente une capacité de régénération élevée suite à des lésions (Nocera and Jacob 2020). Cela est dû à la plasticité des cellules de Schwann. En cas de lésion axonale, les cellules de Schwann myélinisantes et non myélinisantes (cellules de Remak) subissent une reprogrammation qui favorise et guide la réparation. Cette reprogrammation des cellules de Schwann peut être divisée en deux processus se chevauchant partiellement : la démyélinisation et la conversion en cellules de Schwann réparatrices. La démyélinisation est caractérisée par la répression de gènes pro-myélinisants tels que *Egr2* (ou *Krox20*), *Mbp*, *Mpz* (ou *P0*), *PMP22*, et *Mag*. De plus, certains gènes typiquement exprimés durant le développement sont réexprimés lors de la réparation tels que 'neural cell adhesion molecule' (NCAM), 'p75 neurotrophin receptor' (p75NTR) et 'glial fibrillary acidic protein' (GFAP). Cependant, les cellules de Schwann de réparation diffèrent des iSC ; ils sont caractérisés par l'expression de-novo de certains gènes (tels que *Olig1* et *Shh*) (Nocera and Jacob 2020), et aussi par l'augmentation de l'expression de nombreuses protéines impliquées dans les processus de réparation (**Figure 5**) :

- Une partie de ces protéines **favorise la survie des neurones lésés et la repousse des axones proximaux** (c-Jun, 'glial cell-derived neurotrophic factor' (GDNF), 'brain-derived neurotrophic factor' (BDNF), neurotrophin-3 (NT3), 'artemin, nerve growth factor' (NGF), 'vascular endothelial growth factor' (VEGF), et 'VEGF receptor 1') (Chen, Yu et al. 2007, Scheib and Höke 2013, Jessen and Mirsky 2019).
- Une deuxième partie de ces protéines **initie la réponse immunitaire, promeut l'invasion et l'activation des macrophages, induit la formation des vaisseaux sanguins et la dégradation de la myéline** ('leukemia inhibitory factor' (LIF), interleukine-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ) et -1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), 'tumor necrosis factor- $\alpha$ ' (TNF $\alpha$ ) et 'monocyte chemotactic protein 1' (MCP-1) (Cafferty, Gardiner et al. 2001, Martini, Fischer et al. 2008, Jessen and Mirsky 2019).
- Une troisième partie de ces protéines est **impliquée dans les changements morphologiques des cellules de Schwann et les interactions axogliales, dans la formation de liaisons nerveuses (en cas de transection nerveuse) et de pistes de régénération le long desquelles les axones repoussent** (c-Jun, Sox2 et neuréguline 1 (NRG1)) (Nocera and Jacob 2020).

- Une quatrième partie de ces protéines est impliquée dans la **remyélinisation des axones régénérés** ('zinc finger E-box-binding homeobox 2' (Zeb2), 'nuclear factor-kappa B' (NF-kB) et histone désacétylases 1 and 2 (HDAC1/2)) (Gomez-Sanchez, Pilch et al. 2017).



**Figure 5.** Résumé des facteurs principaux qui ont lieu lors de la réparation axonale suite à une lésion, ainsi que les principaux facteurs responsables de la régénération axonale.

En effet, les cellules de Schwann de réparation participent à la désintégration et à l'élimination des axones endommagés au cours du processus de dégénérescence wallérienne qui a lieu au niveau de la partie distale et qui est une période longue (par exemple un mois chez les rats (Gordon 2015)). Elles aident également à l'élimination des débris de myéline afin de créer un environnement favorable à la repousse au niveau du site de lésion. L'élimination des débris de myéline est réalisée par myélinophagie et par phagocytose, ainsi que par le recrutement et l'activation des macrophages. Ensuite, les cellules de Schwann sécrètent des facteurs trophiques qui favorisent la survie des neurones et la repousse axonale. Les cellules de Schwann de réparation et les cellules de Remak étendent ainsi de longs processus parallèles qui s'alignent en bandes appelées bandes de Büngner permettant de guider l'axone en repousse (bourgeonnement axonal) vers l'innervation de sa cible. Enfin, les cellules de Schwann prolifèrent, induisent une augmentation de l'expression des gènes pro-myélinisants, et se différencient à nouveau en cellules de Schwann myélinisantes qui myélinisent l'axone régénéré (Nocera and Jacob 2020). Il est important de noter que la régénération et la remyélinisation axonales suite à des lésions ne sont pas toujours suffisantes.

### 1.3 Limitations de la régénération axonale et de la récupération fonctionnelle

Dans le SNP, la régénération axonale et la récupération fonctionnelle suite à des lésions sont souvent décevantes. En effet, elles dépendent de l'âge du patient, du délai avant toute intervention chirurgicale, et du type de la lésion. De ce fait, la récupération fonctionnelle suite à un écrasement de nerfs est souvent plus avancée que celle suite à une section de nerfs, mais elle est aussi meilleure après des lésions distales qu'après des lésions proximales puisque les axones ne doivent parcourir qu'une courte distance pour atteindre leur tissu cible et donc ont plus de chance de reformer des connections entre eux (Scheib and Höke 2013). Malgré les avancements en chirurgie, les axones en régénération ne parviennent souvent pas à sélectionner leurs tubes endoneuraux d'origine et finissent par réinnervier des cibles qu'ils n'innervaient pas initialement (Thomas, Stein et al. 1987). Un autre défi majeur de la récupération fonctionnelle serait la diminution de la capacité de régénération neuronale après axotomie chronique (état dans lequel les neurones régénèrent leurs nerfs mais n'ont toujours pas établi de contact fonctionnel avec leurs cibles dénervées) (Gordon 2015). Les cellules de Schwann chroniquement dénervées diminuent en nombre et perdent progressivement leur phénotype de soutien et de support à la croissance (Gordon, Wood et al. 2018). Les fibres musculaires chroniquement dénervées conservent leurs cellules satellites qui fournissent des noyaux lorsque les fibres sont réinnervées (Carraro, Kern et al. 2015). Cependant, le nombre de cellules satellites ainsi que leur capacité proliférative sont limités puisque les fibres nerveuses retrouvent rarement leur taille initiale (Gordon, Tyreman et al. 2011) : certaines lésions engendrent des modifications nerveuses et des dysfonctionnements irréversibles causant ainsi des douleurs neuropathiques chroniques (Finnerup, Sindrup et al. 2007).

## II. Douleur neuropathique chronique (DNC)

### 1. Définition de la DNC

La douleur est une sensation sensorielle et émotionnelle désagréable associée à des lésions tissulaires réelles ou potentielles (Finnerup, Kuner et al. 2021). En effet, il existe trois types de douleur (Bernatoniene, Sciupokas et al. 2023) :

- La douleur nociceptive : c'est le résultat d'une lésion aigüe des tissus (muscles, articulations...) et s'estompe au fur et à mesure que la lésion guérit

- La douleur neuropathique : elle est causée soit par une maladie soit par une lésion au niveau du SNC ou du SNP

- La douleur nociplastique : c'est le résultat de l'altération de la nociception ; des stimulus normalement non douloureux deviennent douloureux bien qu'il n'y ait pas de lésion tissulaire apparente

Nous nous intéressons à la douleur neuropathique, qui est le résultat d'une signalisation neuronale aberrante (Finnerup, Kuner et al. 2021). Elle peut être causée par une compression nerveuse, des traumatismes du système nerveux, une neuropathie diabétique, ou une névralgie (Bernatoniene, Sciupokas et al. 2023). Les cellules immunitaires, la microglie et l'astroglie dans la moelle épinière, libèrent les cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-1 $\beta$ , qui jouent un rôle primordial dans l'étiologie et les mécanismes de la douleur neuropathique (Sacerdote, Franchi et al. 2013). De plus, l'inflammation stimule la synthèse de prostaglandines en induisant l'expression de la cyclo-oxygénase-2 (COX-2) (Gao and Ji 2010). Il est important de noter que la douleur neuropathique peut devenir chronique.

En effet, la douleur chronique est caractérisée par un traitement irrégulier des influx nerveux somatosensoriels dans le SNP ou le SNC qui dure plus de 12 semaines (Fasick, Spengler et al. 2015). La douleur neuropathique chronique (DNC) est donc une forme spécifique de la douleur chronique et touche entre 6,9% et 10% de la population mondiale. Elle est causée par un endommagement (une lésion) ou une maladie du système nerveux somatosensoriel qui englobe les fibres périphériques (fibres A $\beta$ , A $\delta$  et C) et les neurones centraux (Bethea and Fischer 2021). Les nerfs somatosensoriels ont pour origine la peau, les muscles, les articulations, et les fascias. Ils comprennent des thermorécepteurs, mécanorécepteurs, chimiorécepteurs, pruricepteurs, et nocicepteurs qui envoient des signaux à la moelle épinière et les acheminent finalement vers le cerveau pour un traitement ultérieur (Colloca, Ludman et al. 2017). Dans les conditions physiologiques, il existe des mécanismes protecteurs de réparation qui interviennent suite à des lésions du SNP. Cependant, les mécanismes pathologiques (des pathologies auto-immunes ou neurodégénératives, des cancers et de la chimiothérapie), ainsi que des prédispositions génétiques peuvent conduire à l'apparition de la DNC (Colloca, Ludman et al. 2017, Murphy, Bethea et al. 2017). Ainsi, des changements au niveau des canaux ioniques, la stimulation de cellules immunitaires, la production de substances par les cellules gliales, et la modulation de l'expression de certains gènes induisent une sensibilisation centrale et périphérique (**Tableau 1**Erreur ! Source du renvoi introuvable.)

(Bernatoniene, Sciupokas et al. 2023). De ce fait, les nerfs endommagés envoient des signaux en continu vers le cerveau, engendrant ainsi la sensation permanente de douleur (Finnerup, Kuner et al. 2021) (Szewczyk, Jamroz-Wiśniewska et al. 2022).

**Tableau 1. Récepteurs, canaux, et processus impliqués dans la douleur neuropathique chronique**

Cible	Rôle physiologique	Rôle dans la DNC suite à une lésion
Récepteurs NMDA	Plasticité synaptique, apprentissage, mémoire	Augmentation de l'influx de calcium suite à leur activation après une lésion → augmentation de la sensation de douleur
Récepteurs opiacés ( $\mu$ ), delta ( $\delta$ ) et kappa ( $\kappa$ )	Modulation de la douleur neuropathique	Altération de leur expression → réduction de l'efficacité des opioïdes endogènes et exogènes → diminution du soulagement de la douleur
Système endocannabinoïde (récepteur CB1 et CB2)	Modulation de la perception de la douleur	Modulation de l'excitabilité neuronale et inhibition de la libération de neurotransmetteurs
Canaux TRP (Transient Receptor Potential) (TRPV1, TRPA1, TRPM8)	Détection et transmission de signaux de douleur	<ul style="list-style-type: none"> <li>TRPV1 : activés par la chaleur, l'inflammation, et la capsaïcine ; contribue à l'hypersensibilité thermique</li> <li>TRPA1 : impliqués dans les réponses nociceptives au froid et aux irritants chimiques ; augmentent la sensibilité à la douleur</li> <li>TRPM8 : activés par le froid ; causent une allodynie et une hyperalgésie au froid</li> </ul>
Récepteurs GABA (acide gamma-aminobutyrique)	Inhibition de la neurotransmission vers le cerveau ; maintenance d'un équilibre entre excitation et inhibition pour le traitement de la douleur	Perturbation des signaux inhibiteurs → développement et maintien de l'hyperexcitabilité et augmentation de la sensibilité à la douleur
Récepteurs de la sérotonine (5-HT3 et 5-HT1A)	Modulation de la douleur neuropathique	Augmentation de la sensibilité à la douleur
Système noradrénergique	Modulation de la douleur neuropathique	Changements dans la libération de noradrénaline → modification de la perception de la douleur et chronicisation
Récepteurs purinergiques (P1 et P2)	Maintien du rythme cardiaque	Augmentation de la transmission de la douleur, favorisation de la neuroinflammation, et modulation de l'excitabilité neuronale → amplification des signaux de douleur
Canaux sodiques voltage-dépendants (Nav1.7, Nav1.8, et Nav1.9)	Propagation des potentiels d'action dans les neurones sensibles à la douleur	Augmentation d'expression et modification de distribution des canaux dans les neurones lésés → augmentation de l'excitabilité neuronale et de la douleur
Canaux calciques voltage-dépendants	Libération de neurotransmetteurs et excitabilité neuronale	Dérèglement des canaux calciques → déclenchement de l'inflammation, augmentation de la transmission synaptique excitatrice et hyperexcitabilité neuronale
Canaux potassiques	Régulation de l'excitabilité neuronale	Dérèglement des canaux potassiques → altération de l'hyperpolarisation, prolongation des potentiels d'action, et augmentation de l'excitabilité des neurones sensibles à la douleur
Canaux ioniques ASIC (Acid-sensing ion channels)	Signalisation de la douleur	Changement de pH et activation des ASIC → excitabilité neuronale, hyperalgésie, et hypersensibilité mécanique et thermique

Suite à des lésions nerveuses, les patients atteints de DNC présentent généralement des symptômes distincts tels que des brûlures, des sensations d'électricité, de l'allodynie (douleur résultant de stimulations non douloureuses), et de l'hyperalgésie (douleur exagérée suite à un stimulus douloureux). De plus, leurs symptômes sont accompagnés de troubles du sommeil, d'anxiété, de dépression, et de modifications majeures de la qualité de vie (Attal, Lanteri-Minet et al. 2011, Finnerup, Haroutounian et al. 2016). Il est ainsi important de trouver des traitements pour soigner la DNC et améliorer la qualité de vie des patients.

## 2. Traitements disponibles pour la DNC et effets secondaires

Il est important de souligner qu'il n'existe toujours pas de traitement efficace pour traiter la DNC (Finnerup, Kuner et al. 2021). En effet, le groupe 'Neuropathic Pain Special Interest group' (NeuPSIG), de l'International Association for the Study of Pain' (IASP), a publié des recommandations pour le traitement de la DNC (Finnerup, Attal et al. 2015). Les médicaments fortement recommandés sont les antidépresseurs tricycliques (TCA), la gabapentine, la prégabaline, et les inhibiteurs de la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline. Les médicaments faiblement recommandés sont les patchs de capsaïcine à 8 %, les patchs de lidocaïne et les injections sous-cutanées de toxine botulique de type A (Finnerup, Attal et al. 2015). Les opioïdes constituent la classe de médicaments la moins recommandée pour le traitement de la DNC puisqu'ils causent des effets secondaires indésirables tels que l'hyperalgésie, l'immunosuppression, et l'addiction (Bloms-Funke, Schumacher et al. 2022). L'absence de traitement efficace pour traiter la DNC a des répercussions sur la qualité de vie des patients ainsi que sur le système de santé en général (Bouhassira, Lanteri-Minet et al. 2008). C'est pourquoi il devient de plus en plus urgent de trouver des approches thérapeutiques pour répondre aux besoins de ces patients.

En effet, les thérapies combinant à la fois des actions analgésiques, neuroprotectrices, et neurorégénératives, ciblant à la fois plusieurs mécanismes pathologiques impliqués dans la DNC pourraient présenter des approches innovantes sans risque d'addiction. Un exemple de ces thérapies serait le composé GRT-X (Bloms-Funke, Schumacher et al. 2022).

### III. Le composé GRT-X

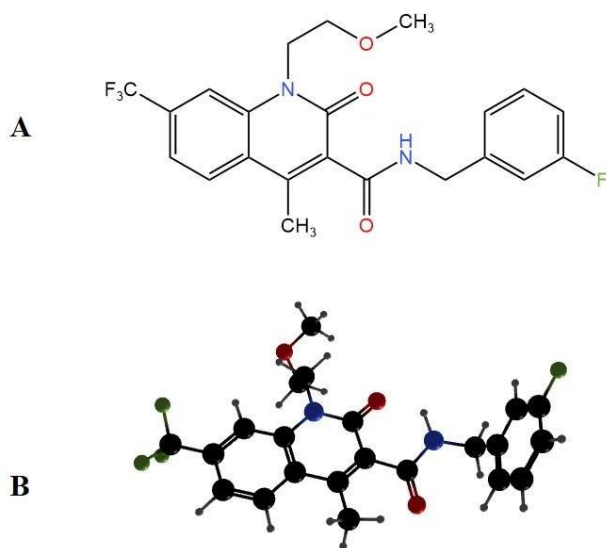
Le composé GRT-X (N-[(3-fluorophenyl)-methyl]-1-(2-methoxyethyl)-4-methyl-2-oxo-(7-trifluoromethyl)-1H-quinoline-3-carboxylic acid amide) (**Figure 6**) a été synthétisé lors de la recherche et du développement d'analgésiques activateurs des canaux potassiques voltage-dépendant Kv7. La composition du GRT-X diffère de celle de la rétigabine (activateur des Kv7 ; joue un rôle antiépileptique) par l'absence d'une composante GABA-ergique.

D'une part, un essai de fluorimétrie réalisé sur des cellules CHO-K1 recombinantes a montré que le GRT-X active les canaux potassiques Kv7.2/3 avec une puissance et une efficacité supérieure à celles de la rétigabine. Cela a été confirmé par des enregistrements de patch-clamp. De plus, le GRT-X active faiblement les canaux Kv7.4 et Kv7.5 et n'inhibe pas les Kv7.1 qui forment les complexes de canaux cardiaques, écartant ainsi l'hypothèse éventuelle d'effets cardiaques indésirables causés par le GRT-X. Outre cela, l'administration du GRT-X sur des cultures de DRG adultes conduit à une hyperpolarisation. Cet effet d'hyperpolarisation a été significativement et complètement inversé après l'ajout de l'antagoniste non sélectif des Kv7, le XE991 (Bloms-Funke, Bankstahl et al. 2022). Ces résultats confirment que le GRT-X active les Kv7, et plus spécifiquement les Kv7.2/3.

D'autre part, plusieurs études démontrent le rôle de TSPO dans la synthèse neurostéroïdienne, l'amélioration de la DNC, l'accélération de la repousse axonale, et la récupération fonctionnelle suite à des lésions chez les rongeurs (Papadopoulos, Fan et al. 2018). Il est intéressant de noter que lors d'un screening de récepteurs et de canaux ioniques, il a été démontré que le GRT-X se lie non seulement aux Kv7, mais également à la protéine mitochondriale transmembranaire TSPO (translocator protein) en l'activant. L'étude de l'affinité du GRT-X à TSPO a été réalisée *in vitro* sur des membranes de cœur de rats et sur la lignée cellulaire de glioblastome neuronal humain U-118 MG en utilisant le composé radioactif [<sup>3</sup>H]PK11195 (PK11195 étant un ligand de TSPO). Cette étude a démontré que le GRT-X se lie aux membranes de cœurs de rats avec une affinité élevée, et aux cellules U-118 MG avec une affinité modérée. De plus, les résultats montrent une augmentation de la synthèse de neurostéroïdes *in vitro* (cellules de gliome C6 de rat en culture) et *in vivo* (cerveaux de rats) suite à l'administration du GRT-X. Cela implique que la liaison du GRT-X à TSPO stimule le transport intramitochondrial du cholestérol et augmente ainsi la neurostéroïdogénèse.

La sélectivité du GRT-X a été étudiée dans le cadre d'études de profilage de cibles *in vitro*, en testant l'affinité du GRT-X avec plus de 140 cibles de différentes classes pharmacologiques (canaux ioniques, récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), transporteurs, kinases et autres enzymes). Il s'est avéré que le GRT-X n'a aucune interaction pertinente avec les différentes cibles testées.

Ainsi, le GRT-X active à la fois les canaux Kv7 (plus précisément les Kv7.2/3) (effet analgésique) et TSPO (effet neuroprotecteur et neurorégénérateur potentiellement), et aurait donc un double mode d'action (MoA) qui pourrait améliorer la DNC, atténuer la progression de la neuropathie, et contribuer à la récupération fonctionnelle (Bloms-Funke, Bankstahl et al. 2022).



**Figure 6.** *Structure du GRT-X (N-[(3-fluorophenyl)-methyl]-1-(2-methoxyethyl)-4-methyl-2-oxo-(7-trifluoromethyl)-1H-quinoline-3-carboxylic acid amide). (A) Structure chimique du GRT-X. (B) Représentation 2D du GRT-X.*

## 1. Les cibles du GRT-X

Pour mieux comprendre le mode d'action du GRT-X, il est important de comprendre les rôles de ses différentes cibles.

## 1.1 TSPO

Comme évoqué précédemment, l'étude réalisée par Bloms-Funke et al montre que le GRT-X se lie à TSPO (Bloms-Funke, Bankstahl et al. 2022). En effet, TSPO (translocator protein, 18 kDa) est une protéine ubiquitaire se trouvant au niveau de la membrane externe de la mitochondrie (Gavish and Veenman 2018). Elle est constituée de cinq hélices  $\alpha$  transmembranaires hydrophobes qui sont suffisamment longues pour s'étirer sur la bicouche lipidique, avec une extrémité C-terminale dans le cytosol et une courte extrémité N-terminale qui se trouve dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie. En outre, TSPO interagit avec le pore de transition de perméabilité mitochondriale (mPTP), formé par le canal anionique voltage-dépendant (VDAC, 30 kDa) situé au niveau de la membrane mitochondriale externe, et le translocateur du nucléotide adénine (ANT, 32 kDa), situé dans la membrane mitochondriale interne (Veenman, Shandalov et al. 2008). Le VDAC permet le passage de nucléotides, de métabolites et d'ions (dont le calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ )) entre l'espace intermembranaire mitochondrial et le cytoplasme. L'ANT échange de l'ATP libre avec de l'ADP libre à travers la membrane mitochondriale interne. TSPO est ainsi impliquée dans l'ajustement de l'ouverture et de la fermeture du mPTP. Cela pourrait conduire à l'apoptose par l'ouverture du mPTP, ou à la favorisation de la protection cellulaire par le blocage du mPTP (Elkamhawy, Park et al. 2017). L'expression basale de TSPO est nécessaire pour le maintien de l'homéostasie. En effet, TSPO est fortement exprimée dans les tissus synthétisant les hormones stéroïdiennes (cortex surrénal, gonades, placenta), et faiblement exprimée dans le cerveau (Bonsack and Sukumari-Ramesh 2018). La modification de l'expression basale de TSPO pourrait être le signe d'une pathologie. Pour cela, TSPO est de plus en plus utilisée comme biomarqueur de certaines maladies (maladie d'Alzheimer, de Parkinson, de Huntington, et la sclérose en plaque en PET scan (position emission tomography) (Nutma, Ceyzériat et al. 2021).

En outre, TSPO est également impliquée dans le métabolisme du cholestérol grâce à son interaction avec ce dernier par l'intermédiaire d'un long C-terminal extramitochondrial situé au niveau de l'hélice transmembranaire 5 (TM5) contenant un domaine de reconnaissance du cholestérol (CRAC). Il est important de noter que les études portant sur le rôle de TSPO dans la stéroïdogénèse sont controversées : en effet, certaines études montrent que la TSPO permet l'internalisation du cholestérol à l'intérieur de la mitochondrie et est donc indispensable à la

steroidogénèse, alors que d'autres études montrent que l'absence de la protéine mitochondriale n'affecte pas la synthèse de stéroïdes (Lacapère, Duma et al. 2020).

De plus, il a été démontré que des ligands spécifiques de TSPO permettent de diminuer la neuroinflammation (tels que les ligands 2-Cl-MGV-1 ((2-(2-chlorophenyl) quinazolin-4-yl dimethylcarbamate)) et MGV-1) (Monga, Nagler et al. 2019). Il est important de noter qu'il existe plusieurs ligands de TSPO qui jouent des rôles importants dans certaines pathologies :

- Etifoxine (commercialisé sous le nom de STRESAM®) : agoniste de TSPO, agit comme anxiolytique, module les réponses inflammatoires, promeut la régénération axonale et la récupération fonctionnelle (Girard, Liu et al. 2008, Li, Li et al. 2017).

- PK11195 (2-Chlorophenyl)-N-methyl-N-(1-methylpropyl)-3-isoquinolinecarboxamide) : peut agir comme agoniste ou antagoniste de TSPO dépendamment du contexte, réduit le dépôt de plaques  $\beta$ -amyloïdes solubles et améliore le comportement chez des modèles expérimentaux de la maladie d'Alzheimer, augmente la survie neuronale et inhibe l'activation microgliale chez des modèles expérimentaux de la maladie de Huntington (Leaver, Reynolds et al. 2012, Christensen and Pike 2018).

- XBD173 (N-Ethyl-7,8-dihydro-7-methyl-8-oxo-2-phenyl-N-(phenylmethyl)-9H-purine-9-acetamide, commercialisé sous le nom d'EMAPUNIL®) : agoniste de TSPO, diminue la dégénérescence des neurones dopaminergiques, préserve le métabolisme de la dopamine striatale, prévient les dysfonctionnements moteurs et diminue le stress cellulaire et l'apoptose chez un modèle expérimental de la maladie de Parkinson (Gong, Szego et al. 2019).

- Ro5-4864 : agoniste de TSPO, a un effet analgésique et remyélinisant suite à une lésion du nerf sciatique chez le rongeur, promeut la survie des motoneurones de la moelle épinière néonatale suite à l'axotomie du nerf sciatique, promeut la survie des motoneurones faciaux adultes après axotomie, diminue l'accumulation de plaques A $\beta$  dans l'hippocampe et améliore le comportement chez un modèle expérimental de la maladie d'Alzheimer (Mills, Makwana et al. 2008, Barron, Garcia-Segura et al. 2013, Gong, Szego et al. 2019).

Actuellement, il n'existe toujours pas d'outil pharmacologique agissant exclusivement en tant qu'antagoniste de TSPO. Ainsi, l'investigation du rôle de TSPO dans certains ligands (tel que GRT-X) nécessite le recours aux souris TSPO-KO pour bloquer l'expression de la protéine. En effet, le nom complet de ces souris est : C57BL/6-Tspotm1GuWu (GuwiyangWurra)-knockout mice (TSPO-KO). Pour obtenir ce modèle expérimental, des cellules souches embryonnaires contenant des sites loxP flanquant les exons 2 et 3 et une cassette de néomycine entre les

exons 3 et 4 au niveau de l'allèle Tspo sont injectées dans des souris C57BL/6. Les souris positives pour la présence d'allèles Tspo ciblés sont ensuite croisées avec des souris C57BL/6 Cre-deleted pour générer des souris hétérozygotes globalement déficientes en Tspo, qui sont ensuite accouplées avec des souris C57BL/6 sauvage pour supprimer le transgène Cre. Les souris sont génotypées par Southern blot en utilisant de l'ADN génomique isolé à partir de biopsies de la queue et amplifié par PCR (Liere, Liu et al. 2023).

TSPO est donc devenue une cible importante dans le suivi de plusieurs maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson et la maladie de Parkinson, en utilisant l'imagerie par radioligands de la TSPO en PET-scan. De plus, elle joue plusieurs rôles importants dans la diminution de la neuroinflammation, dans la neuroprotection, la régénération axonale, et la récupération fonctionnelle suite à des lésions. C'est pourquoi, nous avons rédigé un article de synthèse résumant les différentes fonctions de TSPO ainsi que les avancements dans son utilisation comme biomarqueur et comme traitement potentiel de certaines maladies. **Cet article a été publié en juillet 2022 dans le 'Biochemical journal' (El Chemali, Akwa et al. 2022) (DOI: 10.1042/BCJ20220050).**



## The mitochondrial translocator protein (TSPO): a key multifunctional molecule in the nervous system

Léa El Chemali, Yvette Akwa, Liliane Massaad-Massade

### ► To cite this version:

Léa El Chemali, Yvette Akwa, Liliane Massaad-Massade. The mitochondrial translocator protein (TSPO): a key multifunctional molecule in the nervous system. *Biochemical Journal*, 2022, 479 (13), pp.1455-1466. 10.1042/BCJ20220050 . hal-03805690

**HAL Id: hal-03805690**

**<https://hal.science/hal-03805690>**

Submitted on 7 Oct 2022

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**The mitochondrial Translocator protein (TSPO): a key multifunctional molecule in the nervous system**

Léa El Chemali, Yvette Akwa, Liliane Massaad-Massade\*

U1195 Diseases and Hormones of the Nervous System, Inserm and University Paris-Saclay,  
94276 Le Kremlin-Bicêtre, France

**\*Corresponding author: Liliane Massade**, PhD, Inserm U1195, 94276 Le Kremlin-Bicêtre, France, Email: [liliane.massade@inserm.fr](mailto:liliane.massade@inserm.fr)

## **Abstract**

Translocator protein (TSPO, 18 kDa), formerly known as peripheral benzodiazepine receptor, is an evolutionary well-conserved protein located on the outer mitochondrial membrane. TSPO is involved in a variety of fundamental physiological functions and cellular processes. Its expression levels are regulated under many pathological conditions, therefore TSPO has been proposed as a tool for diagnostic imaging and an attractive therapeutic drug target in the nervous system. Several synthetic TSPO ligands have thus been explored as agonists and antagonists for innovative treatments as neuroprotective and regenerative agents. In this review, we provide state-of-the-art knowledge of TSPO functions in the brain and peripheral nervous system. Particular emphasis is placed on its contribution to important physiological functions such as mitochondrial homeostasis, energy metabolism and steroidogenesis. We also report how it is involved in neuroinflammation, brain injury and diseases of the nervous system.

**Key words:** Translocator protein (TSPO), steroidogenesis, neuroinflammation, biomarker, neuropathology, neuroprotection

## **Introduction**

Discovered in 1977 as an alternative binding site for the benzodiazepine diazepam, the 18-kDa translocator protein (TSPO1) belongs to a family of tryptophan-rich sensory proteins (1). TSPO1 possesses a highly conserved sequence from plants to humans. It is widely present in most Eukarya, Archae, and Bacteria (2). *Tspo1* gene is located on the long arm of human chromosome 22 (q13.2) and encodes a hydrophobic 18kDa TSPO1 protein carrying 169 amino-acids (3, 4). Notably, TSPO from *Rhodobacter sphaeroides* (RsTSPO) shares only 34% sequence identity with the human and rat proteins while highly conserving functional properties (5).

TSPO is a ubiquitous mitochondrial protein located on the outer mitochondrial membrane (OMM) as part of a multimeric (140-200 kDa) protein complex (6) (7). TSPO consists of five hydrophobic transmembrane  $\alpha$  helices which are long enough to stretch over the bilayer membrane, with the carboxyl-terminus in the cytosol and a short amino-terminus in the intermembrane space of mitochondrion. Also, TSPO interacts with the so-called mitochondrial permeability transition pore (mPTP), formed by the 30 kDa voltage-dependent anion channel (VDAC) located in the outer mitochondrial membrane, and the 32 kDa adenine nucleotide translocator (ANT) in the inner mitochondrial membrane (IMM) (8). Indeed, VDAC allows the passage of nucleotides, metabolites and ions including calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) between the mitochondrial inter-membrane space and cytoplasm (9). ANT exchanges free ATP with free ADP across the inner mitochondrial membrane (10). TSPO is involved in adjusting the opening and the closure of the mPTP. This could lead to either apoptosis via mPTP opening, or promotion of cell protection by mPTP blocking (11). TSPO is involved in the cholesterol metabolism because it can interact with it *via* a long extramitochondrial C-terminal of the transmembrane 5 (TM5) helix containing a cholesterol-recognition amino acid consensus (CRAC) domain (2).

TSPO2, a paralog of TSPO1 was identified in mice, rats, and humans. It emerged from an old duplication of TSPO1. While the expression of TSPO1 is ubiquitous, TSPO2 is erythroid-specific and is located at the endoplasmic reticulum (ER), nuclear and plasma membranes (12). Similar to TSPO1, TSPO2 has the ability to bind cholesterol. Moreover, TSPO2 plays important roles in cholesterol redistribution during erythrocyte maturation (6, 13).

In this review, we focus on TSPO1 and the term “TSPO” refers to it. We will focus on the role of TSPO in the nervous system and will show its crucial role in neurogenesis, inflammation and steroidogenesis. We will also point the role of TSPO ligands able to reconstitute its basic expression

in the nervous system in order to avoid the development of neurodegenerative diseases. The input of TSPO in diagnosis as well as the use of new ligands for PET-Scan able to monitor its expression will be developed.

### **I- TSPO basal expression level is necessary to maintain homeostasis**

Tissue biodistribution of TSPO is highly conserved among species from bacteria to rodents to mammalian (14). However, the magnitude of TSPO basal expression TSPO is tissue-dependent (**Figure 1**). TSPO is found predominantly expressed in tissues synthesizing steroid hormones i.e., adrenal cortex, gonads and placenta (9) (14). In contrast, TSPO expression levels are low in the central nervous system (CNS) (15). Noteworthy, high levels of TSPO are found in steroid producing peripheral tissues other than reproductive organs, such as nasal epithelium, heart and lungs (9) (16). Within the brain, the rate of TSPO expression depends on the cell type. Higher TSPO levels are seen in glial cells, in particular microglia (17), as compared with neurons (18). Such low TSPO basal expression levels in the brain may be important for the maintenance of homeostasis. Indeed, increased TSPO levels are often concomitant with glial cell activation associated with neuroinflammation. However, the stimulation of neuronal activity increases TSPO gene and protein levels in neurons, but not in microglia or astrocytes as recently reported by Notter et al. (19).

### **II- Role of TSPO in steroidogenesis**

#### a) TSPO is involved in the steroidogenesis of the CNS

One of the most debated roles of TSPO is its involvement in steroidogenesis of the CNS. Cholesterol is the main precursor of several steroid hormones, such as cortisol, aldosterone, estradiol and testosterone. Steroids are mainly synthesized by the gonads and the adrenal glands

and are well known to be involved in the development of sex secondary characteristics, reproduction, and regulation of blood pressure (20). Steroids also interact with the CNS and influence the activity and plasticity of glial cells and neurons during early development. They also have protective effects in the adult CNS (21).

The involvement of TSPO in steroidogenesis has been suggested and approved for over 30 years of research using genetic, biochemical and pharmacological approaches (22). It is important to note that discrepancies exist concerning the involvement of TSPO in steroidogenesis.

On the one hand, the importance of TSPO in steroidogenesis *via* its binding to cholesterol can be explained by the nature of each partner. The cholesterol is a highly lipophilic molecule that cannot cross the mitochondrial membrane without TSPO (**Figure 2**). Therefore, cholesterol can interact with TSPO *via* the “cholesterol recognition amino acid consensus (CRAC)” with a nanomolar affinity (23). The resulting amphiphilic molecule can diffuse into the inner mitochondrial membrane where its aliphatic tail can be cleaved by the CYP11A1 enzyme. This steroidogenic enzyme converts cholesterol into pregnenolone, which is the precursor of several steroids (24). Brain steroidogenic pathways and enzymes catalyze the production of neurosteroids. Pregnenolone, progesterone and its 5 $\alpha$ -reduced metabolites (5 $\alpha$ -dihydroprogesterone, 5 $\alpha$ -DHT and 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -tetra-hydroprogesterone, 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -THP also called allopregnanolone), testosterone and its-5 $\alpha$ -reduced derivatives (5 $\alpha$ -dihydrotestosterone, 5 $\alpha$ -DHT and 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -tetra-hydrotestosterone, 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -THP) and 17 $\beta$ -estradiol (E2) are well described as major neuroactive steroids. It is noteworthy that these steroids/enzymes are present in the human brain (25). Steroids present in the nervous system are either synthesized *de novo* from cholesterol or from a precursor arising from steroid peripheral sources through blood circulation (**Figure 2**).

It was also reported that synthetic TSPO ligands PK11195 and Ro5-4864 could promote steroidogenesis because they bind to TSPO with the same nanomolar affinity as cholesterol (26-28).

*In vitro*, it has been shown that the steroidogenic efficacy was increased in a glioma cell line as long as these ligands interact with TSPO (28, 29).

*In vivo* studies further confirmed the involvement of TSPO in steroidogenesis in the CNS. In fact, when etifoxine is injected intraperitoneally in rats at 50 mg/kg, neurosteroids synthesis was promoted. The animals showed an increase in brain pregnenolone, progesterone, 5 $\alpha$ -dihydroprogesterone and allopregnanolone concentrations by two to four-fold, compared to controls injected only with the vehicle (30). These results are consolidated by the Barron *et al.* group in TSPO-KO mice. A significant decrease in the brain production of progesterone, allopregnanolone, and dehydroepiandrosterone (DHEA) was observed in the TSPO-KO mice (31). The modulation of steroid hormones in the brain is probably the consequence of its modulation in plasma. This explanation was given by Barron *et al.* and Owen *et al.* Barron *et al.* suppressed the expression of TSPO using Cre-driven deletion techniques on C57BL/6 mice. Global steroid production levels were decreased in the KO mice (32).

Owen *et al.* performed their study on global TSPO-KO Sprague-Dawley rats using the “Zinc Finger Nuclease” technology. They also demonstrated a lethal effect due to the global deletion of TSPO: after the transfer of fertilized oocytes, the percentage of surviving animals was low. Moreover, the esterified cholesterol had not been efficiently metabolized, leading to increased lipid accumulations in steroid synthesizing tissues. Moreover, in the same paper, Owen *et al.* investigated the steroidogenic involvement of TSPO in response to stress. They focused on the TSPO single-nucleotide polymorphism (SNP) rs6971, previously described by Costa *et al.* (33).

SNP is due to a missense mutation that causes the replacement of the amino acid alanine with threonine (Ala147Thr), near the CRAC domain. This mutation was previously associated with anxiety disorders. Decreased cortisol levels after ACTH administration were observed in heterozygous and 147Thr homozygous patients, in comparison to healthy Ala147 homozygotes. This suggests that the minor allele of rs6971 SNP impairs normal ACTH-induced cortisol production in humans and reinforces the role of TSPO in CNS steroidogenesis (7). From our point of view, the CNS steroidogenesis cannot take place without the involvement of TSPO that we argue by the convincing results of Barron et al. and Owen et al. They used the same method of analysis (HPLC/MS) to assess steroid levels methods who reflected those observed in the determination of steroids in human tissue.

#### b) TSPO is not involved in serum steroid levels

The release of four manuscripts in 2014 and 2015 did not show the involvement of TSPO in serum steroidogenesis. In fact, these research groups showed normal steroid levels *in vitro* and *in vivo* after TSPO knockout (34-37). One of these studies showed that in mice carrying TSPO deletion in Leydig cells, the production of both adrenal and gonadal steroid hormones was still normal. Moreover, testosterone production, testis development, sperm count, and fertility were not modified by TSPO deletion (37).

The other studies done *in vitro* did not depict deficits in the mitochondrial cholesterol transport in the TSPO knockout MA-10 cells (35) or in steroid hormone production, depicting that steroidogenesis is not mediated by TSPO even after exposition of TSPO knockout MA-10 cells to PK11195 (38).

The difference observed in the involvement of TSPO in serum and CNS can be explained by the fact that steroids in the nervous system may be synthesized locally or from the bloodstream.

Indeed, the majority of steroids secreted by endocrine glands, with the exception of ester sulfates, readily cross the blood-brain barrier. It is therefore difficult to distinguish between the functions of locally synthesized neurosteroids and those of circulating steroid compounds. Moreover, steroidogenesis pathways are complex and compensatory mechanisms could occur. TSPO2 expression is erythroid-specific and located in the ER, nuclear and plasma membranes whereas TSPO1 is known to be ubiquitous. Compensatory mechanisms could occur in the tissues where they are co-expressed; this could explain the divergence between the results observed in the CNS and the plasma.

### **III- Relationship between TSPO and neuroinflammation**

In the last decade, many studies have reported changes in TSPO basal expression in various forms of brain injury and diseases, in which neuroinflammation is one of the main hallmarks. At the cellular level, differential increases in TSPO rates between health and pathology are thought to be a reflection of microglial and astroglial activation, and sometimes peripheral macrophage infiltration (39) (**Figure 2**).

#### a) Modulation of TSPO expression under neuroinflammatory states

TSPO expression constitutes a biomarker of brain inflammation and reactive gliosis that can be monitored by using TSPO ligands as neuroimaging agents. Positron Emission Tomography (PET) imaging is currently accepted as an appropriate method to depict the modulation of TSPO expression (40). This non-invasive technique has allowed detecting increased expression levels of TSPO in the CNS in primarily non-inflammatory neurological disorders such as Alzheimer's disease (AD), Parkinson's disease (PD), Huntington's disease (HD), as well as diseases where

inflammation is the primary cause such as Multiple Sclerosis (MS) and amyotrophic lateral sclerosis (ALS) (14).

The first PET tracer used to assess TSPO expression levels in neuroinflammation was the C-labeled PK11195 (full name 1-(2-chlorophenyl)-N-[<sup>11</sup>C]methyl-N-(1-methylpropyl)-3-isoquinolinecarboxamide; [<sup>11</sup>C]-PK 11195) (41). The binding of this radiotracer was highly non-specific due to its lipophilicity, low brain uptake, and poor metabolic profile. It gave poor signal-to-noise ratio, making its quantification difficult (42, 43). Also, the half-life of this radiotracer is short (20.4 min), which is limiting for clinical trials.

Yasuno *et al.* demonstrated that [<sup>11</sup>C]DAA1106 binding to TSPO was significantly increased in brains of subjects with mild cognitive impairment (MCI) in comparison with healthy controls, thus indicating that microglial activation may occur before the onset of AD (44). However, this needs further confirmation. [<sup>18</sup>F]DAA1106 is another TSPO radioligand derived from the phenoxyarylacetamide class. Autoradiography studies performed on postmortem AD brains using [<sup>11</sup>C]DAA1106 showed a significantly higher binding in the hippocampus, the temporal and parietal cortices, the basal ganglia and the thalamus, thus demonstrating that [<sup>11</sup>C]DAA1106 is an appropriate marker of activated microglia with upregulated TSPO in AD (45).

[<sup>18</sup>F]FEDAA1106 (full name (N-(5-fluoro-2-phenoxyphenyl)-N-(2-(2-fluoroethoxy)-5-methoxybenzyl) acetamide)), also derived from the phenoxyarylacetamide class, has been recently studied as a potential tool to visualize TSPO *in vivo*. The radioligand showed a good binding affinity to TSPO (0.078 nmol/L) and high lipophilicity ( $\log D = 3.81$ ) (46). However, [<sup>18</sup>F]FEDAA1106 cannot be used to monitor microglial activation in AD and MS. Its brain distribution volumes ( $V_T$ ) and the binding potential (BP) are not significantly different between AD and healthy and between patients with multiple sclerosis (MS) and healthy individuals (47).

Vinpocetine is a vinca alkaloid compound conceived as a PET tracer labeled with  $^{11}\text{C}$  ( $[^{11}\text{C}]$  vinpocetine) with a high affinity to TSPO (16). No significant changes in radioactivity were seen between AD and healthy control brains (48), or between the binding potential of  $[^{11}\text{C}]$  vinpocetine and  $[^{11}\text{C}]$ -PK 11195 (49).

The new developed TSPO radioligands also may have limitations due to the variability of TSPO binding potential (BP), resulting from a single nucleotide polymorphism (*rs6971*) in the *Tspo* gene (50), thus affecting the binding affinity of TSPO to its ligands. The development of third-generation PET-tracers, not affected by this substitution, might overcome this problem.

Of great interest is the use of TSPO PET scan in clinical trials. The radiotracer  $[^{11}\text{C}]$ PBR28 is currently used to measure post-stroke brain inflammation in patients aged 18-85 years and undergoing a recent moderate ischemic stroke (within the last 10 days) (ClinicalTrials.gov: NCT03662750). It is also tested to study changes in the brain after a traumatic brain injury (TBI) as compared to healthy controls, and the study is currently in phase 2 (ClinicalTrials.gov: NCT01547780). While the work cited above deals with global neuroinflammation, microglial activation is precisely assessed by using  $[^{18}\text{F}]$ PBR111 in patients with MS as compared to healthy controls (ClinicalTrials.gov: NCT01428505). PET-scanning is not only informative in acute brain injury, but also in neurodegenerative diseases.

TSPO PET imaging is also a reliable biomarker in animal models of neurodegenerative diseases. Indeed, the up regulation of TSPO levels is confirmed in two mouse models of AD. In APP/PS1dE9 transgenic mice, the microglia/macrophage marker Iba1 colocalizes with high TSPO levels in all brain regions studied, i.e. cortex, hippocampus, cerebellum striatum, except the thalamus (51). In 5XFAD mice, which carry five familial AD mutations, TSPO was highly expressed in A $\beta$  plaques associated microglia, a typical feature of AD (9). Therefore, TSPO

expression in the brain is linked to activated state of microglia and infiltrating macrophages (39). In support of this statement, two *in vitro* studies demonstrated that the absence of TSPO accelerates the evolution of neuroinflammation. The first study demonstrates that BV2 microglia murine cells transfected with TSPO-targeting siRNA have increased levels of pro-inflammatory mediators such as interleukin 6 (IL-6) and tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). In addition, the authors show that TSPO-knockdown reduced the anti-inflammatory effects of PK1195 and Ro5-4864 (52). The second study reports that the knockdown of TSPO in RAW264.7 macrophage murine cells results in an increase of the hemin-induced release of pro-inflammatory cytokines (53). Since chronic inflammation could lead to the development of neurodegenerative diseases (54), we postulate that the absence of TSPO could be an important risk factor in the progression of such pathologies. However, it is important to note that discrepancies in the role of TSPO in neuroinflammation exist between species, particularly between humans and rodents, despite the sequence similarity. Owen et al. showed that TSPO expression levels were not increased in human adult microglia (HAM) neither after a classic pro-inflammatory stimulus (IFN $\gamma$ /LPS), nor after a stimulus of reparative activation (IL4/IL13). Surprisingly, TSPO levels were decreased after the pro-inflammatory activation of human monocyte-derived macrophages (MDM). In contrast, the pro-inflammatory stimuli caused increases in TSPO levels in rodent MDM and primary monocytes (55).

#### b) Dampening of neuroinflammation by TSPO ligands

Two TSPO ligands, 2-Cl-MGV-1 ( (2-(2-chlorophenyl) quinazolin-4-yl dimethylcarbamate)) and MGV-1 (2-phenylquinazolin-4-yl dimethylcarbamate), have been shown to contribute to the attenuation of neuroinflammation in lipopolysaccharide (LPS)-treated microglia BV-2 cells, by

decreasing their IL-1 $\beta$ , IL-6, tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) and interferon gamma (IFN $\gamma$ ) (56). In the same cellular model of activated LPS-treated microglia BV-2 cells, two other TSPO ligands, 2-U-M6V-1 (2-(2-chlorophenyl) quinazolin-4-yl dimethylcarbamate) and M6V-1 (2-phenylquinazolin-4-yl dimethylcarbamate) also display anti-inflammatory effects. The underlying mechanisms involve the decreased production of interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-6, (TNF- $\alpha$ ), and (IFN- $\gamma$ ), as well as an inhibition of NF- $\kappa$ B p65 activation (56).

Moreover, TSPO ligand etifoxine (Stresam®) enhanced the neurite outgrowth in PC12 cells and after nerve injury (57). Etifoxine also promoted neuroprotection in a mouse model of intracerebral hemorrhage by reducing leukocyte infiltration into the brain and microglial production of IL-6 and TNF- $\alpha$ , thus attenuating cell death (58). PK11195, another high affinity TSPO ligand, promotes neuroprotection by dampening neuroinflammation in male SPF C57/BL6 mice treated with LPS injections (59). PK11195 was found to enhance neuronal survival by inhibiting microglial activation in excitotoxic injured rats after quinolinic acid injection into the striatum (60). Taken together, these results depict the important outcomes of TSPO ligands for preventing neuroinflammation.

#### **IV- TSPO and Reactive Oxygen Species**

Reactive oxygen species (ROS) are free radicals derived from molecular oxygen (61). When overproduced, they lead to oxidative stress which can damage DNA, proteins, and lipids. This could result in the induction of several neurodegenerative diseases. Given the fact that mitochondria are the main source of ROS production (62), that ROS overproduction is deleterious for cells and that TSPO is located on the OMM, understanding how TSPO affects ROS levels needs to be addressed. It is known that cholesterol entry into the mitochondria

through TSPO regulates the activity of the ATP synthase which is responsible for ROS production (**Figure 3**). This results in the oxidation of cardiolipin, along with mPTP opening followed by ATP and Ca<sup>2+</sup> release and mitochondrial membrane depolarization. Cytochrome c is then free to go into the cytosol due to the opening of the Bax/Bak channel after depolarization, and thus initiating apoptosis (63).

Moreover, it is well established that mitophagy takes place in damaged mitochondria. Mitophagy consists of selectively delivering damaged mitochondria for lysosomal degradation through the phosphatase and tensin homolog (PTEN)-induced putative protein kinase 1 (PINK1) and PARK2 pathway (PINK1-PARK2 pathway) (64). PINK1 selectively accumulates on the outer depolarized mitochondrial membrane and recruits the cytosolic E3 ubiquitin ligase (PARK2) (65). PARK2 then ubiquitinates the proteins located on the outer mitochondrial membrane and activates sequestosome 1 (SQSTM1), which leads to autophagy (66). It has been suggested that VDAC1–interacts with PARK2 and plays a role in its recruitment and function through the mitophagy process. When the ratio of TSPO/VDAC1 expression increases, ROS production increases, thus decreasing the efficiency of the ubiquitin-dependent mitophagy (67). In mouse embryonic fibroblasts, the increase in TSPO expression positively correlates with ROS production which modulates the levels of the autophagy marker LC3B-II, and alters the ubiquitination of proteins involved in mitophagy (67). Therefore, one can conclude that modulation of mitophagy by TSPO is independent from cholesterol binding, and mainly relies on the interactions with the VDAC1.

In the CNS, the main molecular compound controlling ROS is the NADPH oxidase (NOX2). It has been suggested by Guilarte et al. that interactions between TSPO and NOX2 (NOX2), which produces ROS, may activate the transcription factor Nrf2 (68). This transcription factor is

implicated in redox homeostasis and antioxidant responses. Such interactions may work together in controlling ROS release in microglia, especially under chronic neuroinflammatory conditions (68).

The link between TSPO and ROS is well-documented *in vitro*. TSPO knockdown significantly increases ROS production in BV-2 microglia (69). TSPO ligands etifoxine and XBD173 suppress ROS production and increase antioxidant capacity in RF/6A chorioretinal cells treated with oxidized low-density lipoprotein oxLDL—an inducer, of ROS production (70, 71). In addition, PK11195 decreases basal ROS generation in Balb/c mice primary peritoneal macrophages (72). Ro5-4864 reduces ROS production in glucose-deprived astrocytes, compared to controls (73). Taken together, the previous findings highlight the cellular protective role of TSPO ligands against ROS damages in the CNS, and focus on the regulatory role of TSPO in the modulation of ROS expression levels.

## **V. TSPO, neuroprotection and neuroregeneration**

### a) Effects of TSPO ligands on neuron survival

TSPO ligand Ro5-4864 (full name (7-chloro-5-(4-chlorophenyl)-1,3-dihydro-1-methyl-2H-1,4-benzodiazepine-2)) promotes neuroprotection, as shown by its dampening outcome on pain in rats with traumatic brain injuries, and its enhancing effect on neurons survival (74). Similar results were observed by Ma *et al.* after sciatic nerve lesions in Sprague-Dawley rats (75). In addition, Ro5-4864 protected cultured neonatal DRG from cell death, but not adult neurons (76). TSPO ligand etifoxine (Stresam®) enhanced the neurite outgrowth in PC12 cells (57). Also, the administration of Ro5-4864 *in vivo* enhanced spinal neonatal motoneurons survival after sciatic nerve axotomy (76).

Recently, GRT-X (N-[(3-fluorophenyl)-methyl]-1-(2-methoxyethyl)-4-methyl-2-oxo-(7-trifluoromethyl)-1H-quinoline-3-carboxylic acid amide), a novel drug which can activate both the voltage-gated potassium channels of the Kv7 family and TSPO, has been shown to enhance survival and accelerate regrowth of sensory and motor neurons after severe crush lesion of cervical spinal nerves in rats (a rat model of chronic neuropathic pain) (77). Further studies are needed to assess the GRT-X efficiency in human neuronal survival.

#### b) Neuroprotective effects of TSPO ligands after nerve injury

TSPO ligands exhibit a wide range of neuroprotective activities. PK11195 enhances neuronal survival by inhibiting microglial activation in excitotoxic injured rats after quinolinic acid injection into the striatum (60). Another TSPO ligand, the SSR180575 (full name, indoleacetamide-derived 7-chloro-N,N,5-trimethyl-4-oxo-3-phenyl-3,5-dihydro-4H-pyridazino[4,5-b] indole-1-acetamide, SSR180575), promotes functional recovery in young rats following facial nerve injury (78). Following traumatic cortical brain damage in rats, etifoxine is neuroprotective through several mechanisms including reduction of apoptosis, enhancement of neuronal survival, restoration of mitochondrial oxidative phosphorylation and is associated with improved cognitive outcomes (79, 80). In the model of chronic neuropathic pain involving cervical spinal nerve lesion, GRT-X accelerates the rate of recovery of normal function in sensory and motor neurons, indicative of its efficient role in promoting neuroregeneration (77).

#### c) Neuroprotective effects of TSPO ligands in neurodegenerative diseases

With regards to AD, Ro5-4864 reverses  $\beta$ -amyloid accumulation, gliosis, and behavioral impairment, in the triple transgenic (3xTgAD) mouse model of AD (81). Similarly, PK11195 attenuates  $\beta$ -amyloid pathology and impaired behaviors in aged 3xTg-AD female mice (82) as well as in SPF C57/BL6 male mice injected with LPS (59). Two new TSPO ligands, named 2a

and 2b, also exert beneficial effects in a cellular model of AD- related tauopathy presenting mitochondrial impairments, by increasing ATP synthesis mitochondrial membrane potential, as well as pregnenolone synthesis (83). Based on these data, TSPO ligands behave as potential anti-alzheimer agents targeting several cellular mechanisms.

On the other hand, the TSPO ligand EMAPUNIL® (XBD173) displays beneficial effects on the well-known MPTP-induced mouse model of PD by preserving striatal dopamine depletion and preventing motor deficits (84). Treatment with XBD173 also improves clinical and neuropathological features (oligodendroglial regeneration and decreased peripheral immune cell infiltration of the spinal cord) in the mouse model of MS, known as experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), inducing an inflammatory demyelination (85). **Table 1** summarizes the activities of TSPO ligands and their beneficial effects on neuroinflammation and CNS pathologies.

## **Conclusion**

As evidenced in this review, TSPO plays a key role in the nervous system. It maintains homeostasis and regulates intramitochondrial cholesterol transfer and its cleavage into pregnenolone, the first and major pathway for neurosteroids production. Proofs of TSPO involvement in brain steroidogenesis are partly related to the TSPO ligand-induced stimulation of endogenous steroid levels in the rodent brain, under physiological or pathological conditions. Several TSPO targeted molecules, tested in preclinical studies, have proved their efficacy as neuroprotective, anti-inflammatory and regenerating agents, and in counteracting damages caused by ROS in the nervous system. In the meantime, TSPO has become an important target in the follow-up of several neurodegenerative diseases such as AD, HD, and PD using PET TSPO radioligand imaging. To conclude, ongoing advanced clinical trials with three TSPO ligands

(etifoxine, XBD173, PK11195) will definitely give their potential therapeutic efficiencies in CNS and PNS diseases.

## Funding

This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (Grant FOR 2858). We are thankful to Doctor Suzan Boutary for her valuable comments.

## References

1. Papadopoulos V, Baraldi M, Guilarte TR, Knudsen TB, Lacapère JJ, Lindemann P, et al. Translocator protein (18 kDa): new nomenclature for the peripheral-type benzodiazepine receptor based on its structure and molecular function. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2006;27:402-9.
2. Lacapere JJ, Duma L, Finet S, Kassiou M, Papadopoulos V. Insight into the Structural Features of TSPO: Implications for Drug Development. *Trends Pharmacol Sci*. 2020;41(2):110-22.
3. RIOND J, MATTEI MG, KAGHAD M, DUMONT X, GUILLEMOT JC, FUR G, et al. Molecular cloning and chromosomal localization of a human peripheral-type benzodiazepine receptor. *European Journal of Biochemistry*. 1991;195:305-11.
4. Liu GJ, Middleton RJ, Hatty CR, Kam WW, Chan R, Pham T, et al. The 18 kDa translocator protein, microglia and neuroinflammation. *Brain Pathol*. 2014;24(6):631-53.
5. Yeliseev AA, Krueger KE, Kaplan S. A mammalian mitochondrial drug receptor functions as a bacterial "oxygen" sensor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(10):5101-6.
6. Gavish M, Veenman L. Regulation of Mitochondrial, Cellular, and Organismal Functions by TSPO. *Adv Pharmacol*. 2018;82:103-36.
7. Owen DR, Fan J, Campioli E, Venugopal S, Midzak A, Daly E, et al. TSPO mutations in rats and a human polymorphism impair the rate of steroid synthesis. *Biochem J*. 2017;474(23):3985-99.
8. Veenman L, Shandalov Y, Gavish M. VDAC activation by the 18 kDa translocator protein (TSPO), implications for apoptosis. *J Bioenerg Biomembr*. 2008;40(3):199-205.
9. Shoshan-Barmatz V, Pittala S, Mizrahi D. VDAC1 and the TSPO: Expression, Interactions, and Associated Functions in Health and Disease States. *International journal of molecular sciences*. 2019;20(13).
10. Chen XJ. Induction of an unregulated channel by mutations in adenine nucleotide translocase suggests an explanation for human ophthalmoplegia. *Hum Mol Genet*. 2002;11(16):1835-43.
11. Elkamhawy A, Park JE, Hassan AHE, Pae AN, Lee J, Park BG, et al. Design, synthesis, biological evaluation and molecular modelling of 2-(2-aryloxyphenyl)-1,4-dihydroisoquinolin-3(2H)-ones: A novel class of TSPO ligands modulating amyloid- $\beta$ -induced mPTP opening. *Eur J Pharm Sci*. 2017;104:366-81.
12. Kiatpakdee B, Sato K, Otsuka Y, Arashiki N, Chen Y, Tsumita T, et al. Cholesterol-binding protein TSPO2 coordinates maturation and proliferation of terminally differentiating erythroblasts. *J Biol Chem*. 2020;295(23):8048-63.
13. Fan J, Lindemann P, G.J. Feuilleley M, Papadopoulos V. Structural and Functional Evolution of the Translocator Protein (18 kDa). *Current Molecular Medicine*. 2012;12:369-86.
14. Nutma E, Ceyzériat K, Amor S, Tsartsalis S, Millet P, Owen DR, et al. Cellular sources of TSPO expression in healthy and diseased brain. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2021;49(1):146-63.
15. Bonsack F, Sukumari-Ramesh S. TSPO: An Evolutionarily Conserved Protein with Elusive Functions. *International journal of molecular sciences*. 2018;19(6).

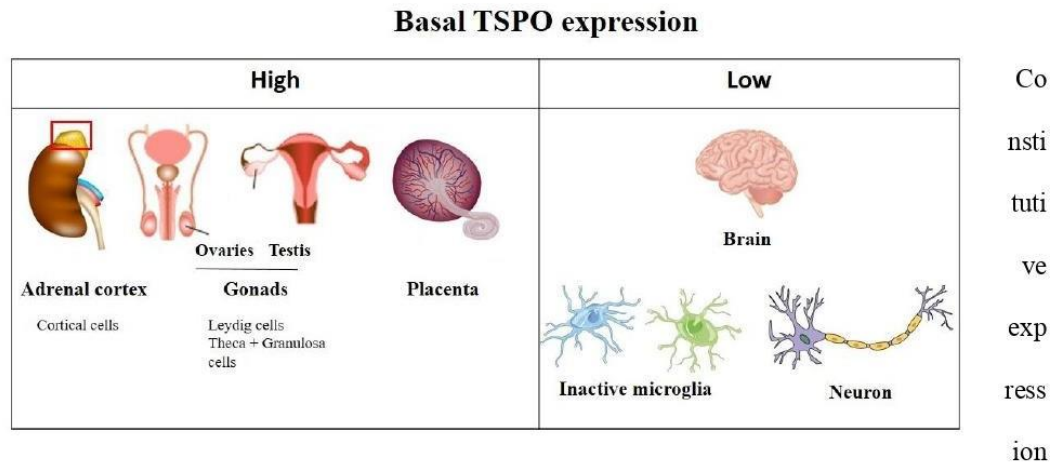
16. Zhang L, Hu K, Shao T, Hou L, Zhang S, Ye W, et al. Recent developments on PET radiotracers for TSPO and their applications in neuroimaging. *Acta Pharm Sin B*. 2021;11(2):373-93.
17. Chen MK, Guilarte TR. Translocator protein 18 kDa (TSPO): molecular sensor of brain injury and repair. *Pharmacol Ther*. 2008;118(1):1-17.
18. Papadopoulos V, Lecanu L. Translocator protein (18 kDa) TSPO: an emerging therapeutic target in neurotrauma. *Exp Neurol*. 2009;219(1):53-7.
19. Notter T, Schalbeter SM, Clifton NE, Mattei D, Richetto J, Thomas K, et al. Neuronal activity increases translocator protein (TSPO) levels. *Molecular psychiatry*. 2021;26(6):2025-37.
20. Ogino Y, Tohyama S, Kohno S, Toyota K, Yamada G, Yatsu R, et al. Functional distinctions associated with the diversity of sex steroid hormone receptors ESR and AR. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2018;184:38-46.
21. Schumacher M, Akwa Y, Guennoun R, Robert F, Labombarda F, Desarnaud F, et al. Steroid synthesis and metabolism in the nervous system: trophic and protective effects. *J Neurocytol*. 2000;29(5-6):307-26.
22. Papadopoulos V, Fan J, Zirkin B. Translocator protein (18 kDa): an update on its function in steroidogenesis. *J Neuroendocrinol*. 2018;30(2).
23. Aghazadeh Y, Zirkin BR, Papadopoulos V. Pharmacological Regulation of the Cholesterol Transport Machinery in Steroidogenic Cells of the Testis. *Vitamins and Hormones: Academic Press Inc.*; 2015. p. 189-227.
24. Papadopoulos V, Aghazadeh Y, Fan J, Campioli E, Zirkin B, Midzak A. Translocator protein-mediated pharmacology of cholesterol transport and steroidogenesis. *Mol Cell Endocrinol*. 2015;408:90-8.
25. Akwa Y. Steroids and Alzheimer's Disease: Changes Associated with Pathology and Therapeutic Potential. *International journal of molecular sciences*. 2020;21(13).
26. Mukhin AG, Papadopoulos V, Costa E, Krueger KE. Mitochondrial benzodiazepine receptors regulate steroid biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1989;86:9813-6.
27. Papadopoulos V, Lecanu L, Brown RC, Han Z, Yao ZX. Peripheral-type benzodiazepine receptor in neurosteroid biosynthesis, neuropathology and neurological disorders. *Neuroscience*. 2006;138(3):749-56.
28. Costa B, Da Pozzo E, Giacomelli C, Barresi E, Taliani S, Da Settimo F, et al. TSPO ligand residence time: a new parameter to predict compound neurosteroidogenic efficacy. *Sci Rep*. 2016;6:18164.
29. Costa B, Cavallini C, Da Pozzo E, Taliani S, Da Settimo F, Martini C. The Anxiolytic Etifoxine Binds to TSPO Ro5-4864 Binding Site with Long Residence Time Showing a High Neurosteroidogenic Activity. *ACS Chemical Neuroscience*. 2017;8:1448-54.
30. Liere P, Pianos A, Oudinet JP, Schumacher M, Akwa Y. Differential effects of the 18-kDa translocator protein (TSPO) ligand etifoxine on steroidogenesis in rat brain, plasma and steroidogenic glands: Pharmacodynamic studies. *Psychoneuroendocrinology*. 2017;83:122-34.
31. Barron AM, Higuchi M, Hattori S, Kito S, Suhara T, Ji B. Regulation of Anxiety and Depression by Mitochondrial Translocator Protein-Mediated Steroidogenesis: the Role of Neurons. *Mol Neurobiol*. 2021;58(2):550-63.
32. Barron AM, Ji B, Kito S, Suhara T, Higuchi M. Steroidogenic abnormalities in translocator protein knockout mice and significance in the aging male. *Biochemical Journal*. 2018;475(1):75-85.
33. Costa B, Da Pozzo E, Martini C. Translocator protein and steroidogenesis. *Biochem J*. 2018;475(5):901-4.
34. Banati RB, Middleton RJ, Chan R, Hatty CR, Kam WW, Quin C, et al. Positron emission tomography and functional characterization of a complete PBR/TSPO knockout. *Nat Commun*. 2014;5:5452.

35. Morohaku K, Pelton SH, Daugherty DJ, Butler WR, Deng W, Selvaraj V. Translocator protein/peripheral benzodiazepine receptor is not required for steroid hormone biosynthesis. *Endocrinology*. 2014;155(1):89-97.
36. Tu LN, Morohaku K, Manna PR, Pelton SH, Butler WR, Stocco DM, et al. Peripheral benzodiazepine receptor/translocator protein global knock-out mice are viable with no effects on steroid hormone biosynthesis. *J Biol Chem*. 2014;289(40):27444-54.
37. Selvaraj V, Stocco DM, Tu LN. Minireview: translocator protein (TSPO) and steroidogenesis: a reappraisal. *Mol Endocrinol*. 2015;29(4):490-501.
38. Tu LN, Zhao AH, Stocco DM, Selvaraj V. PK11195 effect on steroidogenesis is not mediated through the translocator protein (TSPO). *Endocrinology*. 2015;156:1033-9.
39. Trapani A, Palazzo C, de Candia M, Lasorsa FM, Trapani G. Targeting of the translocator protein 18 kDa (TSPO): a valuable approach for nuclear and optical imaging of activated microglia. *Bioconjug Chem*. 2013;24(9):1415-28.
40. Werry EL, Bright FM, Pignatelli O, Ittner LM, Halliday GM, Hodges JR, et al. Recent Developments in TSPO PET Imaging as A Biomarker of Neuroinflammation in Neurodegenerative Disorders. *International journal of molecular sciences*. 2019;20(13).
41. Camsonne R, Crouzel C, Comar D, Maziere M, Prenant C, Sastre J, et al. Synthesis of N- (11C) methyl, N- (methyl- 1 propyl),(chloro- 2 phenyl)- 1 isoquinoline carboxamide- 3 (PK 11195): A new ligand for peripheral benzodiazepine receptors. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*. 1984;21(10):985-91.
42. Boutin H, Chauveau F, Thominaux C, Kuhnast B, Grégoire MC, Jan S, et al. In vivo imaging of brain lesions with [11C]CLINME, a new PET radioligand of peripheral benzodiazepine receptors. *GLIA*. 2007;55:1459-68.
43. Petit-Taboué MC, Baron JC, Barré L, Travère JM, Speckel D, Camsonne R, et al. Brain kinetics and specific binding of [11C]PK 11195 to  $\omega$ 3 sites in baboons: positron emission tomography study. *European Journal of Pharmacology*. 1991;200:347-51.
44. Yasuno F, Kosaka J, Ota M, Higuchi M, Ito H, Fujimura Y, et al. Increased binding of peripheral benzodiazepine receptor in mild cognitive impairment-dementia converters measured by positron emission tomography with [<sup>11</sup>C]DAA1106. *Psychiatry Res*. 2012;203(1):67-74.
45. Gulyás B, Makkai B, Kása P, Gulya K, Bakota L, Várszegi S, et al. A comparative autoradiography study in post mortem whole hemisphere human brain slices taken from Alzheimer patients and age-matched controls using two radiolabelled DAA1106 analogues with high affinity to the peripheral benzodiazepine receptor (PBR) system. *Neurochem Int*. 2009;54(1):28-36.
46. Zhang MR, Maeda J, Furutsuka K, Yoshida Y, Ogawa M, Suhara T, et al. [18F]FMDAA1106 and [18F]FEDAA1106: two positron-emitter labeled ligands for peripheral benzodiazepine receptor (PBR). *Bioorg Med Chem Lett*. 2003;13(2):201-4.
47. Takano A, Piehl F, Hillert J, Varrone A, Nag S, Gulyás B, et al. In vivo TSPO imaging in patients with multiple sclerosis: a brain PET study with [18F]FEDAA1106. *EJNMMI Res*. 2013;3(1):30.
48. Gulyás B, Vas A, Tóth M, Takano A, Varrone A, Cselényi Z, et al. Age and disease related changes in the translocator protein (TSPO) system in the human brain: positron emission tomography measurements with [11C]vinpocetine. *Neuroimage*. 2011;56(3):1111-21.
49. Gulyas B, Toth M, Vas A, Shchukin E, Kostulas K, Hillert J, et al. Visualising neuroinflammation in post-stroke patients: a comparative PET study with the TSPO molecular imaging biomarkers [11C]PK11195 and [11C]vinpocetine. *Curr Radiopharm*. 2012;5(1):19-28.
50. Fan Z, Harold D, Pasqualetti G, Williams J, Brooks DJ, Edison P. Can Studies of Neuroinflammation in a TSPO Genetic Subgroup (HAB or MAB) Be Applied to the Entire AD Cohort? *J Nucl Med*. 2015;56(5):707-13.
51. Liu B, Le KX, Park MA, Wang S, Belanger AP, Dubey S, et al. In vivo detection of age-and disease-related increases in neuroinflammation by 18F-GE180 TSPO microPET imaging in wild-type and alzheimer's transgenic mice. *Journal of Neuroscience*. 2015;35:15716-30.

52. Bae KR, Shim HJ, Balu D, Kim SR, Yu SW. Translocator protein 18 kDa negatively regulates inflammation in microglia. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2014;9(3):424-37.
53. Bonsack Ft, Alleyne CH, Jr., Sukumari-Ramesh S. Augmented expression of TSPO after intracerebral hemorrhage: a role in inflammation? *J Neuroinflammation*. 2016;13(1):151.
54. Amor S, Puentes F, Baker D, van der Valk P. Inflammation in neurodegenerative diseases. *Immunology*. 2010;129(2):154-69.
55. Owen DR, Narayan N, Wells L, Healy L, Smyth E, Rabiner EA, et al. Pro-inflammatory activation of primary microglia and macrophages increases 18 kDa translocator protein expression in rodents but not humans. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2017;37(8):2679-90.
56. Monga S, Nagler R, Amara R, Weizman A, Gavish M. Inhibitory Effects of the Two Novel TSPO Ligands 2-Cl-MGV-1 and MGV-1 on LPS-induced Microglial Activation. *Cells*. 2019;8:486.
57. Girard C, Liu S, Cadepond F, Adams D, Lacroix C, Verleye M, et al. Etifoxine improves peripheral nerve regeneration and functional recovery. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(51):20505-10.
58. Li M, Ren H, Sheth KN, Shi FD, Liu Q. A TSPO ligand attenuates brain injury after intracerebral hemorrhage. *FASEB Journal*. 2017;31:3278-87.
59. Ma L, Zhang H, Liu N, Wang P-Q, Guo W-Z, Fu Q, et al. TSPO ligand PK11195 alleviates neuroinflammation and beta-amyloid generation induced by systemic LPS administration. *Brain Research Bulletin*. 2016;121:192-200.
60. Leaver KR, Reynolds A, Bodard S, Guilloteau D, Chalon S, Kassiou M. Effects of translocator protein (18 kDa) ligands on microglial activation and neuronal death in the quinolinic-acid-injected rat striatum. *ACS Chem Neurosci*. 2012;3(2):114-9.
61. Tripathy S, Mohanty PK. Reactive oxygen species (ROS) are boon or bane. Article in *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 2017;8:1-16.
62. Lenaz G. Role of mitochondria in oxidative stress and ageing. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*. 1998;1366:53-67.
63. Dimitrova-Shumkovska J, Krstanoski L, Veenman L. Diagnostic and Therapeutic Potential of TSPO Studies Regarding Neurodegenerative Diseases, Psychiatric Disorders, Alcohol Use Disorders, Traumatic Brain Injury, and Stroke: An Update. *Cells*. 2020;9(4).
64. Tsubouchi K, Araya J, Kuwano K. PINK1-PARK2-mediated mitophagy in COPD and IPF pathogenesis. *Inflamm Regen*. 2018;38:18.
65. Matsuda N, Sato S, Shiba K, Okatsu K, Saisho K, Gautier CA, et al. PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy. *J Cell Biol*. 2010;189(2):211-21.
66. Narendra D, Kane LA, Hauser DN, Fearnley IM, Youle RJ. p62/SQSTM1 is required for Parkin-induced mitochondrial clustering but not mitophagy; VDAC1 is dispensable for both. *Autophagy*. 2010;6(8):1090-106.
67. Gatliff J, East D, Crosby J, Abeti R, Harvey R, Craigen W, et al. TSPO interacts with VDAC1 and triggers a ROS-mediated inhibition of mitochondrial quality control. *Autophagy*. 2014;10(12):2279-96.
68. Guilarte TR, Loth MK, Guariglia SR. TSPO Finds NOX2 in Microglia for Redox Homeostasis. *Trends Pharmacol Sci*. 2016;37(5):334-43.
69. Wang X, Wang W, Li L, Perry G, Lee H-g, Zhu X. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2014;1842:1240-7.
70. Biswas L, Farhan F, Reilly J, Bartholomew C, Shu X. TSPO Ligands Promote Cholesterol Efflux and Suppress Oxidative Stress and Inflammation in Choroidal Endothelial Cells. *International journal of molecular sciences*. 2018;19(12).
71. Mitra S, Deshmukh A, Sachdeva R, Lu J, Mehta JL. Oxidized low-density lipoprotein and atherosclerosis implications in antioxidant therapy. *Am J Med Sci*. 2011;342(2):135-42.

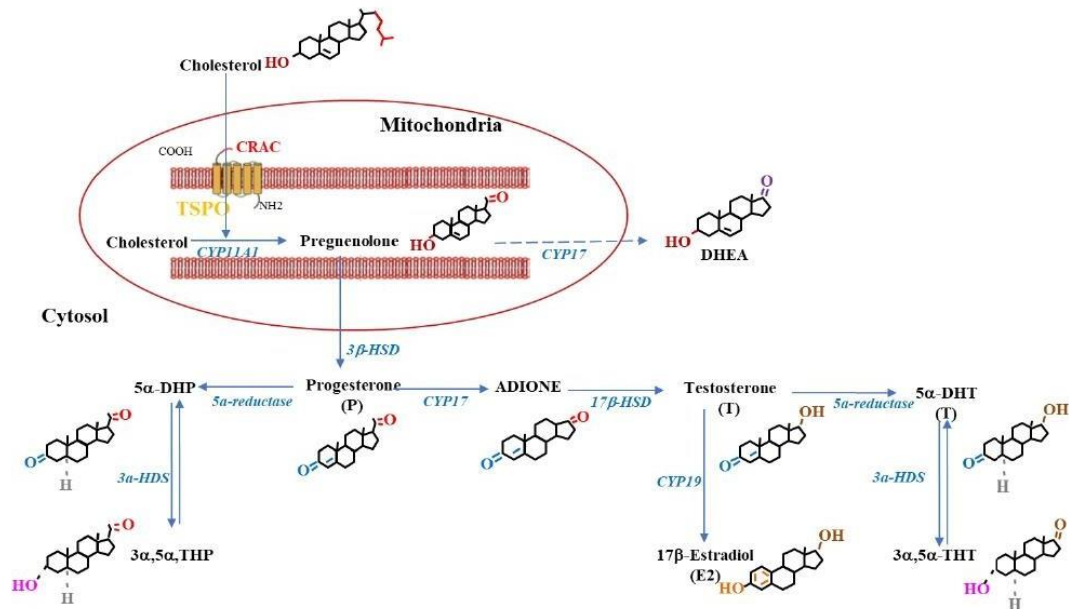
72. Kupa LdVK, Drewes CC, Barioni ED, Neves CL, Sampaio SC, Farsky SHP. Role of Translocator 18 KDa Ligands in the Activation of Leukotriene B4 Activated G-Protein Coupled Receptor and Toll Like Receptor-4 Pathways in Neutrophils. *Frontiers in Pharmacology*. 2017;8:766.
73. Baez E, Guio-Vega GP, Echeverria V, Sandoval-Rueda DA, Barreto GE. 4'-Chlorodiazepam Protects Mitochondria in T98G Astrocyte Cell Line from Glucose Deprivation. *Neurotox Res*. 2017;32(2):163-71.
74. Palzur E, Sharon A, Shehadeh M, Soustiel JF. Investigation of the mechanisms of neuroprotection mediated by Ro5-4864 in brain injury. *Neuroscience*. 2016;329:162-70.
75. Ma B, Liu X, Huang X, Ji Y, Jin T, Ma K. Translocator protein agonist Ro5-4864 alleviates neuropathic pain and promotes remyelination in the sciatic nerve. *Mol Pain*. 2018;14:1744806917748019.
76. Mills C, Makwana M, Wallace A, Benn S, Schmidt H, Tegeder I, et al. Ro5-4864 promotes neonatal motor neuron survival and nerve regeneration in adult rats. *Eur J Neurosci*. 2008;27(4):937-46.
77. Bloms-Funke P, Schumacher M, Liu S, Su D, Li J, Liere P, et al. A novel dual mode-of-action anti-hyperalgesic compound in rats which is neuroprotective and promotes neuroregeneration. *Eur J Pharmacol*. 2022;923:174935.
78. Ferzaz B, Brault E, Bourliaud G, Robert JP, Poughon G, Claustre Y, et al. SSR180575 (7-chloro-N,N,5-trimethyl-4-oxo-3-phenyl-3,5-dihydro-4H-pyridazino[4,5-b]indole-1-acetamide), a peripheral benzodiazepine receptor ligand, promotes neuronal survival and repair. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002;301(3):1067-78.
79. Shehadeh M, Palzur E, Apel L, Soustiel JF. Reduction of Traumatic Brain Damage by Tspo Ligand Etifoxine. *International journal of molecular sciences*. 2019;20(11).
80. Palzur E, Edelman D, Sakas R, Soustiel JF. Etifoxine Restores Mitochondrial Oxidative Phosphorylation and Improves Cognitive Recovery Following Traumatic Brain Injury. *International journal of molecular sciences*. 2021;22(23).
81. Barron AM, Garcia-Segura LM, Caruso D, Jayaraman A, Lee JW, Melcangi RC, et al. Ligand for translocator protein reverses pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience*. 2013;33:8891-7.
82. Christensen A, Pike CJ. TSPO ligand PK11195 improves Alzheimer-related outcomes in aged female 3xTg-AD mice. *Neurosci Lett*. 2018;683:7-12.
83. Lejri I, Grimm A, Hallé F, Abarghaz M, Klein C, Maitre M, et al. TSPO Ligands Boost Mitochondrial Function and Pregnenolone Synthesis. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2019;72:1045-58.
84. Gong J, Szego EM, Leonov A, Benito E, Becker S, Fischer A, et al. Translocator Protein Ligand Protects against Neurodegeneration in the MPTP Mouse Model of Parkinsonism. *J Neurosci*. 2019;39(19):3752-69.
85. Daugherty DJ, Selvaraj V, Chechneva OV, Liu XB, Pleasure DE, Deng W. A TSPO ligand is protective in a mouse model of multiple sclerosis. *EMBO Molecular Medicine*. 2013;5:891-903.

**Figure 1.** Basal TSPO expression levels in tissues and cells.



of TSPO in steroidogenic tissues. TSPO levels are higher in peripheral tissues, such as adrenal cortex, gonads and placenta, compared to the brain. The red square represents the adrenal cortex.

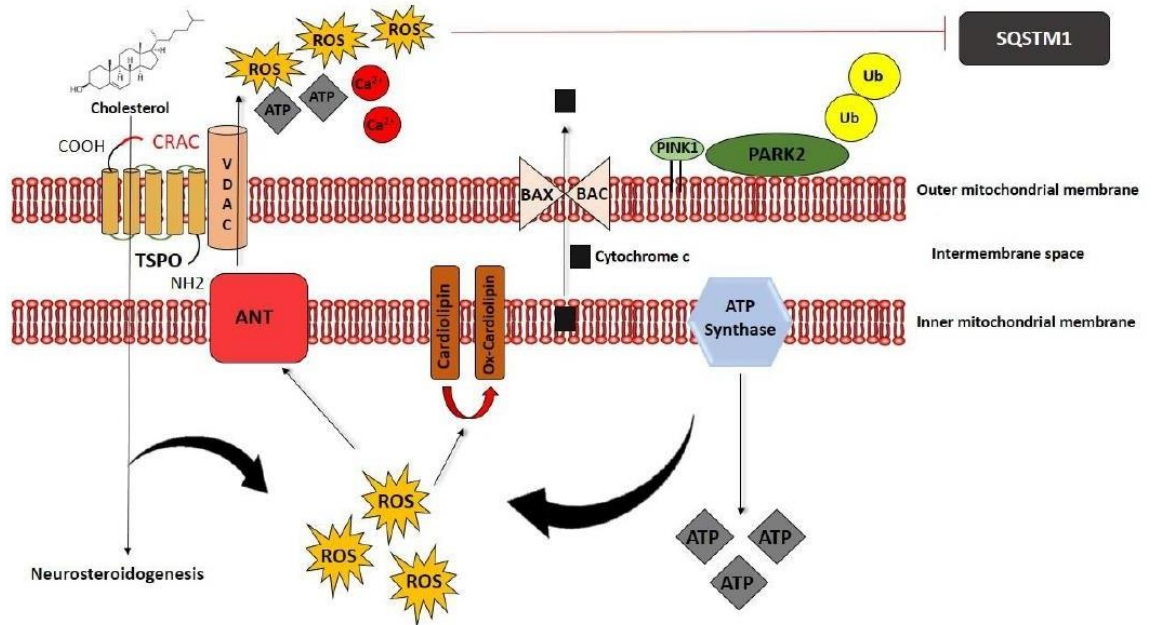
**Figure 2.** Role of TSPO in steroidogenesis.



Cholesterol binding to the C-terminal of TSPO allows its transfer from the OMM to the IMM where CYP11A1 cleaves its aliphatic tail, resulting in the biosynthesis of pregnenolone. Pregnenolone is the precursor of all steroids, such as progesterone and its 5 $\alpha$ -reduced derivatives, testosterone and its 5 $\alpha$ -reduced metabolites, and 17 $\beta$ -estradiol, which are major neuroactive steroids

**Abbreviations:** CYP11A1: cytochrome P450<sub>11A1</sub> (scc: side chain cleavage); 3 $\beta$ -HSD: 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase  $\Delta^5$ - $\Delta^4$  isomerase; CYP17: cytochrome P450<sub>17</sub> (17 $\alpha$ -hydroxylase/17,20 lyase); 17 $\beta$ -HSD: 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase; CYP19: cytochrome P450 aromatase. The dashed arrow indicates that the synthesis of dehydroepiandrosterone (DHEA) is elusive in rodents' nervous system whereas it occurs in human brains.

**Figure 3.** Crosstalk between TSPO and ROS.



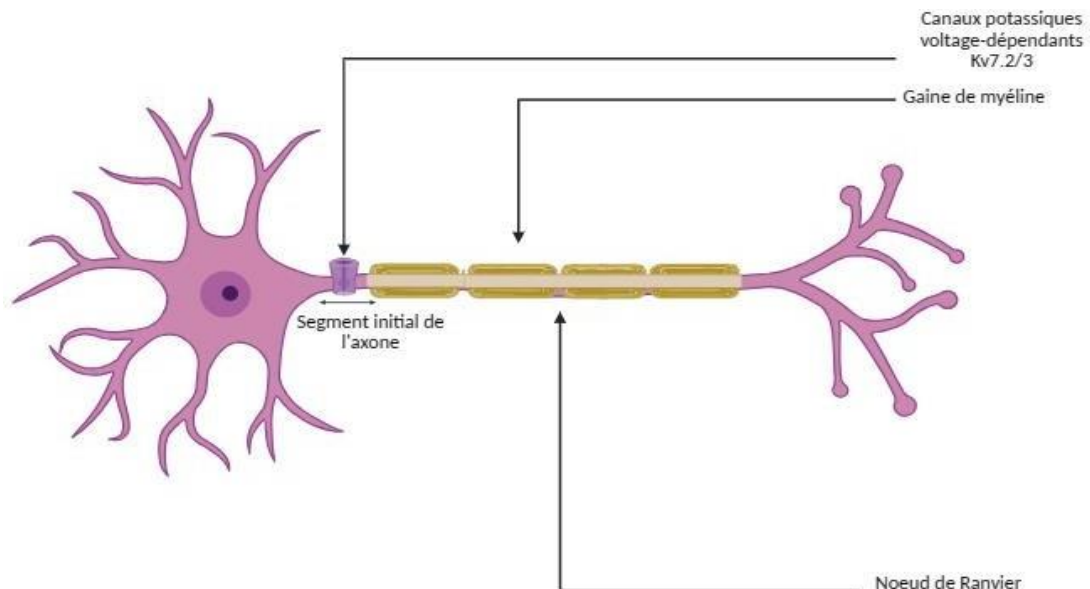
Cholesterol enters into the mitochondria through TSPO. This process enables neurosteroidogenesis on the one hand, and the production of ROS on the other hand. Also, the production of ATP by the ATP Synthase produces ROS. Cardiolipin is oxidized by ROS which permits the opening of the mPTP. ATP and calcium can be released, leading to the depolarization of the mitochondrial membrane. The depolarization of the membrane opens the Bax/Bak channel and cytochrome c can be released into the cytosol, initiating apoptosis. Moreover, the increase in the expression of TSPO increases the production of ROS which inhibits mitophagy by blocking the ubiquitination of VDAC by the PINK1/PARK2 pathway and the SQSTM1 recruitment.

**Table 1.** Effects of TSPO ligands in neurodegenerative diseases and nerve injuries.

<b>TSPO Ligand</b>	<b>Pathology involved</b>	<b>Role</b>	<b>Reference</b>
Etifoxine (STRESAM <sup>®</sup> )	- Experimental autoimmune encephalomyelitis (mice) - Lesion of the sciatic nerve (freeze injury in rats) - Intracerebral hemorrhage (mice)	- Delayed clinical symptoms, modulated inflammatory responses, and beneficial effects after neural injury - Axonal regeneration and speed up of functional recovery - Reduction of leukocyte infiltration into the brain and decrease of microglial production of IL-6 and TNF- $\alpha$	(57, 58, 85)
SSR180575	Facial nerve injury (rats)	Promotion of functional recovery	(78)
2-U-M6V-1 and M6V-1	Inflammation due to microglia activation by lipopolysaccharide (LPS)	Decrease of neuroinflammation and reduction of the production of interleukin-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ), IL-6, cytokines tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ), and interferon gamma (IFN- $\gamma$ )	(56)
Ro5-4864	- Peripheral nerve injury (Rodents)  - Alzheimer's disease (mice)	- Neuroprotection and pain alleviation - Protection of neonatal spinal cord motor neurons from death after sciatic nerve axotomy - Neuroprotective effect on adult facial motor neurons after axotomy - Decrease of A $\beta$ plaques accumulation in the hippocampus, decrease of gliosis, behavior improvement	(75, 81, 86)
PK11195	- Alzheimer's Disease (AD) (female 3xTg-AD mice) - Excitotoxic injury (injection of quinolinic acid into the rat striatum)	- Improvement in behavior and small reduction in soluble and deposited markers of $\beta$ amyloid plaques - Increase of neuronal survival and inhibition of microglial activation	(82) (87)
XBD-173 (EMAPUNIL <sup>®</sup> )	Parkinson's Disease (female mice)	Amelioration of degeneration of dopaminergic neurons, preservation of striatal dopamine metabolism, prevention of motor dysfunctions, and decrease of cellular stress and apoptosis	(84)

## 1.2 Les canaux potassiques voltage-dépendants Kv7.2/3

Les canaux potassiques Kv7 voltage-dépendants, en particulier les Kv7.2/3, constituent la deuxième cible du GRT-X. Les Kv7.2/3 sont localisés au niveau du segment initial de l'axone, là où les potentiels d'action sont nés (**Figure 7**).



**Figure 7. Localisation des canaux potassiques voltage-dépendants Kv7.2/3 au niveau du segment initial de l'axone**

Les canaux Kv7.2/Kv7.3 sont des hétéro-tétramères composés des sous-unités des canaux Kv7.2 et Kv7.3. Chaque sous-unité est une protéine à 6 domaines transmembranaires avec des domaines N- et C-terminaux localisés intracellulairement, avec une extrémité C-terminale particulièrement longue (Hefting, D'Este et al. 2020). Ils sont codés par les gènes *KCNQ*, permettent la sortie du potassium vers l'extérieur des cellules, et jouent des rôles physiologiques importants dans plusieurs types cellulaires (neurones, cellules cardiaques, et cellules bêta du pancréas) (Bloms-Funke, Schumacher et al. 2022). En effet, il existe cinq membres appartenant à la famille des Kv7 : Kv7.1 à Kv7.5, dont quatre exprimés dans le système nerveux (Kv7.2-Kv7.5), où ils constituent les sous-unités des canaux potassiques à bas seuil de voltage, initialement appelés les 'M-channels', ou canaux-M (Bloms-Funke, Bankstahl et al. 2022). Les canaux-M présents dans les neurones sont surtout formés par les sous-unités Kv7.2 et Kv7.3, avec une rare présence des Kv7.5. Les Kv7.4 sont principalement exprimés dans les systèmes auditif et vestibulaire, mais contribuent aussi à la formation des canaux-M dans

les neurones dopaminergiques centraux (Brown, Henny et al. 2009). Les canaux-M ne s'inactivent pas puisqu'ils possèdent un seuil bas d'activation (60 mV). Cela génère un courant sortant voltage-dépendant régulier et permet donc de stabiliser le potentiel de la membrane en présence de courants dépolarisants. Leur activation est relativement lente (quelques dizaines de millisecondes) et ne participent donc pas à la repolarisation des potentiels d'actions individuels, mais peuvent exercer un effet inhibiteur sur l'excitabilité neuronale continue (Brown 1990). Des mutations des gènes KCNQ2 et KCNQ3 ont été associées à des formes néonatales héréditaires d'épilepsie (Wang, Lin et al. 2017). La modulation de l'excitabilité neuronale par les Kv7.2/3 en fait d'eux une cible intéressante pour le traitement de formes héréditaires et acquises d'épilepsie, et de pathologies impliquant des altérations de l'excitabilité neuronale telle que la DNC (Greene and Hoshi 2017). L'alkyl-carbamate rétigabine a été le premier modulateur allostérique positif permettant l'ouverture des canaux Kv7 développé pour le traitement de l'épilepsie (Gunthorpe, Large et al. 2012). Cependant, la rétigabine a été retirée du marché en 2017 puisqu'il a été à l'origine de changements de pigmentation au niveau de la peau et de la rétine. De plus, cette molécule possède une composante GABA mimétique qui pourrait causer une hyperexcitabilité de sevrage après l'arrêt d'un traitement de longue durée (Bloms-Funke, Bankstahl et al. 2022). Il est important de noter qu'il existe un ligand sélectif agoniste des Kv7.2/3 et qui permet leur ouverture : le composé ICA-27243 (N-(6-chloro-pyridin-3-yl)-3,4-difluoro-benzamide). En effet, ce composé a été à l'origine d'une hyperpolarisation du potentiel membranaire dans des cellules humaines de neuroblastome, de la suppression réversible de l'activité épileptique dans un modèle *ex vivo* de coupes d'hippocampe, et d'une activité anticonvulsivante dans un modèle *in vivo* de souris épileptiques (Wickenden, Krajewski et al. 2008). De plus, le composé ICA-27273, ainsi qu'un autre activateur des Kv7.2/3 (la fulpirtine), inhibent la CNP dans des modèles animaux de douleur ainsi que chez les humains, et sont neuroprotecteurs dans des modèles précliniques de patients (Bloms-Funke, Schumacher et al. 2022). Les Kv7.2/3 peuvent être bloqués par un antagoniste : il s'agit du composé XE991 (10,10-bis (4-pyridinylmethyl)-9(10H)-anthracenone dihydrochloride). Cette molécule engendre une dépolarisation du potentiel membranaire de repos (Yeung and Greenwood 2005).

De ce fait, les canaux Kv7, particulièrement les Kv7.2/3, sont une cible intéressante pour le développement de traitement pour l'épilepsie, mais aussi d'autres pathologies telles que la DNC.

## 2. Etudes récentes sur les rôles du GRT-X

### 2.1 *Effet antiépileptique du GRT-X*

L'épilepsie est l'un des troubles neurologiques les plus courants causant des crises récurrentes spontanées. Ces crises sont accompagnées d'altérations structurelles du cerveau et de comorbidités cognitives et psychiatriques. Cette maladie touche les deux sexes et tous les âges, et est répandue dans le monde entier (Beghi 2020). Il devient de plus en plus urgent de trouver un traitement efficace puisqu'il s'avère que les crises sont résistantes aux traitements actuels chez 30% des patients. Parmi les 30 médicaments antiépileptiques cliniquement approuvés, la rétigabine est le seul traitement agissant comme modulateur allostérique positif des canaux potassiques Kv7 qui permet leur ouverture (Gunthorpe, Large et al. 2012).

L'action du GRT-X comme activateur des Kv7, en particulier les Kv7.2/3, en fait de lui un traitement potentiel pour l'épilepsie. Dans une étude conduite par Bloms-Funke et al, l'effet antiépileptique du GRT-X a été comparé à celui de la rétigabine dans six modèles expérimentaux d'épilepsie :

- Test de l'électrochoc maximal chez le rat (maximal electroshock seizure, MES)
- Seuil des crises électroconvulsives chez le rat (electroconvulsive seizure, ECS)
- Test de crise sous-cutanée (s.c.) au pentylène-tétrazole (PTZ) chez le rat
- Test de seuil d'épilepsie PTZ par voie intraveineuse (i.v.) chronométrée chez le rat
- Crises audiogènes chez les souris DBA/2
- Crises d'épilepsie 6-Hz chez la souris

Pour chaque modèle expérimental, la rétigabine et le GRT-X ont été testés à différentes doses et administrés 30 minutes avant l'induction des crises épileptiques. Les effets de ces molécules ont été comparés à ceux de leurs véhicules respectifs. Les résultats montrent que le GRT-X a un effet antiépileptique significativement plus important et 30 fois plus efficace que la rétigabine dans trois des modèles expérimentaux testés (Bloms-Funke, Bankstahl et al. 2022). En effet, cela peut s'expliquer par le fait que le GRT-X active TSPO et que cela stimule la neurostéroïdogenèse et donc la synthèse d'allopregnanolone. Il a déjà été démontré que l'allopregnanolone exerce un effet antiépileptique en agissant via le site de liaison des neurostéroïdes du récepteur GABA<sub>A</sub> et augmente ainsi l'inhibition GABAergique au niveau des récepteurs synaptiques et extrasynaptiques (Reddy 2011). L'étude conduite par Bloms-Funke

et al montre que le GRT-X possède les mêmes effets indésirables que ceux induits par des traitements antiépileptiques approuvés en clinique, causant une sédation et une ataxie à doses élevées (Perucca and Gilliam 2012). Cependant, les effets secondaires indésirables sur le SNC (ataxie, chute de la température corporelle) induits par le GRT-X sont moins prononcés que ceux induits par la rétigabine chez le rat, mais sont similaires pour les deux traitements chez la souris (Bloms-Funke, Bankstahl et al. 2022). De ce fait, les canaux potassiques Kv7.2/3 gagnent de plus en plus d'importance dans la compréhension et la recherche de traitements pour les pathologies causées par une hyperexcitabilité neuronale telles que l'épilepsie (Löscher and Klein 2021). Le double MoA du GRT-X pourrait en effet promouvoir l'effet antiépileptique de cette molécule.

## 2.2 Effet neuroprotecteur du GRT-X

Comme mentionné précédemment, le GRT-X se lie à la fois aux Kv7.2/3 et à TSPO. Cela en fait de lui une molécule intéressante pour le traitement de maladies causées par une hyperexcitabilité neuronale (telle que l'épilepsie), mais aussi pour le traitement de la DNC, l'atténuation de la progression de la neuropathie, et aider à la récupération fonctionnelle. Pour cela, l'équipe de Bloms-Funke et al a conduit une deuxième étude permettant d'évaluer les rôles neuroprotecteur et neurorégénérateur potentiels du GRT-X. Pour se faire, trois modèles expérimentaux ont été utilisés :

- Rats Sprague Dawley : neuropathie diabétique induite par injection de streptozotocine (STZ)
- Rats Sprague Dawley : modèle de lésion par écrasement sévère des nerfs rachidiens cervicaux (C5-C7, 5 mm distal des DRG)
- Rats Sprague Dawley : étude de la préférence de place conditionnée

L'effet du GRT-X a été comparé à celui d'autres traitements dans ces différents modèles expérimentaux : ICA-27243, étifoxine (6-Chloro-N-ethyl-4-methyl-4-phenyl-4H-3,1-benzoxazin-2-amine ; ligand de TSPO), PK11195, ICA-27243, rétigabine, olesoxime (activateur de TSPO et du VDAC), finastéride (inhibiteur de la 5-alpha réductase, donc inhibiteur de la neurostéroïdogénèse), et XE991.

Les résultats montrent que le GRT-X inhibe l'hyperalgésie chez les rats diabétiques et est plus efficace que la rétigabine et l'olesoxime. Il est important de noter que l'inhibition de l'hyperalgésie par le GRT-X a été partiellement bloquée lorsque ce premier traitement a été

suivi d'un traitement au XE991 (inhibiteur des Kv7.2/3) d'une part, et au finastéride (inhibiteur de la 5-alpha réductase) d'autre part, prouvant ainsi que l'effet observé est dû au double mode d'action du GRT-X (Bloms-Funke, Schumacher et al. 2022).

De plus, le nombre d'axones en régénération a augmenté grâce au traitement GRT-X suite à une lésion sévère par écrasement au niveau des nerfs cervicaux. Le GRT-X a également permis une récupération de sensibilité thermique et mécanique à partir de 4 semaines post-lésion. Cependant, l'étifoxine et le composé ICA-27243 ont engendré une récupération fonctionnelle à partir de la huitième semaine post-lésion, montrant ainsi une efficacité plus rapide du GRT-X.

Pour le test de préférence de la place conditionnée, il s'est avéré que le GRT-X n'a pas causé de sensibilisation même à la dose la plus élevée, prouvant ainsi qu'il est dépourvu de potentiel d'addiction (Bloms-Funke, Bankstahl et al. 2022).

Le GRT-X jouerait ainsi des rôles neuroprotecteurs et neurorégénérateurs et aurait moins d'effets secondaires indésirables que les molécules actuellement approuvées cliniquement.

Le composé GRT-X a un double mode d'action unique : il permet d'activer sélectivement les Kv7.2/3, et la protéine transmembranaire mitochondriale TSPO. Ce composé a permis de réguler l'hyperexcitabilité neuronale dans trois modèles expérimentaux d'épilepsie, et s'est avéré plus efficace que la rétigabine. De plus, le GRT-X a non seulement réduit l'hyperalgésie causée par la neuropathie diabétique, mais a également favorisé la survie et la régénération des neurones et a accéléré le taux de récupération fonctionnelle suite à une lésion sévère des nerfs cervicaux. Les études sur la préférence de place conditionnée n'ont montré aucun potentiel gratifiant, renforçant l'idée que c'est une molécule sans effets secondaires d'addiction.

En conclusion, le GRT-X peut constituer une thérapie non opioïde efficace qui pourrait non seulement contrôler les symptômes de la douleur, mais aussi prévenir et inverser la DNC, réguler l'hyperexcitabilité neuronale, et ainsi permettre d'améliorer la qualité de vie des patients.

Cependant, aucune étude mécanistique n'a été réalisée et les mécanismes d'action de cette molécule demeurent inconnus.

## But de l'étude

Bien que les nerfs périphériques adultes conservent la capacité de se régénérer, la restauration fonctionnelle reste souvent décevante en cas de lésions traumatiques ou de neuropathies périphériques. De plus, une mauvaise récupération est souvent associée au développement de douleurs neuropathiques chroniques. La protéine translocatrice mitochondriale (translocator protein, TSPO, 18 kDa) et les canaux potassiques Kv7.2/3 (KCQN2/3) voltage-dépendants sont deux cibles prometteuses pour favoriser la régénération des nerfs périphériques et la récupération fonctionnelle, et pour prévenir la chronicisation des douleurs neuropathiques. Récemment, une nouvelle classe de molécules ciblant à la fois TSPO et les Kv7.2/3 a été développée par la compagnie pharmaceutique Grünenthal. **Le but de cette thèse est d'étudier le rôle du GRT-X, un représentant de cette classe, dans la poussée axonale.** Cette preuve de concept a été effectuée sur des cultures d'explants et des cultures dissociées de ganglions spinaux (ou Dorsal Root Ganglia, DRG) embryonnaires à E13.5 provenant soit de souris C57BL6/J, soit de souris TSPO-KO.

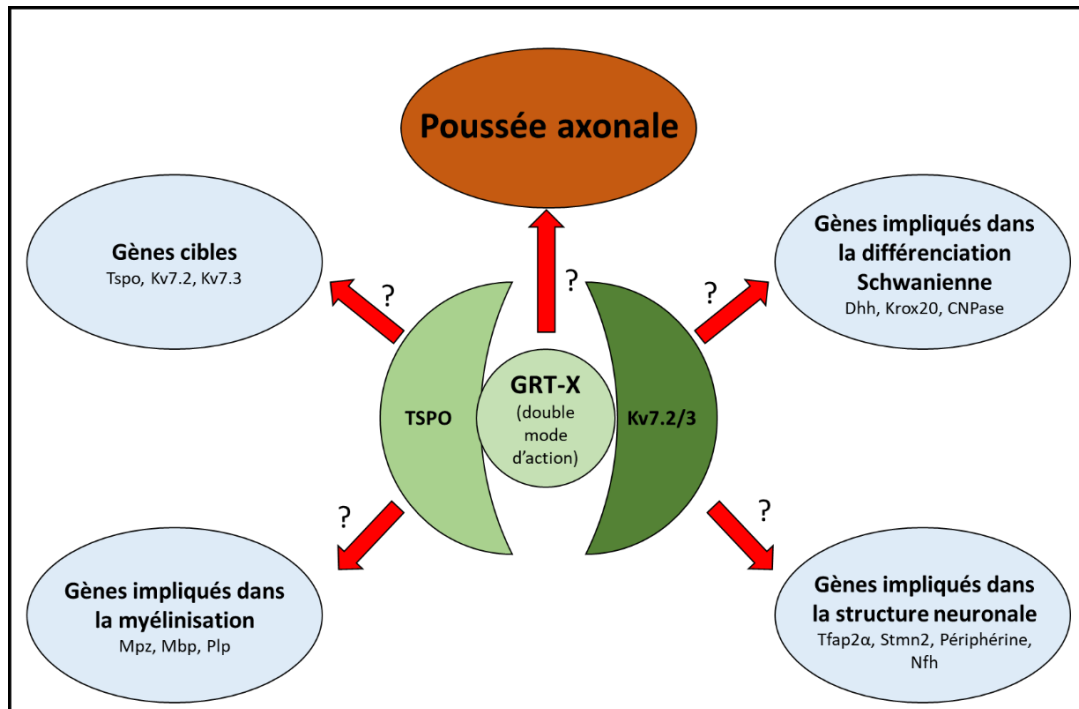
Premièrement et avant de tester les effets régénérateurs du GRT-X, des expériences préliminaires ont été réalisées pour déterminer 1) **la concentration qui n'affecte pas la viabilité cellulaire**, et 2) **le marqueur axonal** sur des cultures de DRG de souris embryonnaires provenant de souris C57BL6/J gestante à E13.5.

Deuxièmement, **le rôle du GRT-X sur la poussée axonale** a été testé sur des DRG embryonnaires provenant de souris C57BL/6. **Cet effet a été comparé à celui d'autres ligands** : étifoxine (agoniste de TSPO), XBD173 (agoniste de TSPO), ICA-27243 (agoniste des Kv7.2/3), et XE991 (antagoniste des Kv7.2/3). Des études de microscopie ainsi que des études moléculaires (RT-qPCR) ont été réalisées.

Troisièmement, **des études de cinétique et de doses** ont été effectuées. Pour cela, les DRG ont été cultivés en présence des différents traitements (GRT-X, XBD173, ICA-27243, et XE991) à différentes doses (1 ou 2 traitements) et ont été arrêtées à différents temps (Day *in vitro* (DIV) 4 ou DIV8) et des analyses microscopiques ont été réalisées.

Quatrièmement, **l'importance du double mode d'action du GRT-X** a été étudiée. Comme il n'existe pas d'outil pharmacologique permettant de bloquer l'expression de TSPO, les mêmes expériences ont été reprises sur des DRG embryonnaires provenant de souris TSPO-KO. Suite

aux différents traitements, des études de microscopie ainsi que des études moléculaires (RT-qPCR) ont été réalisées.



**Figure 8.** Notre but est d'une part de montrer les effets de GRT-X sur la poussée et axonal, et d'autre part sur la modulation de l'expression les gènes cibles (Tspo, Kv7.2/3), et sur les gènes impliqués dans la différenciation Schwannienne (Dhh, Krox20, CNPase), la myélinisation (Mpz, Mbp, Plp), et la structure neuronale (Tfap2α, Stmn2, Périphérine, Nfh)

## Matériels et Méthodes

### I. Produits chimiques

Les composés GRT-X (N-[(3-fluorophenyl)-methyl]-1-(2-methoxyethyl)-4-methyl-2-oxo-(7-trifluoromethyl)-1H-quinoline-3-carboxylic acid amide) et étifoxine (6-Chloro-N-ethyl-4-methyl-4-phenyl-4H-3,1-benzoxazin-2-amine) ont été synthétisés par Grünenthal GmbH (Aix-la-Chapelle, Allemagne). Les composés XBD173 (N-Ethyl-7,8-dihydro-7-methyl-8-oxo-2-phenyl-N-(phenylmethyl)-9H-purine-9-acetamide) et XE991 (10,10-bis (4-pyridinylmethyl)-9(10H)-anthracenone dihydrochloride) ont été achetés de chez Sigma Aldrich Chimie (références : SML1223 et X2254 respectivement). Le composé ICA-27243 (N-(6-chloro-pyridin-3-yl)-3,4-difluoro-benzamide) a été acheté de chez TargetMol (référence : T15545). Tous les composés ont été dissous dans de l'éthanol (EtOH) à une concentration finale de 10  $\mu$ M, à l'exception de l'étifoxine qui a été utilisée à une concentration finale de 20  $\mu$ M selon la littérature (Girard, Liu et al. 2008).

### II. Test de viabilité cellulaire MTT ((bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium))

L'effet du GRT-X sur la viabilité des cellules de phéochromocytomes de rat (cellules PC12, réf. ATCC CRL-1721) a été étudié par le test MTT (Levitz and Diamond 1985). La conversion du tétrazolium contenu dans les sels de MTT par la succinate déshydrogénase des mitochondries, permet de former un produit violet : le formazan. Cette conversion est uniquement possible dans les cellules vivantes, la densité optique du violet obtenue est directement liée à la survie cellulaire (Stone, Johnston et al. 2009).

Pour cela, des plaques de 96 puits préalablement traitées avec la poly-L-lysine (Sigma référence P4832) ont été utilisées. Les cellules PC12 ont étéensemencées (2700/puits) en présence du milieu de culture (DMEM glutamax - Gibco référence 10569-010 ; 10% de sérum de cheval inactivé (Gibco référence 16050-122) ; 5% de sérum bovin fœtal (Gibco référence 10500-064) ; 1% de pénicilline/streptomycine (Gibco référence 15140-122). Le lendemain, le milieu de culture a été remplacé par l'Opti-MEM (Gibco référence 31985070) enrichi avec le NGF (Sigma référence N6009-25UG) contenant des doses croissantes de GRT-X (5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 15  $\mu$ M, et 20  $\mu$ M) dissous dans des concentrations équivalentes d'EtOH (respectivement

0.025% pour 5  $\mu$ M de GRT-X, 0.05% pour 10  $\mu$ M de GRT-X, 0.1% pour 15  $\mu$ M de GRT-X, et 0.15% pour 20  $\mu$ M de GRT-X). Pour chaque concentration, des triplicatas internes ont été inclus dans l'expérience. Soixante-douze heures plus tard, les cellules ont été incubées à 37°C pendant 2h en présence d'une solution de MTT selon le protocole du fabricant. Le milieu de culture a ensuite été éliminé et remplacé par du diméthylsulfoxyde (DMSO) afin de solubiliser les cristaux de formazan. L'absorbance a été lue à 590 nm et le pourcentage de viabilité des cellules PC12 a été évalué. L'expérience a été répétée 3 fois.

### III. Animaux

Nos expériences ont été réalisées sur des souris C57BL/6 (Janvier Labs référence SC-C57J-F) et des souris TSPO-knockout (TSPO-KO) (LMU Munich) gestantes à E13.5.

Les souris TSPO-KO dont le nom complet est 'C57BL/6-Tspotm1GuWu (GuwiyangWurra)-knockout mice' ont été obtenues par l'injection de cellules souches embryonnaires contenant des sites loxP flanquant les exons 2 et 3 et une cassette de néomycine entre les exons 3 et 4 au niveau de l'allèle Tspo dans des souris C57BL/6. Les souris positives pour la présence d'allèles Tspo ciblés ont ensuite été croisées avec des souris C57BL/6 Cre-deleted pour générer des souris hétérozygotes globalement déficientes en Tspo. Ces dernières ont été accouplées avec des souris C57BL/6 sauvage pour supprimer le transgène Cre. Les souris ont été génotypées par Southern blot en utilisant de l'ADN génomique isolé à partir de biopsies de la queue et amplifié par PCR (Banati, Middleton et al. 2014).

Tous les aspects des soins aux animaux et de l'expérimentation animale ont été réalisés conformément aux directives et réglementations de l'INSERM et de l'Université Paris-Saclay.

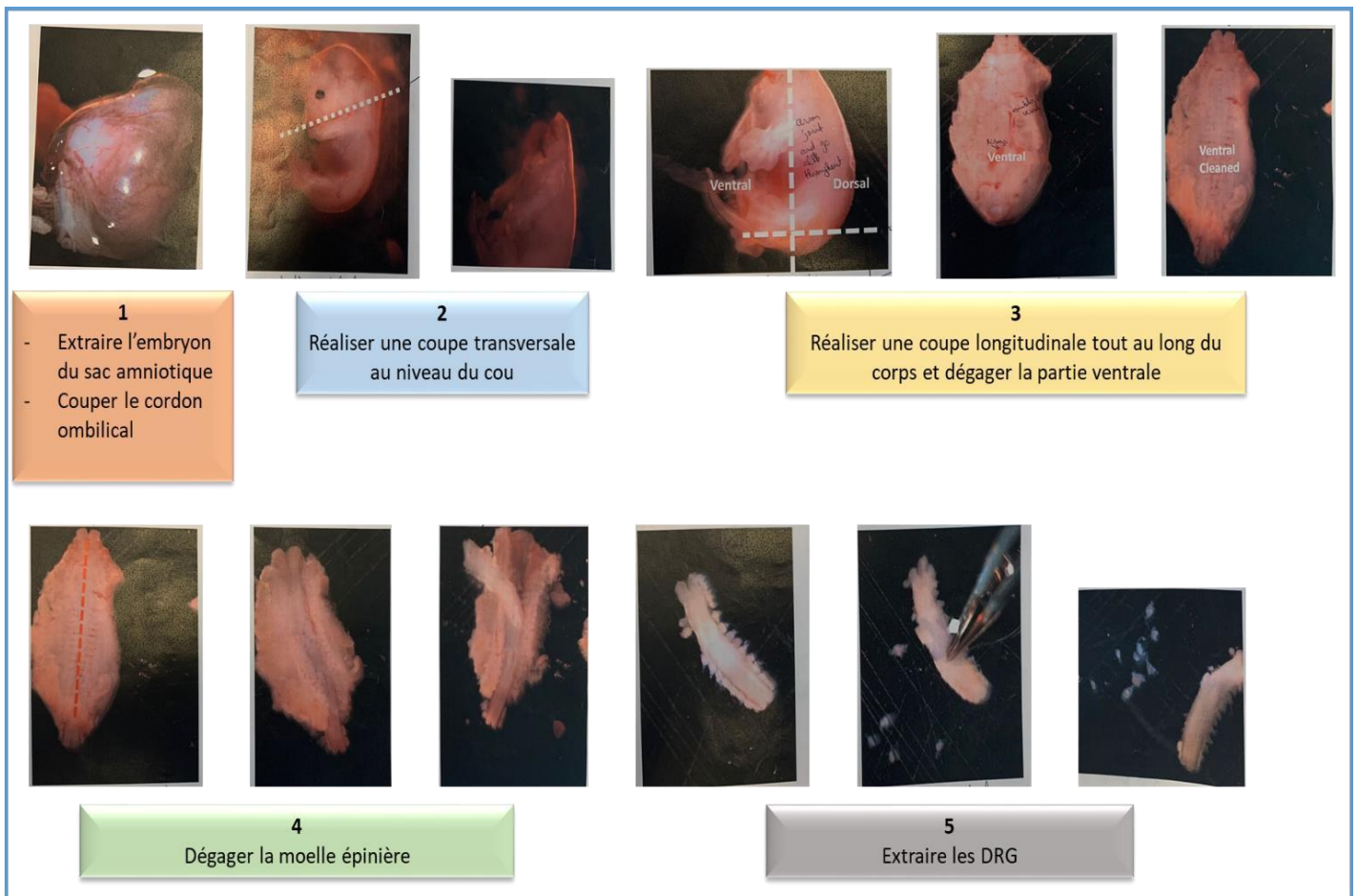
### IV. Préparation des lamelles (culture d'explants de ganglions spinaux) ou des boîtes de culture (cultures dissociées de ganglions spinaux)

Avant de réaliser les extractions de DRG, les lamelles (lamelles en plastique circulaires, 14 mm de diamètre, LFG distribution référence 174950) et les boîtes de culture (35 mm de diamètre) devaient être préparées la veille pour les cultures d'explants et les cultures dissociées respectivement. Pour cela, les lamelles et les boîtes de culture ont d'abord été incubées en présence de poly-L-lysine (Sigma référence P7890) à une concentration de 0.05mg/mL dans 0.15M d'un tampon de borate de sodium pendant 30 minutes. Après 3 lavages (5 minutes

chacun) au PBS 1X, les lamelles et les boites ont été incubées 30 minutes avec du collagène (R&D systems référence 3440-100-01) dilué (1:7) dans de l'eau acétique, en présence de 35% d'ammoniaque. Après élimination du collagène, la fine couche obtenue permet l'adhésion des DRG aux lamelles et aux boites de culture. Les lamelles ont été placées dans des boites de culture à 4 puits.

#### V. Extraction des DRG à E13.5 :

Les souris gestantes (C57BL/6 et TSPO-KO) ont été sacrifiées à E13.5 par dislocation cervicale après avoir été anesthésiées à l'isoflurane. Les embryons ont été chirurgicalement retirés du sac amniotique et placés dans une boite de pétri de 35 mm contenant du milieu L-15 (Gibco 11415-064) sur de la glace. Pour chaque embryon, les moelles épinières ont été extraites et les DRG ont été prélevés sous loupe binoculaire selon les protocoles établis (Kim and Kim 2018, Taveggia and Bolino 2018). Chaque embryon a été placé sur le côté puis décapité par des ciseaux à ressort de précision (Fine Science Tools référence 15009-08). Ensuite, des coupes longitudinales ont été réalisées pour éliminer la partie ventrale ainsi que tous les viscères. Le tissu dorsal a été placé sur le dos de façon à ce que la face ventrale soit orientée vers le haut. À l'aide de deux pinces fines (Dumont #5, Fine Science Tools), les organes restants (poumons, reins, aorte) ont été retirés de la surface ventrale. La moelle est ainsi visible et a été maintenue délicatement par la première paire de pince fine. La deuxième paire de pince a été utilisée pour réaliser une coupe longitudinale tout au long de la moelle pour l'exposer et l'extraire. Ainsi, tous les DRG ont été extraits (environ 37 à 42 ganglions/moelle épinière) (**Figure 9**).



**Figure 9.** Protocole d'extraction des DRG embryonnaires à E13.5

1. Cultures d'explants de DRG

Suite à l'extraction des DRG comme décrit précédemment et le placement d'un explant de DRG par puits (**Figure 10 A**), les cellules ont d'abord été cultivées dans le 'DRG Plating Media' (**Tableau 2** **Erreur ! Source du renvoi introuvable.**) pendant 16 heures pour permettre aux cellules d'adhérer.

**Tableau 2.** Composition du milieu 'DRG plating media

Composant	Concentration Finale	Référence
DMEM high glucose	Milieu de base	11960044 Gibco
Glutamax (100X)	1X	35050061 Gibco
Sérum de cheval inactivé par la chaleur	10%	26050088 Gibco
2.5S NGF	50ng/ml	1156NG R&D
Antibiotique/ Antimycotique (100X)	1X	15240062 Gibco

Le lendemain, le milieu a été remplacé par un milieu neurobasal (**Tableau 3** Erreur ! Source du renvoi introuvable.) contenant les différents traitements (NT, GRT-X 10 µM, XBD173 10 µM, Etifoxine 20 µM, XE991 10 µM, ICA2743 10 µM, EtOH 0,1%), et les cellules ont été maintenues en culture pendant la durée souhaitée selon les groupes (**Tableau 4** Erreur ! Source du renvoi introuvable.). Le groupe C a été traité une deuxième fois à DIV4 (remplacement du milieu par un nouveau milieu neurobasal contenant les différents traitements). Les cultures ont été arrêtées (arrêt des cultures à DIV4 pour les groupes A et D, et à DIV8 pour les groupes B et C) puis fixées pour les études d'immunocytochimie.

Pour chaque expérience, n=3 à 4 explants de DRG provenant d'embryons différents ont été cultivés par groupe. Chaque expérience a été répétée 3 fois.

**Tableau 3.** Composition du milieu neurobasal

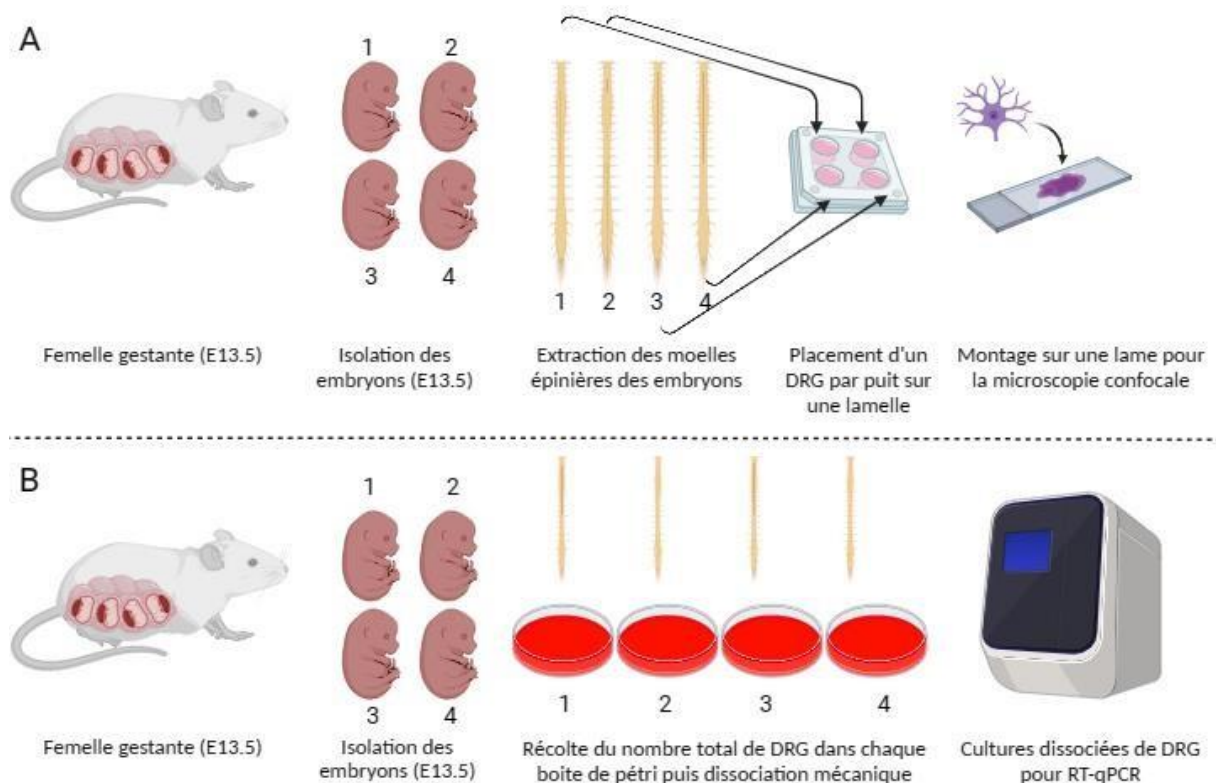
Composant	Final Concentration	Reference
Neurobasal Medium	Milieu de base	21103049 Gibco
Glutamax (100X)	1X	35050061 Gibco
2.5S NGF	50ng/ml	1156 NG R&D
Supplément B27 (50X)	1X	17504044 Gibco
Antibiotique/ Antimycotique (100X)	1X	15240062 Gibco

**Tableau 4.** Répartition des groupes de cultures d'explants de DRG

Groupe	Espèce de souris	Nombre de traitements	Jour de l'administration du t	Temps d'arr
A	C57BL6/J			
B	C57BL			
C				

## 2. Cultures dissociées de DRG

Les DRG embryonnaires ont été prélevés de souris C57BL/6 et TSPO-KO gestantes comme décrit précédemment. Un total de 40 DRG a été prélevé par embryon pour chaque groupe (**Figure 10 B**). En se basant sur le protocole expérimental mis au point par nos collaborateurs (Sundaram, El Jalkh et al. 2021), les DRG ont ensuite été trypsinisés (0,25% de trypsine dans 1X HBSS) et incubés à 37°C pendant 30 minutes. La trypsinisation a été arrêtée par du milieu L-15 contenant 10% de sérum de cheval (Gibco, 26050088) et le mélange a ensuite été centrifugé à 1500 rpm pendant 15 minutes. Le surnageant a ensuite été éliminé et les tissus ont été remis en suspension dans le 'DRG Plating Media' (**Tableau 2** Erreur ! Source du renvoi introuvable.) et triturés 30 fois à l'aide d'une pipette Pasteur stérilisée jusqu'à l'obtention d'une suspension cellulaire homogène. Pour chaque groupe (NT, GRT-X, XBD173, XE991, ICA27243, EtOH), 40 DRG dissociés ont été placés sur des boîtes de culture de 35 mm préalablement recouvertes de poly-L-lysine et de collagène. Les cellules ont d'abord été cultivées dans le "DRG Plating Media" pendant 16 heures pour permettre aux cellules d'adhérer. Le lendemain, le milieu de culture a été remplacé par le milieu neurobasal (**Tableau 3** Erreur ! Source du renvoi introuvable.) contenant les différents traitements (NT, GRT-X 10 µM, XBD173 10 µM, Etifoxine 20 µM, XE991 10 µM, ICA2743 10 µM, EtOH 0,1%), et les cellules ont été maintenues en culture jusqu'à DIV4. Les expériences ont été répétées 3 fois.



**Figure 10.** *Extraction des DRG embryonnaires à E13.5. (A) Culture d'explants de DRG, et (B) Culture dissociée de DRG*

## VI. Marquage immunocytochimique

Après avoir éliminé le milieu de culture, les explants de DRG ont d'abord été fixés à 4% de paraformaldéhyde (PFA) pendant 30 minutes à température ambiante. Après 3 lavages au PBS 1X, les DRG ont été incubés dans un tampon de récupération d'antigène (citrate de sodium 10 mM, Tween20 0,05%, pH 6,0) préchauffé à 95°C pendant 3 minutes. Ensuite, les tissus ont été lavés 3 fois au PBS 1X puis incubés pendant 30 minutes dans une solution de glycine à 0,1 M, perméabilisés (0,25% de Triton X100, 0,1% de Tween 20 dans du PBS 1X), 20 minutes à température ambiante, puis bloqués (2 % de BSA, 0,1 % de Tween 20, 10% de sérum d'âne normal) pendant 1 heure à température ambiante. Les DRG ont été incubés en présence de l'anticorps primaire (**Tableau 5**) toute la nuit à 4°C. Le lendemain, les explants de DRG ont été lavés 3 fois au PBS 1X (10 minutes pour chaque lavage) et ont ensuite été incubés en présence de l'anticorps secondaire correspondant (**Tableau 5**) pendant 1 heure à température ambiante dans l'obscurité. Les échantillons ont ensuite été lavés 3 fois au PBS 1X (10 minutes pour chaque lavage), et les noyaux ont été marqués au DAPI (1/1500, Thermo Fisher Scientific

62247). Les échantillons ont ensuite été montés sur des lames à l'aide d'un milieu de montage (Inova Diagnostics Inc 426950) et conservés à 4°C jusqu'à l'imagerie confocale.

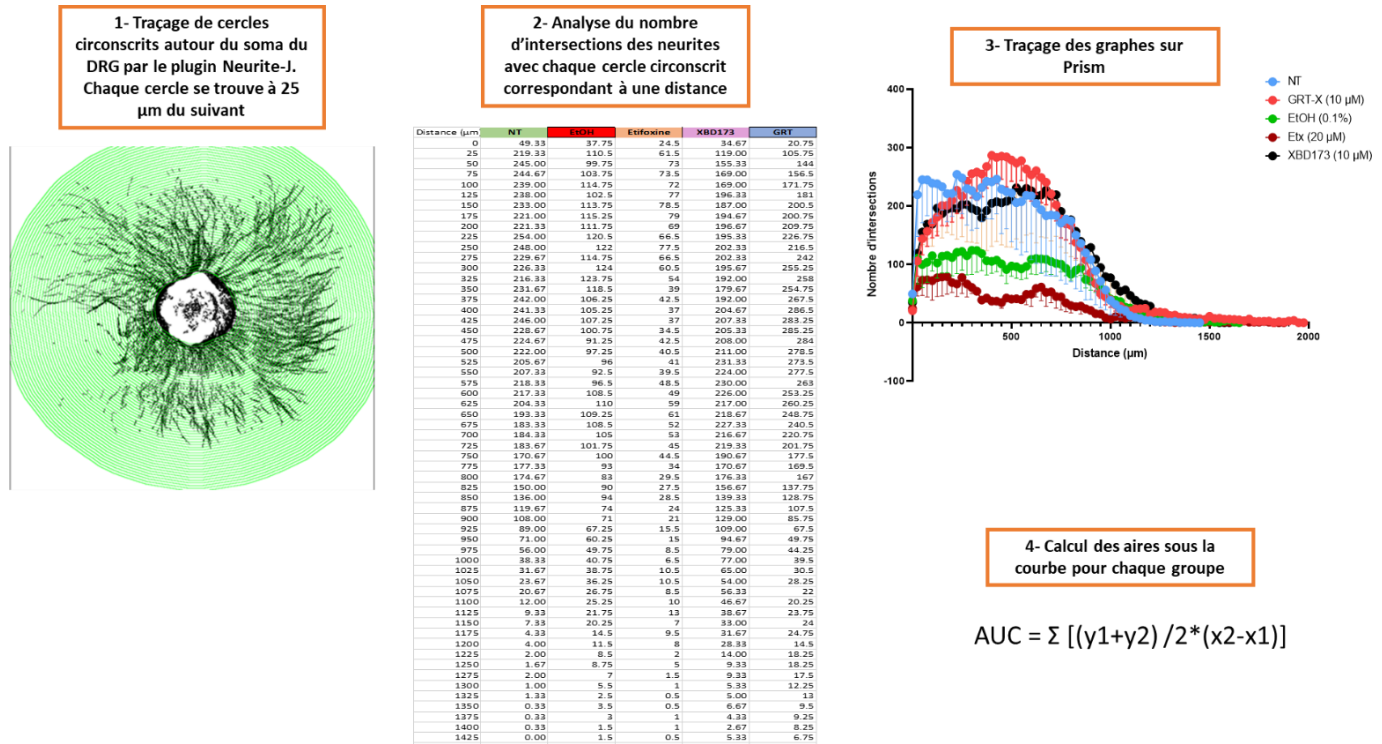
*Tableau 5. Liste des anticorps primaires et secondaires*

Anticorps primaire	Concentration	Référence	Anticorps secondaire	Concentration	Fluorophore	Référence
NFH	1/600	Millipore AB1989	Ane anti-lapin	1/1000	Alexa488	Jackson 711-545-152

#### VII. Microscopie confocale, analyse des images par Neurite-J, et calcul des aires sous la courbe

L'imagerie confocale des explants DRG fixés a été réalisée à l'aide du microscope confocal Leica SP8. Les images ont été acquises sous forme de z-stacks à un grossissement de 10X, puis analysées à l'aide du logiciel ImageJ. Pour chaque condition expérimentale, 3 à 4 réplicats biologiques (embryons) et 3 réplicats techniques (femelles gestantes) ont été analysés. La longueur et la densité des neurites ont été réalisées sur des projections z avec une intensité maximale en utilisant le plugin Neurite-J d'ImageJ après seuillage des images. Le plugin trace automatiquement des cercles circonscrits autour du soma du DRG, avec une distance de 25 µm séparant les cercles. Ensuite, il indique le nombre d'intersections des neurites et des cercles tracés aux différentes distances de l'explant (Torres-Espín, Santos et al. 2014). Les données ont été exportées vers Microsoft Excel, les graphes représentant le nombre d'intersections en fonction de la distance ont été tracés à l'aide du logiciel Prism v9.5.1, et les aires sous la courbe (AUC) de ces graphes ont été calculées (**Figure 11**) en se basant sur la méthode trapézoïdale dont la formule est la suivante :

$AUC = \sum [(y_1+y_2) / 2 * (x_2-x_1)]$ , x étant un point sur l'axe des abscisses et représentant la distance, et y étant un point sur l'axe des ordonnées représentant le nombre d'intersections. Les AUC de chaque groupe ont ensuite été normalisées à l'AUC du groupe non traité.



**Figure 11.** Les différentes étapes permettant le calcul des aires sous la courbe.

## VIII. PCR quantitative en temps réel (Real Time PCR ; RT-qPCR) :

### 1. Extraction de l'ARNm

Pour les cultures dissociées de DRG, l'ARN total des cellules a été isolé par TRIzol™/chloroforme (Invitrogen référence 15596026) suivant le protocole produit par le fournisseur. Pour augmenter le rendement l'ARN a été précipité pendant une nuit en présence de glycogène à -20°C. Le lendemain, des culots d'ARN ont été obtenus après centrifugation puis lavés trois fois à l'éthanol 70 %. Les tubes ont été maintenus ouverts sous la hotte pendant 10 minutes pour les laisser sécher. L'ARN a été remis en suspension dans 20 µl d'eau sans ARNase contenant 0,1mM d'EDTA, à pH 8,0 (Invitrogen AM9912).

### 2. Réverse transcriptase- quantitative PCR (RT-qPCR)

L'ADN complémentaire a été généré à l'aide du kit M-MLV RT (Promega, Charbonnières-les-Bains, France). Une qPCR a été réalisée avec l'appareil CFX96™ Real Time System de Biorad en utilisant le mélange Maxima SYBR Green Rox qPCR (Fisher Scientific référence 11893913) dont le protocole est fourni par le fournisseur. Les échantillons ont été effectués en duplicata. La

régulation des gènes a été déterminée par la méthode  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  et normalisée par rapport à l'expression de GAPDH et les niveaux d'expression de l'ARNm des groupes traités de DRG ont été comparés à ceux des groupes non traités (NT).

### 3. Construction des amorces

Une partie des amorces (Tspo, Kv7.2, Kv7.3, Stmn2, Périphérine, et Nfh) a été construite au laboratoire, et la deuxième partie a été construite par nos collaborateurs (Sundaram, El Jalkh et al. 2021) (**Tableau 6**).

Les amorces Tspo, Kv7.2, Kv7.3, Stmn2, Peripherin, et Nfh utilisées dans cette étude ont été conçues à l'aide du logiciel Oligo Explorer. Les variantes d'épissage et les séquences codantes des gènes ont été trouvées à l'aide de la base de données du National Center for Biotechnology (NCBI). Pour chaque gène, la séquence commune entre les différents variants a été identifiée à l'aide de l'outil BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Les séquences des amorces ont ensuite été générées par le logiciel Oligo Explorer.

Toutes les amorces ont été commandées chez Eurofins Genomics.

Nom des amorces	Séquence
Tspo Forward	GCCTCCGGTGGTATGCTAG
Tspo Reverse	GCGTCCTCTGTGAAACCTC
Kv7.2 Forward	CGTGA CTATCGTGGTATTCG
Kv7.2 Reverse	GCTTCCTGGCAA ACTTGAG
Kv7.3 Forward	CCCAGTCAAGAGGAACAACG
Kv7.3 Reverse	ACGGCCAGAATCAAGCATC
Mpz Forward	ATCTCTTTTACCTGGCGCTACC
Mpz Reverse	ACTGGATGCGCTCTTTGAAG
Mbp Forward	ACTCACACACGAGAACTACCC
Mbp Reverse	GGTGTTGAGGTGTCACAATG
Dhh Forward	ATCCACGTATCGGTCAAAGC
Dhh Reverse	AGTCACCACGATGTAGTTCCC
Plp Forward	AGCAAAGTCAGCCGAAAAC
Plp Reverse	CCAGGGAAGCAAAGGGGG
Krox20 Forward	TGCACCTAGAAACCAGACCTTC
Krox20 Reverse	TGCCCCGACTCACAATATTG
CNPase Forward	ACTCCTTACCTCACGCCATC
CNPase Reverse	AGCATTGCTGTTGGACTTGG
Cad19 Forward	TGACATAGGGGAGAATGCAGAG
Cad19 Reverse	AAGCTCTTCATCCACATGGC
Tfap2 $\alpha$ Forward	ACTCCTTACCTCACGCCATC
Tfap2 $\alpha$ Reverse	AGCATTGCTGTTGGACTTGG
Stmn2 Forward	AGGACGAGGGTAAAGAAGAG
Stmn2 Reverse	TTGCCACACAGAGAGAAAAG
Périphérine Forward	GGTGCTCTCCGTAAGGAC
Périphérine Reverse	GCACCTGCTGGCTCTCTAC
Nfh Forward	AAGCACCCACAGACATCAG
Nfh Reverse	CCTTGGGAGCTTCGTCTTTC
GAPDH Forward	ATCCCATCACCATCTTCCAG
GAPDH Reverse	CCATCACGCCACAGTTTCC

**Tableau 6.** Séquences des amorces de RT-qPCR

#### 4. Test d'efficacité des amorces

Des dilutions en série d'ADNc (ADN complémentaire) suivies de qPCR ont été utilisées pour calculer l'efficacité d'amplification des amorces. Les résultats des qPCR ont été représentés sous forme de courbe standard en fonction des concentrations respectives d'ADNc. L'efficacité d'amplification a été calculée par régression linéaire des courbes standard à l'aide de l'équation suivante :

$$E = 10^{-(1/\text{pente de la courbe standard})}$$

Les paires d'amorces ayant une efficacité comprise entre 95 et 100%, ainsi qu'une valeur  $R^2$  (coefficient de détermination) supérieure ou égale à 0,98 ont été choisies pour l'étude.

Les autres amorces utilisées dans cette étude (Mpz, Mbp, Dhh, PLP, Krox20, CNPase, Cad19, et Tfp2 $\alpha$ ) ont été conçues et choisies par nos collaborateurs après le calcul de l'efficacité d'amplification (Sundaram, El Jalkh et al. 2021).

## IX. Analyses statistiques

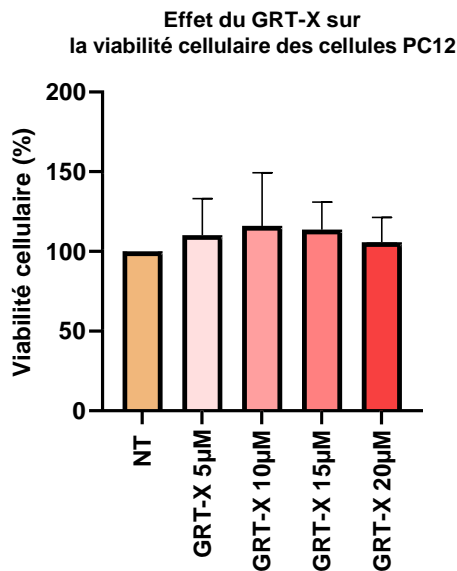
Les études statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Prism v9.5.1. Les différences entre les groupes ont été calculées par One Way ANOVA suivi du test du Multiple Comparaison Test de Tukey. Une valeur de  $p < 0,05$  a été considérée comme significative. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne  $\pm$  SD.

## Résultats

### I. Le GRT-X n'affecte pas la viabilité cellulaire des cellules PC12

Pour rechercher les potentiels effets cytotoxiques de GRT-X les test MTT ont été réalisés sur la lignée cellulaire de phéochromocytomes de rats (PC12). Pour cela, des doses croissantes du GRT-X (5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 15  $\mu$ M, 20  $\mu$ M) ont été administrées aux cellules PC12 en culture. Ensuite, le test MTT a été réalisé et les absorbances ont été lues par spectrophotométrie à 590 nm puis la viabilité cellulaire a été calculée. Chaque condition a été reproduite en triplicata, et l'expérience a été répétée 3 fois (**Figure 12**). Nos résultats montrent que le GRT-X n'induit pas de baisse de la viabilité cellulaire pour toutes les concentrations testées comparés au non cellules non traitées (**Figure 12**).

Sachant que la concentration de GRT-X n'a jamais été testée *in vitro* ni publiée dans la littérature, nous avons choisi la concentration de 10  $\mu$ M pour poursuivre nos expériences. La concentration de 10  $\mu$ M a été établie en fonction des autres molécules : XBD173, XE991 et ICA-27243. Ces différents composés ont déjà été testé *in vitro* et *in vivo* dans la littérature (Wickenden, Krajewski et al. 2008, Padilla, Wickenden et al. 2009, Bader, Wolf et al. 2019).



**Figure 12.** *Effet du GRT-X sur la viabilité cellulaire des cellules PC12. Les données représentent la moyenne  $\pm$  S.D. (analyse ANOVA suivie du 'Multiple Comparison Test' de Tukey).*

II. Les amorces construites ont une efficacité d'amplification comprise entre 95 et 110%

Suite à la réalisation d'une série de dilutions de l'ADNc (1 ng, 5 ng, 25 ng, 50 ng, 75 ng, et 100 ng) provenant des cellules PC12, des qPCR ont été réalisées en utilisant les paires d'amorces suivantes : Tspo, Kv7.2, Kv7.3, Stmn2, Périphérine, et Nfh. Les résultats des qPCR ont été représentés sous forme de courbe standard en fonction des concentrations respectives d'ADNc. L'efficacité d'amplification a ensuite été calculée par régression linéaire des courbes standard à l'aide de l'équation suivante :

$$E = 10^{-(1/\text{pente de la courbe standard})}$$

Les efficacités d'amplification calculées des amorces utilisées dans cette étude, ainsi que celles des amorces construites par nos collaborateurs (Sundaram, El Jalkh et al. 2021) se trouvent dans le tableau ci-dessous (**Tableau 7**) :

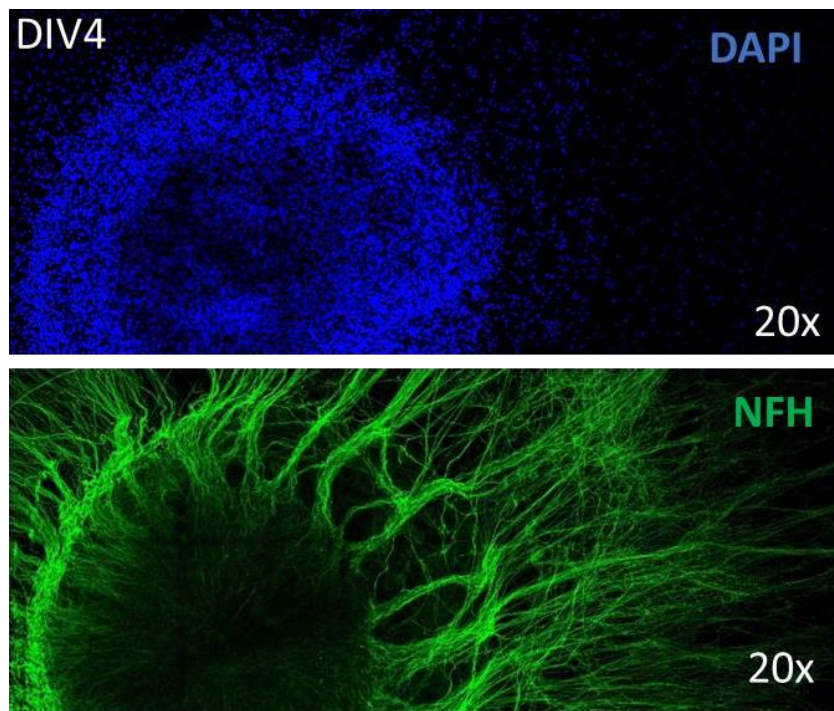
*Tableau 7. Efficacité d'amplification des amorces utilisées dans l'étude*

Paire d'amorce	Efficacité d'amplification
Tspo	100%
Kv7.2	100%
Kv7.3	96%
Mpz	99.50%
Mbp	99%
Dhh	100%
Plp	98%
Krox20	95%
CNPase	96%
Cad19	99.50%
Tfap2 $\alpha$	97.50%
Stmn2	100%
Périphérine	100%
Nfh	100%

En effet, les efficacités d'amplification des différentes amorces présentées sont comprises entre 95 et 100% et peuvent donc être utilisées pour le reste de l'étude.

### III. L'anticorps primaire anti-NFH est un bon marqueur axonal

Le but de cette expérience était de mettre au point la méthode d'immunocytochimie en testant l'efficacité de l'anticorps NFH, marqueur axonal connu pour reconnaître les neurofilaments lourds. Pour cela, des explants de DRG ont été extraits d'embryons provenant d'une femelle C57BL/6 gestante à E13.5. Les explants ont été cultivés jusqu'à DIV4, puis fixés au PFA 4%. Les axones ont été marqués à l'anti-NFH et les noyaux cellulaires au DAPI (**Figure 13**). Les observations microscopiques montrent que les neurofilaments des axones du DRG sont bien reconnus par l'anti-NFH. Cet anticorps spécifique sera utilisé dans toutes les manipulations qui suivent.

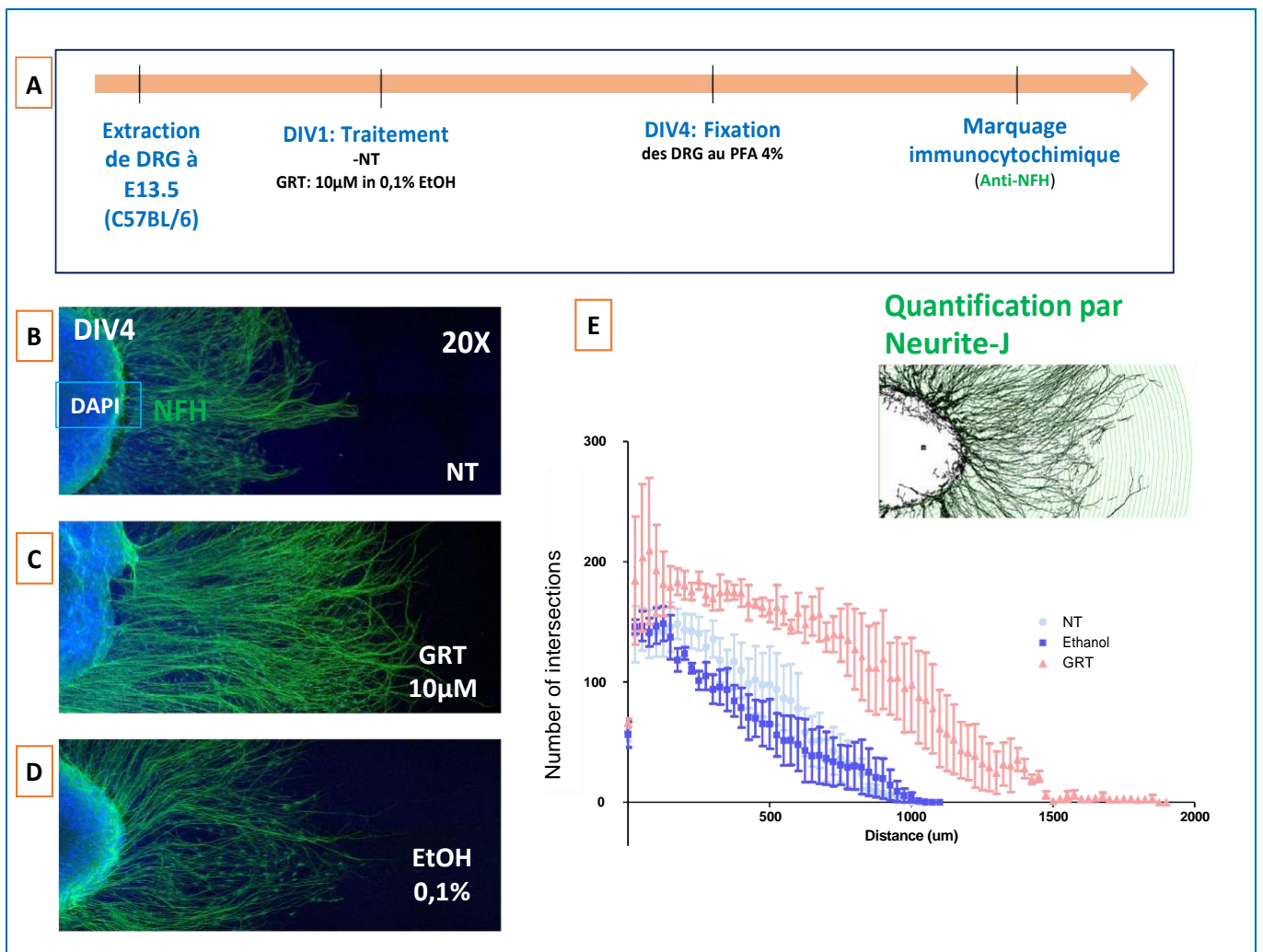


*Figure 13. Explant de DRG à DIV4 marqué à l'anti-NFH*

#### IV. Le composé GRT-X permet de promouvoir la poussée axonale des DRG embryonnaires C57BL/6 à DIV4

Le but de cette expérience préliminaire était d'évaluer le rôle du GRT-X sur la poussée axonale. Pour cela, des DRG embryonnaires ont été extraits de femelles gestantes C57BL/6 à E13.5. Les explants ont été cultivés, traités à DIV1, et arrêtés à DIV4 (**Figure 14 A**). Le groupe de DRG traités au GRT-X 10 $\mu$ M (**Figure 14 C**) a été comparé à un groupe non traité (NT) (**Figure 14 B**), et à un autre traité au véhicule, l'éthanol (**Figure 14 D**). Les cultures ont été arrêtées à DIV4 puis les axones ont été immunomarquées au anti-NFH et les noyaux cellulaires au DAPI pour être observés en microscopie confocale. Ensuite, la longueur des neurites ainsi que la densité du réseau axonal ont été quantifiés par Neurite-J, un plugin d'ImageJ. Le graphe montrant le nombre d'intersections (intersection des neurites avec chaque cercle circonscrit autour du soma du DRG) en fonction de la distance (en  $\mu$ m) a été tracé sur Prism (**Figure 14 E**). Les résultats montrent que les neurites des DRG traités au GRT-X sont plus longs (environ 2000  $\mu$ m) et que le réseau axonal est plus dense que ceux non traités ou traités au véhicule (environ 1000  $\mu$ m).

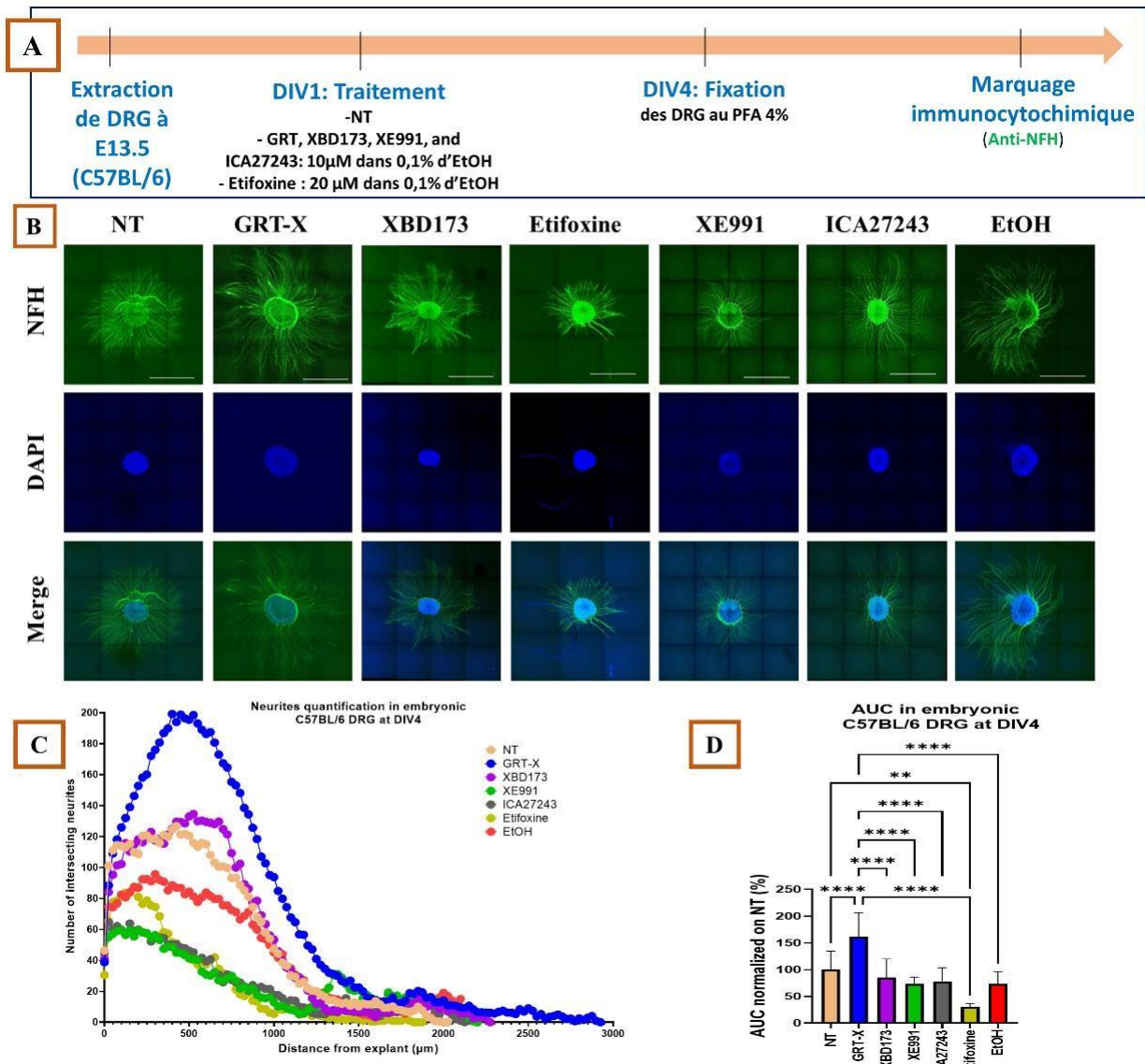
Ceci indique que le GRT-X a un effet positif sur la poussée axonale.



**Figure 14.** *GRT-X favorise la croissance axonale dans les explants DRG embryonnaires C57BL6/J à DIV4.* Les images présentées dans cette figure représentent la moitié d'explants de DRG acquises en z-stacks par microscopie confocale à 20X. **(A)** représente le protocole expérimental, **(B)** représente un DRG non traité, **(C)** représente un DRG traité au GRT-X 10 µM, et **(D)** représente un DRG cultivé en présence du véhicule, l'éthanol à 0,1%. La quantification des neurites par Neurite-J **(E)** a montré une augmentation de la longueur et de la densité des neurites dans le DRG traité au GRT-X par rapport aux autres groupes. LE GRT-X a donc un effet positif sur la croissance axonale.

- V. La poussée axonale d'explants de DRG C57BL/6 embryonnaires est favorisée par le GRT-X et inhibée par l'étifoxine, mais n'est pas affectée par les composés XBD173, ICA-27243, et XE991 à DIV4

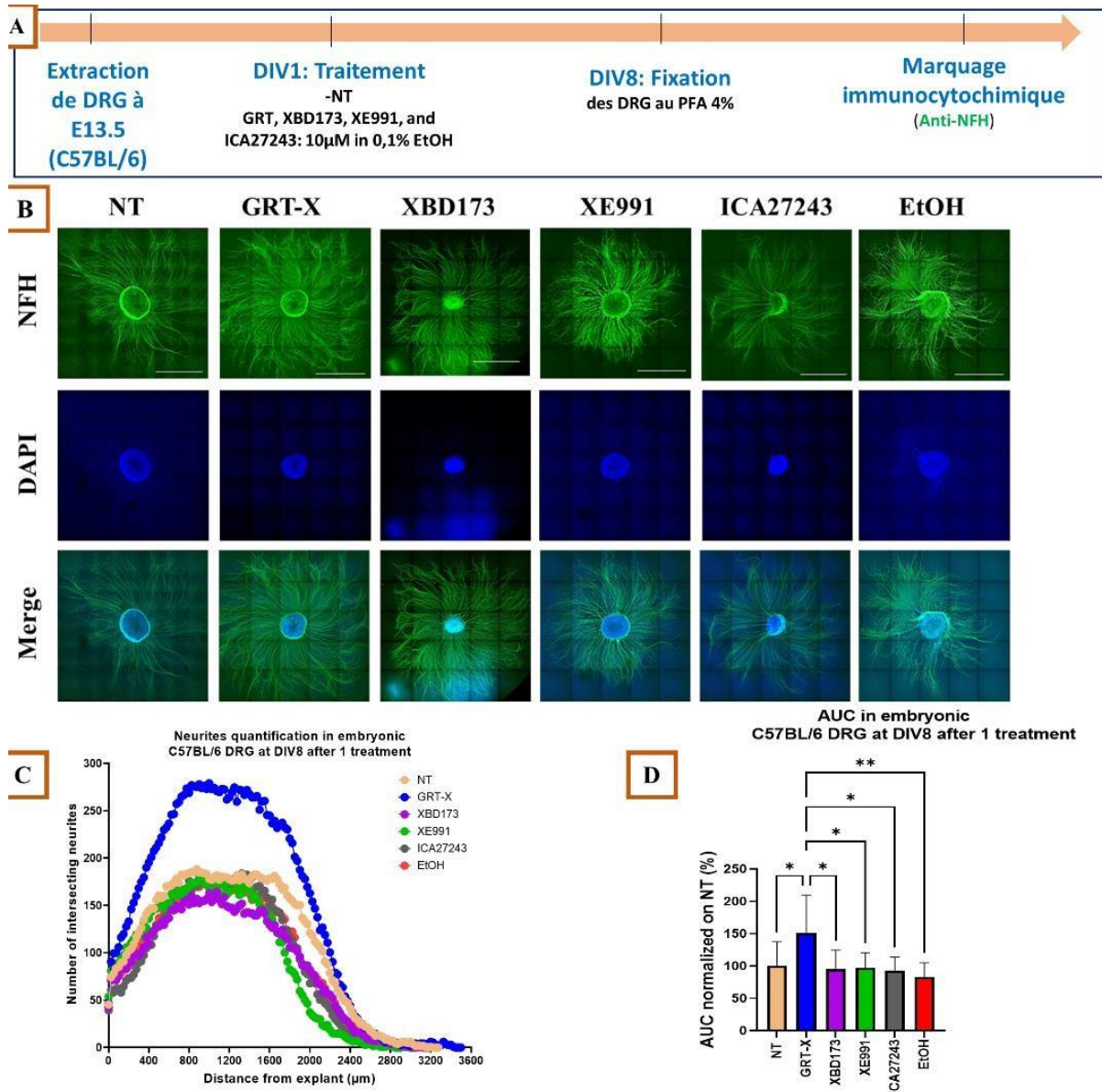
Le but de cette expérience était de comparer l'effet du GRT-X 10 $\mu$ M sur la poussée axonale à celui de deux ligands activateurs de TSPO : étifoxine 20 $\mu$ M et XBD173 10 $\mu$ M, un agoniste des Kv7.2/3 : ICA-27243 10 $\mu$ M, un antagoniste des Kv7.2/3 : XE991 10 $\mu$ M, et au véhicule commun : l'éthanol 0,1%. Pour cela, des explants de DRG ont été extraits d'embryons provenant de femelles C57BL/6 gestantes à E13.5. Les explants ont été traités à DIV1 et gardés en culture jusqu'à DIV4 puis fixés au PFA 4% (**Figure 15 A**). Les axones ont été immunomarqués à l'anti-NFH et les noyaux cellulaires au DAPI (**Figure 15 B**). Pour chaque groupe, 3 à 4 DRG ont été cultivés et l'expérience a été répétée 3 fois. Suite aux observations microscopiques, les neurites ont été quantifiés par Neurite-J et le graphe montrant le nombre d'intersections (intersection des neurites avec chaque cercle circonscrit autour du soma du DRG) en fonction de la distance (en  $\mu$ m) a été tracé sur Prism (**Figure 15 C**). Les aires sous la courbe (AUC) ont été calculées par la méthode trapézoïdale puis comparées entre les différents groupes (**Figure 15 D**). Les résultats confirment que le GRT-X augmente la longueur et la densité du réseau de neurites à DIV4. En effet, le traitement au GRT-X provoque une augmentation significative de l'AUC en comparaison aux autres groupes. En revanche, les traitements XBD173, XE991, ICA27243 et EtOH ne montrent pas d'effet sur la croissance des neurites. Cependant, l'étifoxine induit une inhibition de la poussée axonale à DIV4 et s'avère être toxique pour les cellules, c'est pourquoi elle a été exclue du reste de nos expériences.



**Figure 15.** La poussée axonale d'explants de DRG C57BL/6 embryonnaires est favorisée par le GRT-X et inhibée par l'étifoxine, mais n'est pas affectée par les composés XBD173, ICA-27243, et XE991 à DIV4. (A) représente le protocole expérimental, (B) représente les images de microscopie confocale des explants de DRG à DIV4 suite à leurs traitements par les différentes molécules à DIV1. (C) représente le graphe tracé sur 3 expériences indépendantes suite à la quantification par Neurite-J des neurites de 3 ou 4 DRG par traitement. (D) représente les aires sous la courbe des différents groupes après normalisation au groupe non traité. Les résultats montrent une augmentation significative de l'AUC du groupe traité au GRT-X et une diminution significative suite au traitement à l'étifoxine en comparaison aux autres groupes. Cependant, les composés XE991, ICA-27243, et l'EtOH n'affectent pas la poussée axonale. Les données représentent la moyenne  $\pm$  S.D sur trois expériences indépendantes. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

## VI. Le composé GRT-X maintient son effet positif sur la poussée axonale à DIV8 et après une seule dose de traitement

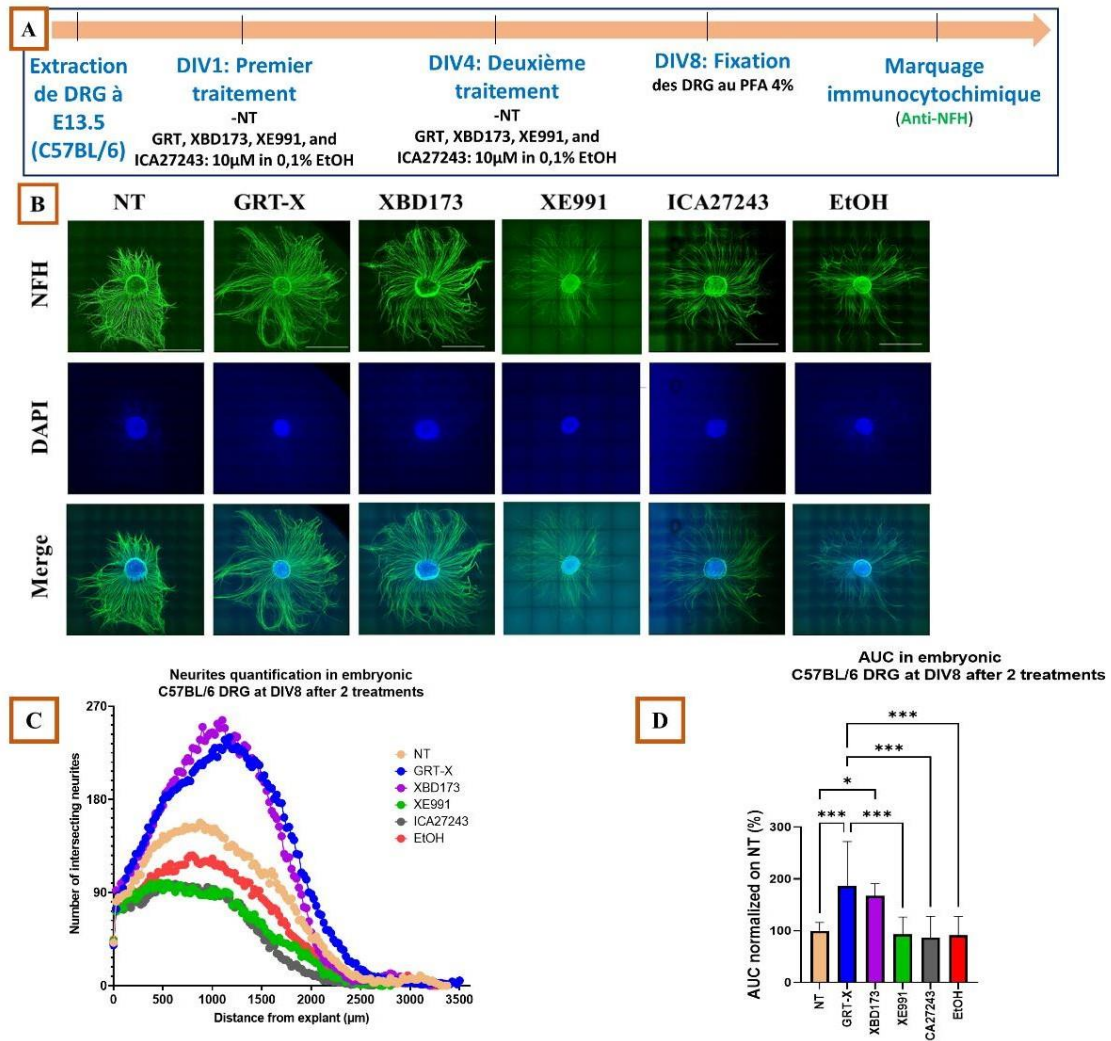
Afin d'évaluer la durabilité de l'effet positif du GRT-X dans le temps, des explants de DRG ont été extraits d'embryons provenant de femelles C57BL/6 gestantes à E13.5. Les différents groupes de DRG ont été traités à DIV1 et répartis comme suit : NT, GRT-X 10 $\mu$ M, XBD173 10 $\mu$ M, XE991, ICA-27243 10 $\mu$ M, et EtOH 0,1%. Les cultures ont été arrêtées à DIV8 puis fixées au PFA 4% (**Figure 16 A**). Les axones ont été immunomarqués à l'anti-NFH et les noyaux cellulaires au DAPI (**Figure 16 B**). Pour chaque groupe, 3 à 4 DRG ont été cultivés et l'expérience a été répétée 3 fois. Suite aux observations microscopiques, les neurites ont été quantifiés par Neurite-J et le graphe montrant le nombre d'intersections (intersection des neurites avec chaque cercle circonscrit autour du soma du DRG) en fonction de la distance (en  $\mu$ m) a été tracé sur Prism (**Figure 16 C**). Les aires sous la courbe (AUC) ont été calculées par la méthode trapézoïdale puis comparées entre les différents groupes (**Figure 16 D**). Les résultats montrent que l'AUC du groupe traité au GRT-X est significativement supérieure à celle des autres groupes. Cela indique que l'effet du GRT-X est maintenu dans le temps jusqu'à DIV8 et qu'une seule dose de traitement suffit pour promouvoir la poussée axonale.



**Figure 16.** *Le GRT-X maintient un effet positif sur la poussée axonale des explants de DRG C57BL/6 à DIV8 après une seule dose de traitement. (A) représente le protocole expérimental, (B) représente les images de microscopie confocale des DRG à DIV8 suite à leurs traitements par les différentes molécules à DIV1. (C) représente le graphe tracé sur 3 expériences indépendantes suite à la quantification par Neurite-J des neurites de 3 ou 4 DRG par traitement. (D) représente les aires sous la courbe des différents groupes après normalisation au groupe non traité. L'AUC du groupe traité au GRT-X est significativement supérieure à celles des autres groupes. Les données représentent la moyenne  $\pm$  S.D. sur 3 expériences indépendantes. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  (analyse ANOVA suivie du 'Multiple Comparison Test' de Tukey).*

## VII. Les composés GRT-X et XBD173 ont tendance à promouvoir la poussée axonale à DIV8 après deux doses de traitements

Le but de cette expérience était d'évaluer l'effet de deux doses des différents traitements sur la poussée axonale. Pour cela, des explants de DRG ont été extraits d'embryons provenant de femelles C57BL/6 gestantes à E13.5 et ont été traités une première fois à DIV1 puis une deuxième fois à DIV4 (avec les mêmes concentrations des traitements qu'à DIV1). Les différents groupes de DRG ont été répartis comme suit : NT, GRT-X 10 $\mu$ M, XBD173 10 $\mu$ M, XE991, ICA-27243 10 $\mu$ M, et EtOH 0,1%. Les cultures ont été arrêtées à DIV8 puis fixées au PFA 4% (**Figure 17 A**). Les axones ont été immunomarqués à l'anti-NFH et les noyaux cellulaires au DAPI (**Figure 17 B**). Pour chaque groupe, 3 à 4 DRG ont été cultivés et l'expérience a été répétée 3 fois. Suite aux observations microscopiques, les neurites ont été quantifiés par Neurite-J et le graphe montrant le nombre d'intersections (intersection des neurites avec chaque cercle circonscrit autour du soma du DRG) en fonction de la distance (en  $\mu$ m) a été tracé sur Prism (**Figure 17 C**). Les aires sous la courbe (AUC) ont été calculées par la méthode trapézoïdale puis comparées entre les différents groupes (**Figure 17 D**). Nos résultats révèlent que les aires sous la courbe (AUC) pour les groupes traités par GRT-X et XBD173 présentent une AUC significativement élevée par rapport aux autres groupes. Nous avons observé que GRT-X surpasse XBD-173 dans la promotion de la croissance axonale. Il émerge comme un ligand potentiellement novateur et efficace pour la TSPO, démontrant la capacité à stimuler la croissance axonale.



**Figure 17.** GRT-X et XBD-173 augmentent significativement la poussée axonale des DRG embryonnaires C57BL/6 à DIV8 après 2 traitements. **(A)** représente le protocole expérimental, **(B)** représente les images de microscopie confocale des DRG à DIV8 suite à leurs traitements par les différentes molécules à DIV1 et DIV4. **(C)** représente le graphe tracé sur 3 expériences indépendantes suite à la quantification par Neurite-J des neurites de 3 ou 4 DRG par traitement. **(D)** représente les aires sous la courbe des différents groupes après normalisation au groupe non traité. L'AUC des groupes traités par le GRT-X et XBD-173 sont significativement supérieures à celle des autres groupes. Les données représentent la moyenne  $\pm$  S.D. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  (analyse ANOVA suivie du 'Multiple Comparison Test' de Tukey).

VIII. Le composé GRT-X induit une augmentation de l'expression de gènes impliqués dans la myélinisation, le développement et la différenciation des cellules de Schwann et des neurones, ainsi que dans la structure axonale dans des cultures dissociées de DRG C57BL/6 embryonnaires à DIV4

Le but de cette expérience était de réaliser une étude moléculaire permettant d'évaluer les effets du GRT-X sur l'expression de gènes impliqués dans la myélinisation, la différenciation des cellules de Schwann, et dans la structure axonale, et de comparer ces effets à ceux des autres traitements (XBD173, XE991, et ICA-27243). Pour cela, des cultures dissociées de DRG embryonnaires provenant de femelles gestantes C57BL/6 à E13.5 ont été établies, puis traitées à DIV1, et les groupes ont été répartis comme suit : NT, GRT-X 10 $\mu$ M, XBD173 10 $\mu$ M, XE991, ICA-27243 10 $\mu$ M, et EtOH 0,1%. Les cultures ont été arrêtées à DIV4 et l'ARN total a été extrait des échantillons pour les études de RT-qPCR (**Figure 18 A**). Les taux d'ARNm de Tspo, Kv7.2, Kv7.3, Mpz, Mbp, Plp, Dhh, Krox20, CNPase, Tfp2 $\alpha$ , Périphérine, Cad19, et Nfh ont été quantifiés relativement aux taux d'ARNm de la Gapdh (**Figure 18**). A savoir, pour chaque groupe, tous les DRG présents au niveau de la moelle épinière ont été récoltés et cultivés (37 à 40 DRG par groupe), et l'expérience a été répétée 3 fois.

Concernant les gènes cibles du GRT-X (**Figure 18 B**), nos résultats montrent que tous les traitements induisent une augmentation significative de l'expression de Tspo et de Kv7.2, avec une augmentation significativement plus élevée suite aux traitements au GRT-X et au XBD173 par rapports aux autres groupes. Cependant, seuls les traitements GRT-X et XBD173 induisent une augmentation significative des taux d'ARNm du Kv7.3.

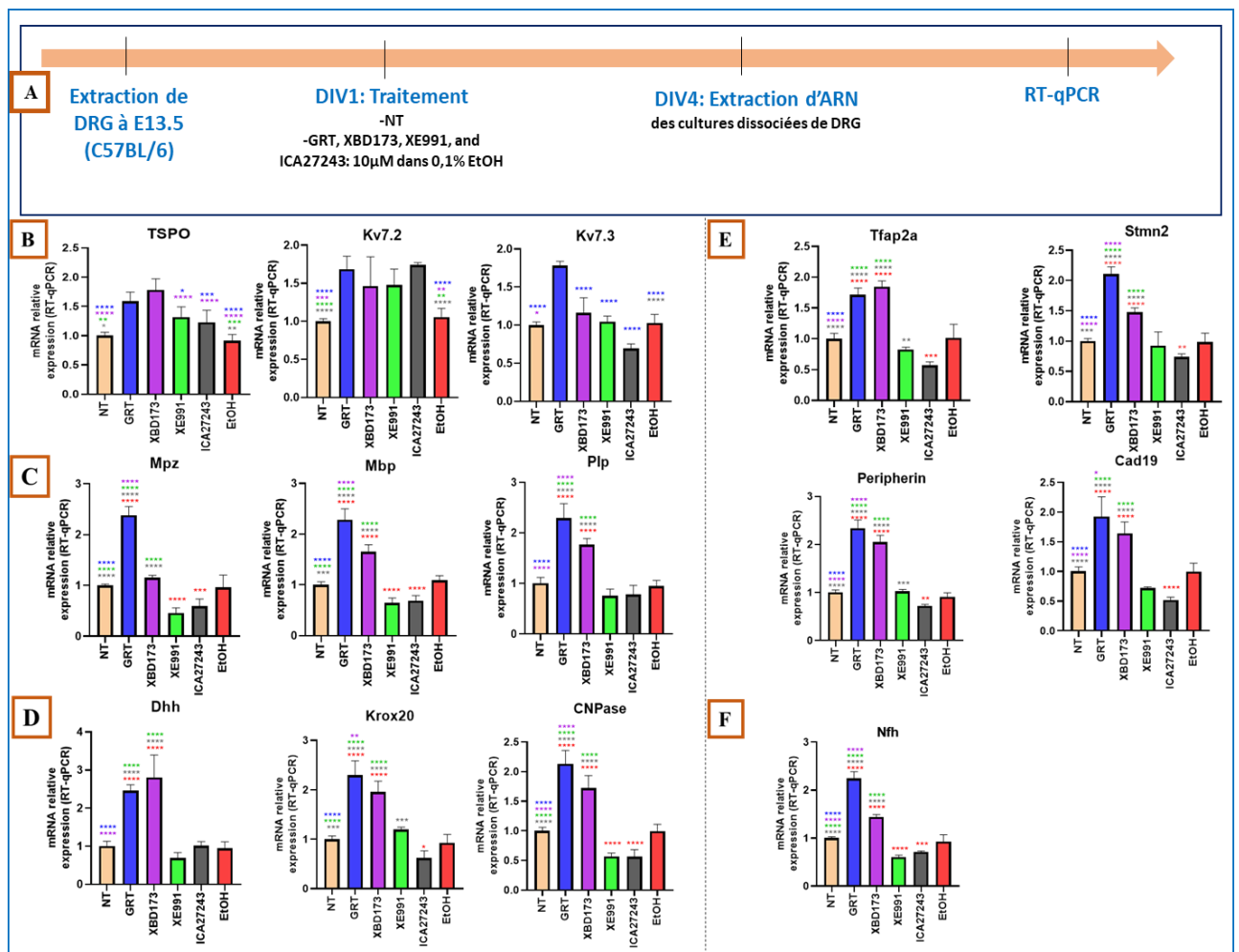
En ce qui concerne les gènes impliqués dans la myélinisation (**Figure 18 C**), les composés GRT-X et XBD173 favorisent tous deux l'augmentation des niveaux d'expression de l'ARNm total des gènes impliqués dans la formation et la structure de la myéline (Mpz, Mbp et Plp), avec un effet significativement plus important du GRT-X. En outre, les composés XE991 et ICA27243 entraînent une diminution des niveaux d'expression de l'ARNm des gènes Mpz et Mbp, mais n'ont aucun effet sur la Plp.

Quant aux gènes impliqués dans le développement et la différenciation des cellules de Schwann (**Figure 18 D**), nos résultats montrent que les composés GRT-X et XBD173 entraînent une augmentation significative de l'expression relative des gènes Dhh, Krox20, et CNPase, avec une augmentation significativement plus importante de l'expression de la Dhh par le composé XBD173, et de Krox20 et CNPase par le composé GRT-X. Cependant, le composés XE991 n'a pas

d'effet sur l'expression relative du gène de la Dhh, mais entraîne une augmentation de l'expression de Krox20, et une diminution de l'expression de la CNPase. Le composé ICA-27243 n'a pas d'effet sur l'expression relative de la Dhh, mais entraîne une diminution de l'expression de l'ARNm des gènes Krox20 et CNPase.

Concernant les gènes impliqués dans le développement et la différenciation neuronale (**Figure 18 E**), nos résultats montrent que les composés GRT-X et XBD173 augmentent tous deux les niveaux d'expression de l'ARNm total des gènes Tfap2 $\alpha$ , Stmn2, Périphérine et Cad19, avec un effet significativement plus élevé du GRT-X (sauf pour la Tfap2 $\alpha$ ). De plus, le XE991 n'a aucun effet sur l'expression des gènes, tandis que l'ICA-27243 diminue les niveaux d'expression de l'ARNm de tous les gènes énumérés précédemment.

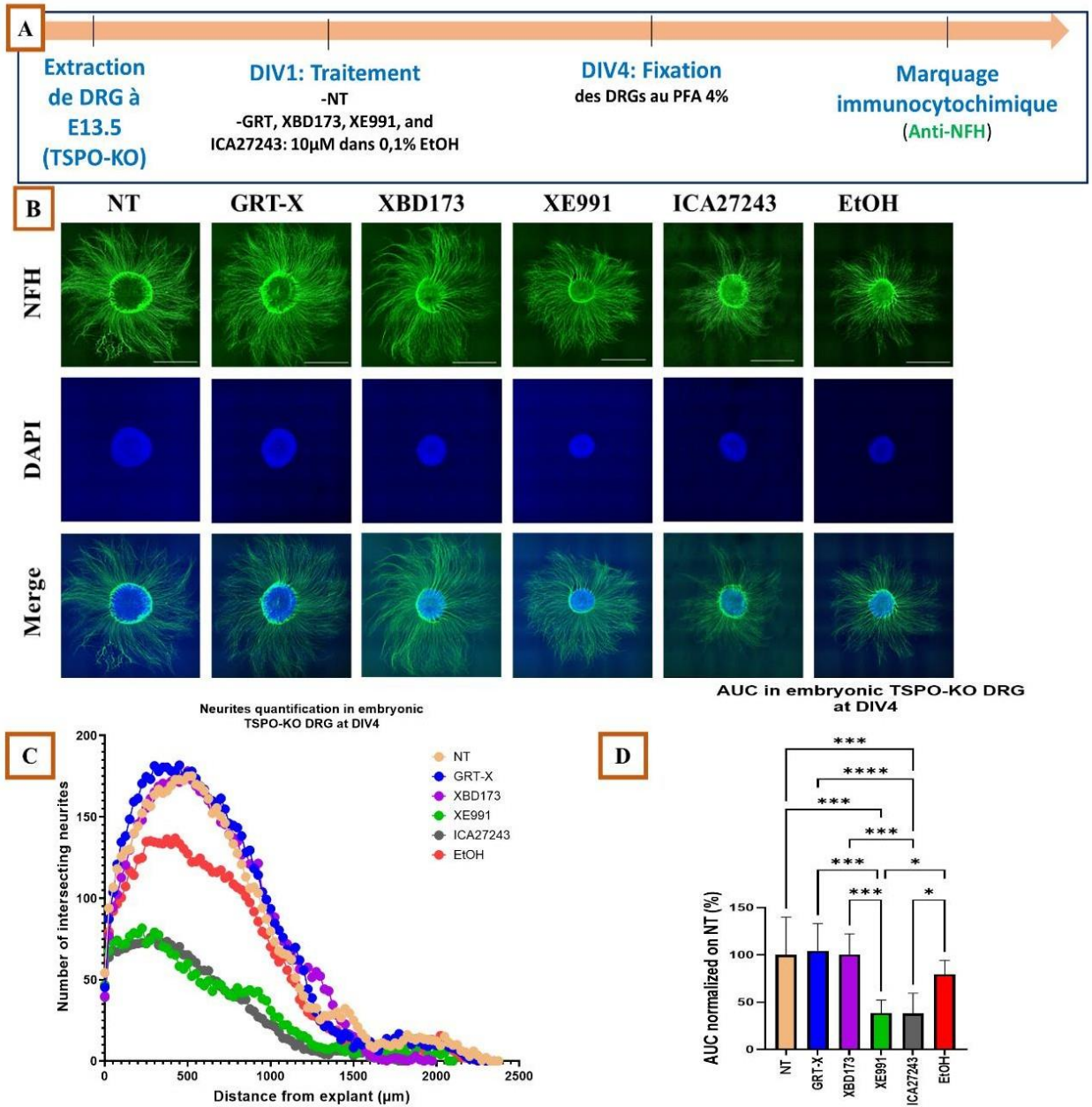
Concernant le gène axonal Nfh (**Figure 18 F**), les taux d'ARNm sont augmentés par les composés GRT-X et XBD173, avec un effet significativement plus important du GRT-X. Les composés XE991 et ICA27243 diminuent les taux d'ARNm du Nfh. L'éthanol n'a aucun effet sur l'expression des différents gènes cités. Voir tableau (**Tableau 8**) pour le résumé.



**Figure 18.** Quantification relative des taux d'ARNm de *Tspo*, *Kv7.2*, *Kv7.3*, *Mpz*, *Mbp*, *Plp*, *Dhh*, *Krox20*, *CNPase*, *Tfap2a*, *Périphérine*, *Cad19*, et *Nf h* de cultures dissociées de DRG embryonnaires C57BL/6 à DIV4 suite aux différents traitements. Les données représentent la moyenne  $\pm$  S.D sur 3 manipulations effectuées indépendamment. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.0001$  (analyse ANOVA suivie du 'Multiple Comparison Test' de Tukey).

## IX. Le composé GRT-X n'a pas d'effet sur la poussée axonale dans les explants DRG embryonnaires TSPO-KO à DIV4

Le but de cette expérience était de confirmer que l'effet positif du GRT-X sur la poussée axonale est médié par TSPO. Pour cela, et comme il n'existe pas d'outil pharmacologique permettant de bloquer l'expression de TSPO, nous avons répliqué nos expériences sur des explants de DRG embryonnaires provenant de femelles gestantes TSPO-KO à E13.5. Les explants ont été traités à DIV1 et gardés en culture jusqu'à DIV4 puis fixés au PFA 4% (**Figure 19 A**). Les axones ont été immunomarqués à l'anti-NFH et les noyaux cellulaires au DAPI (**Figure 19 B**). Pour chaque groupe, 3 à 4 DRG ont été cultivés et l'expérience a été répétée 3 fois. Suite aux observations microscopiques, les neurites ont été quantifiés par Neurite-J et le graphe montrant le nombre d'intersections (intersection des neurites avec chaque cercle circonscrit autour du soma du DRG) en fonction de la distance (en  $\mu\text{m}$ ) a été tracé sur Prism (**Figure 19 C**). Les aires sous la courbe (AUC) ont été calculées par la méthode trapézoïdale puis comparées entre les différents groupes (**Figure 19 D**). Nos résultats indiquent que GRT-X et XBD-173 n'influencent pas la croissance axonale, confirmant que l'impact des deux ligands est médié par la TSPO. Conformément aux attentes, les aires sous les courbes (AUC) pour les groupes traités avec XE991 et ICA27243 sont significativement plus basses que celles de tous les autres groupes. Cela confirme l'effet inhibiteur de XE991 et ICA27243 sur la croissance axonale des DRG *Tspo*<sup>-/-</sup> embryonnaires à DIV4.



**Figure 19.** *Le GRT-X n'a pas d'effet sur la poussée axonale d'explants de DRG embryonnaires TSPO-KO à DIV4.* (A) représente le protocole expérimental, (B) représente les images de microscopie confocale des explants de DRG à DIV4 suite à leurs traitements par les différentes molécules à DIV1. (C) représente le graphe tracé sur 3 expériences indépendantes suite à la quantification par Neurite-J des neurites de 3 ou 4 DRG par traitement. (D) représente les aires sous la courbe des différents groupes après normalisation au groupe non traité. Les résultats ne montrent pas d'effets des composés GRT-X et XBD173 sur la poussée axonale. Cependant, les composés XE991 et ICA27243 inhibent la poussée axonale. Les données représentent la moyenne  $\pm$  S.D sur 3 expériences indépendantes. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  (analyse ANOVA suivie du 'Multiple Comparison Test' de Tukey).

- X. Le composé GRT-X induit une augmentation de l'expression de certains gènes impliqués dans la myélinisation, le développement et la différenciation des cellules de Schwann et des neurones, mais pas celle de gènes impliqués dans la structure axonale dans des cultures dissociées de DRG TSPO-KO embryonnaires à DIV4

Afin de confirmer les résultats obtenus en microscopie confocale, des cultures dissociées de DRG embryonnaires provenant de femelles gestantes TSPO-KO à E13.5 ont été établies, puis traitées à DIV1, et les groupes ont été répartis comme suit : NT, GRT-X 10 $\mu$ M, XBD173 10 $\mu$ M, XE991, ICA-27243 10 $\mu$ M, et EtOH 0,1%. Les cultures ont été arrêtées à DIV4 et l'ARN total a été extrait des échantillons pour les études de RT-qPCR (**Figure 20 A**). Les taux d'ARNm de Kv7.2, Kv7.3, Mpz, Mbp, Plp, Dhh, Krox20, CNPase, Tfp2 $\alpha$ , Périphérine, Cad19, et Nfh ont été quantifiés relativement aux taux d'ARNm de la Gapdh (**Figure 20**). A savoir, pour chaque groupe, tous les DRG présents au niveau de la moelle épinière ont été récoltés et cultivés (37 à 40 DRG par groupe), et l'expérience a été répétée 3 fois.

Concernant les gènes cibles du GRT-X (à l'exception de Tsps puisque'il s'agit de souris TSPO-KO) (**Figure 20 B**), nos résultats montrent que les composés GRT-X, XBD173, et XE991 induisent une augmentation du taux d'ARNm du gène Kv7.2 avec un effet significativement supérieur du GRT-X. Cependant, le composé ICA-27243 induit une diminution de l'expression relative du Kv7.2. De plus, le composé GRT-X induit une augmentation du taux de l'ARNm du Kv7.3, alors que les composés XE991 et ICA-27243 induisent une diminution significative.

En ce qui concerne les gènes impliqués dans la myélinisation (**Figure 20 C**), le composé GRT-X induit une augmentation des taux d'ARNm de tous les gènes (Mpz, Mbp, et Plp). XBD173 et XE991 induisent également une augmentation de l'expression de Mbp, mais l'effet du GRT-X reste le plus important. En revanche, l'expression de la Plp est diminuée par l'administration des traitements XE991 et ICA-27243.

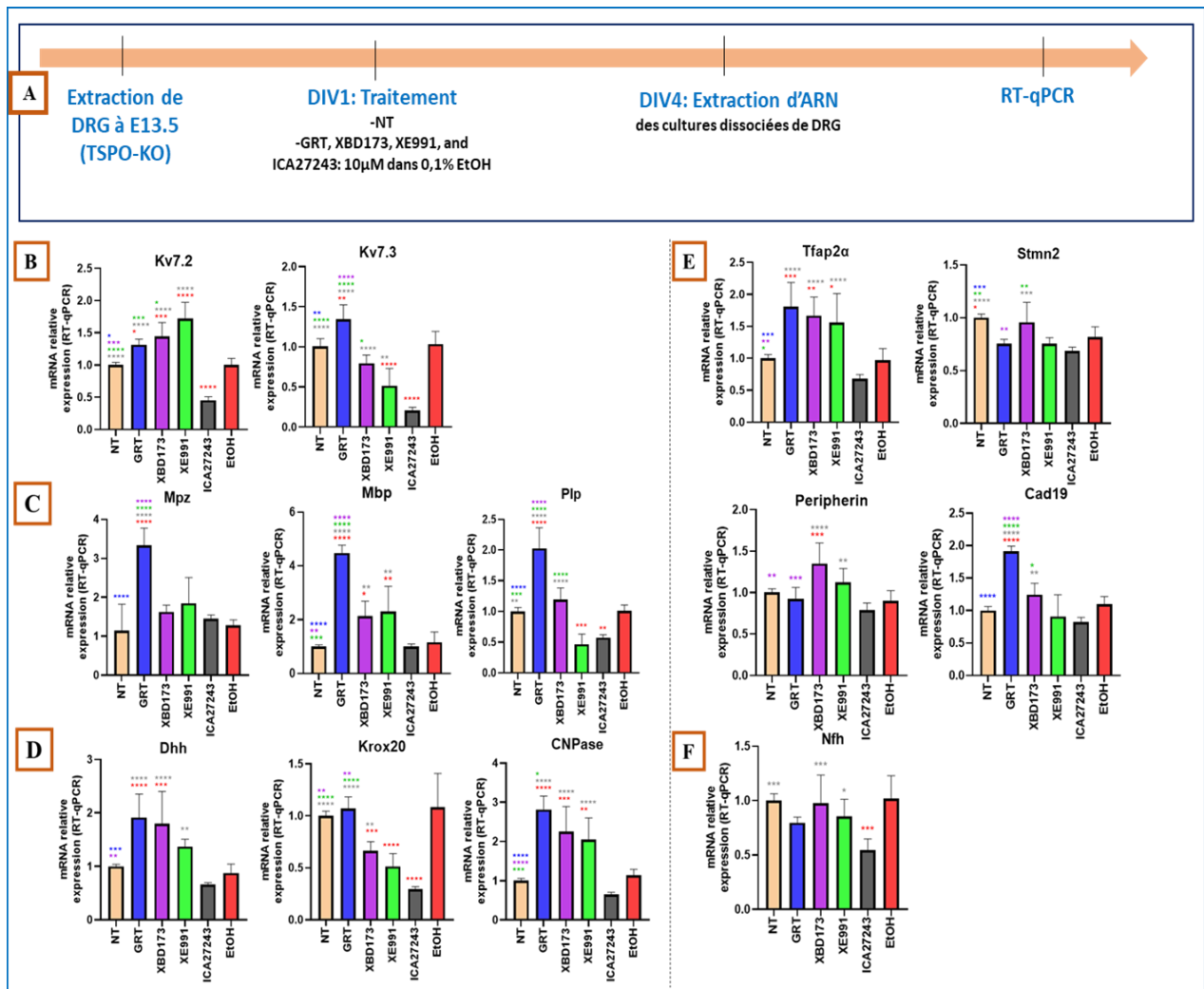
Quant aux gènes impliqués dans le développement et la différenciation des cellules de Schwann (**Figure 20 D**), nos résultats montrent que le composé GRT-X induit une augmentation du taux d'ARNm des gènes Dhh et CNPase, mais n'a pas d'effet sur l'expression de Krox20. Cependant, le composé XBD173 induit une augmentation de l'expression des 3 gènes (Dhh, Krox20, et CNPase). En revanche, le composé XE991 induit une diminution des taux d'ARNm de Krox20 et CNPase. Le composé ICA-27243 induit une diminution de l'expression de Krox20 mais n'a pas d'effet sur les deux autres gènes.

Concernant les gènes impliqués dans le développement et la différenciation neuronale (**Figure 20 E**), le GRT-X induit une augmentation de l'expression des gènes *Tfap2α* et *Cad19* et une diminution de celle de la *Stmn2*, mais n'a pas d'effet sur l'expression de la périphérine. Quant au composé XBD173, il induit une augmentation des taux d'ARNm des gènes *Tfap2α* et périphérine mais n'a aucun effet sur l'expression des gènes *Stmn2* et *Cad19*. Le composé XE991 induit une augmentation de l'expression de la *Tfap2α* et une diminution de celle de la *Stmn2*. Le composé ICA-27243 induit une diminution du taux d'ARNm de la *Stmn2*.

Concernant le gène axonal *Nfh* (**Figure 20 F**), les taux d'ARNm sont diminués suite au traitement par le composé ICA-272432. En revanche, les niveaux d'expressions ne sont pas affectés par les autres traitements, ce qui confirme les résultats observés en microscopie confocale.

L'éthanol n'a aucun effet sur l'expression des différents gènes cités.

Voir (**Tableau 8**) pour le résumé.



**Figure 20.** Quantification relative des taux d'ARNm de *Kv7.2*, *Kv7.3*, *Mpz*, *Mbp*, *Plp*, *Dhh*, *Krox20*, *CNPase*, *Tfap2α*, *Périphérine*, *Cad19*, et *Nfh* de cultures dissociées de DRG embryonnaires TSPO-KO à DIV4 suite aux différents traitements. Les données représentent la moyenne  $\pm$  S.D de 3 expériences effectuées indépendamment. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.0001$  (analyse ANOVA suivie du 'Multiple Comparaison Test' de Tukey).

Le tableau ci-dessous (**Tableau 8**) résume l'ensemble des effets des différents traitements (GRT-X, XBD173, XE991, ICA-27243, et EtOH) sur les taux d'expression de l'ARNm des différents gènes (*Tspo*, *Kv7.2*, *Kv7.3*, *Mpz*, *Mbp*, *Plp*, *Dhh*, *Krox20*, *CNPase*, *Tfap2α*, *Stmn2*, *Périphérine*, *Cad19*, et *Nfh*) dans les cultures dissociées de DRG à DIV4 provenant de souris C57BL/6 et TSPO-KO gestantes à E13.5.

**Tableau 8.** *Comparaison des effets des différents traitements sur les taux d'expression de l'ARNm des différents gènes dans les cultures dissociées de DRG à DIV4 provenant de souris C57BL/6 et TSPO-KO gestantes à E13.5.*

↑ : augmentation de l'expression ; ↓ : diminution de l'expression ; - : pas d'effet sur l'expression ; N/A : Non applicable pour

## Article

### **The TSPO and Kv7.2/3 potassium channel activator GRT-X stimulates dorsal root ganglia axonal growth**

Léa EL Chemali<sup>1</sup>, Michael Schumacher<sup>1\*</sup> and Liliane Massaad-Massade<sup>1\*</sup>

*Université Paris-Saclay, INSERM U1195 Diseases and Hormones of the Nervous System, Inserm and University Paris-Saclay, 94276 Le Kremlin-Bicêtre, Paris, France*

**\*Correspondence:** Liliane Massade ([liliane.massade@inserm.fr](mailto:liliane.massade@inserm.fr)); Michael Schumacher ([michael.schumacher@inserm.fr](mailto:michael.schumacher@inserm.fr)). Inserm U 1195 Diseases and Hormones of the Nervous System, Inserm and University Paris-Saclay, 94276 Le Kremlin-Bicêtre, Paris, France

#### **Résumé:**

Les lésions des nerfs périphériques entraînent souvent une récupération fonctionnelle insatisfaisante et des douleurs neuropathiques chroniques. La protéine translocatrice mitochondriale (TSPO) et les canaux potassiques Kv7.2/3 sont apparus comme des cibles potentielles pour améliorer la régénération nerveuse et soulager la douleur. Ce travail étudie le rôle de GRT-X, un composé qui cible à la fois TSPO et Kv7.2/3, dans la croissance axonale, en utilisant des cultures de ganglions spinaux (DRG) provenant de souris C57BL6/J et TSPO-KO<sup>-/-</sup>. Des études comparatives impliquant l'éthifoxine, le XBD173, l'ICA-27243 et le XE991 ont été menées dans les deux modèles. Nous montrons ici que GRT-X stimule fortement la croissance axonale dans les cultures d'explants de DRG. De plus, GRT-X favorise de manière significative la croissance axonale, surpassant les effets des autres composés évalués 4 ou 8 jours après une administration unique. XBD173 a également favorisé l'élongation axonale après 8 jours et deux administrations répétées. Dans les cultures dissociées de neurones DRG/cellules de Schwann, le GRT-X a augmenté les gènes associés à la croissance axonale et à la myélinisation. Dans les DRG Tsपो<sup>-/-</sup>, les effets stimulants du GRT-X sur la croissance axonale ont été perdus. Cependant, GRT-X et XBD173 ont encore activé l'expression des gènes des neurones et des cellules de Schwann après l'inactivation de la TSPO, ce qui suggère fortement l'existence de cibles supplémentaires. Ces résultats révèlent un rôle clé de la TSPO dans l'élongation axonale et dans le mode d'action à double cible du GRT-X sur les neurones du DRG.

## **The TSPO and Kv7.2/3 potassium channel activator GRT-X stimulates dorsal root ganglia axonal growth**

Léa EL Chemali<sup>1</sup>, Michael Schumacher<sup>1\*</sup> and Liliane Massaad-Massade<sup>1\*</sup>

*Université Paris-Saclay, INSERM U1195 Diseases and Hormones of the Nervous System, Inserm and University Paris-Saclay, 94276 Le Kremlin-Bicêtre, Paris, France*

**\*Correspondence:** Liliane Massade ([liliane.massade@inserm.fr](mailto:liliane.massade@inserm.fr)); Michael Schumacher ([michael.schumacher@inserm.fr](mailto:michael.schumacher@inserm.fr)). Inserm U 1195 Diseases and Hormones of the Nervous System, Inserm and University Paris-Saclay, 94276 Le Kremlin-Bicêtre, Paris, France

**Abstract:** Peripheral nerve injuries often lead to unsatisfactory functional recovery and chronic neuropathic pain. The mitochondrial translocator protein (TSPO) and Kv7.2/3 potassium channels have emerged as potential targets for enhancing nerve regeneration and alleviating pain. This work investigates the role of GRT-X a compound that targets both TSPO and Kv7.2/3, in axonal growth, employing embryonic dorsal root ganglia (DRG) cultures from C57BL/6/J and TSPO-KO<sup>-/-</sup> mice. Comparative studies involving etifoxine, XBD173, ICA-27243, and XE991 were conducted in both models. We show here that GRT-X, strongly stimulates axonal growth in DRG explant cultures. Moreover, GRT-X significantly promotes axonal growth, surpassing the effects of the other compounds assessed 4 or 8 days after a single administration. XBD173 also promoted axonal elongation after 8 days and repeated administration. In dissociated DRG neuron/Schwann cell cultures, GRT-X upregulated genes associated with axonal growth and myelination. In Tspo<sup>-/-</sup> DRG, the stimulatory effects of GRT-X on axonal growth were lost. However, both GRT-X and XBD173 still activated the expression of neuron and Schwann cell genes after TSPO invalidation, strongly suggesting the existence of additional targets. These findings uncover a key role of TSPO in axonal elongation and in the dual target mode of action of GRT-X on DRG neurons.

**Keywords:** TSPO, Kv7.2/3, GRT-X, axonal growth, genes regulation

## 1 Introduction

Adult peripheral nerves retain the ability to regenerate after lesions due to the permissive environment created by Schwann cells (SC) and macrophages infiltrating the denervated distal nerve stump. Phagocytosis of the myelin sheaths by both cell types contributes significantly to the growth permissive environment for the injured axons [1]. In addition, SC adopt a repair phenotype by down-regulating myelin-associated genes and by up-regulating genes supporting repair and regeneration [2]. Also, columnar structures, known as Bands of Büngner, are formed by the dedifferentiated repair Schwann cells providing structural scaffolds for the regenerating axons [3].

Another important contributor to successful axonal regeneration are the intrinsic changes of the lesioned neurons from a transmitter to a pro-regenerative state, with the upregulation of genes involved in signaling pathways supporting cell survival and neurite outgrowth [4] [5]. However, both the regenerative support by Schwann cells and the intrinsic ability of axons to regrow decrease with time, and peripheral nerve regeneration generally remains disappointing and insufficient in terms of functional recovery [6].

Insufficient peripheral nerve regeneration and functional restoration may also lead to the development of chronic neuropathic pain (CNP), which is difficult to treat. Partial pain relief is indeed only achieved in 40-60% of patients [7]. Stimulating and preserving over time the intrinsic capacity of axonal growth as well as preventing the chronification of neuropathic pain by pharmacological means thus represents an important but so far still unmet therapeutic objective for the treatment of traumatic injuries or axonopathies.

Opioids are generally prescribed to treat severe pain. However, they are not very effective and do not prevent the development of CNP from acute pain. Additionally, they can result in harmful side effects such as hyperalgesia, immunosuppression, and addiction linked to the development of opioid tolerance and dependence [8]. This highlights the need to find new treatments for neuropathic pain and preventing its chronification. Slow voltage-gated Kv7 K<sup>+</sup> channels have been identified as attractive drug targets of nerve injury pain as they regulate neuronal excitability and are strongly linked to CNP [9] [10]. Moreover, their expression levels in DRG change following axotomy [11] and peripheral nerve lesions [12].

Of the five Kv7 K<sup>+</sup> channels (Kv7.1-Kv7.5) encoded by the KCNQ genes, four are expressed in the nervous system, with Kv7.2/3 being major regulators of neuronal excitability [13]. First developed as an anti-epileptic drug, retigabine activates Kv7.2-5 channels and induces a hyperpolarizing shift. Retigabine was also shown to be effective for the treatment of

neuropathic pain and to be neuroprotective in preclinical rodent models [9] [14] [15]. However, because of adverse side effects, its clinical use has been discontinued for treating seizures.

Thus, efforts are underway to develop more subtype selective compounds [16]. The Kv7.2/3 channel preferring channel opener ICA27243, developed as an anti-epileptic drug, has been a step forward in this direction [17]. More recently, GRT-X (N-[(3-fluorophenyl)-methyl]-1-(2-methoxyethyl)-4-methyl-2-oxo-(7-trifluoromethyl)-1H-quinoline-3-carboxylic acid amide), synthesized for analgesic purposes, proved to be a highly selective Kv7.2/3 activator [18]. In addition, GRT-X was shown to be a potent activator of the mitochondrial translocator protein 18 kDa (TSPO) [19]. This dual activation of Kv7 and TSPO by GRT-X was proposed to explain its greater anti-hyperalgesic and anti-seizure potency when compared to retigabine in animal models [19] [20]. Importantly, GRT-X also promoted the viability of sensory and motor neurons and accelerated peripheral nerve regeneration and functional recovery after severe crush lesion of rat cervical spinal nerves [19]. These additional beneficial actions of GRT-X were attributed to TSPO activation.

We previously discussed the importance of TSPO due to its involvement in a variety of fundamental physiological functions and cellular processes, such as apoptosis, proliferation, and translocation of cholesterol into the inner mitochondrial membrane, which is the rate-limiting step for the synthesis of steroid hormones [21]. Studies have shown that several TSPO ligands promote neuroprotection, alleviate pain, increase neuronal survival, accelerate axonal regrowth and improve functional recovery in rodent lesion models [22-24]. However, the precise role of TSPO in axonal elongation could not be clarified because of the intricacy of *in vivo* models and the absence of specific pharmacological TSPO antagonists.

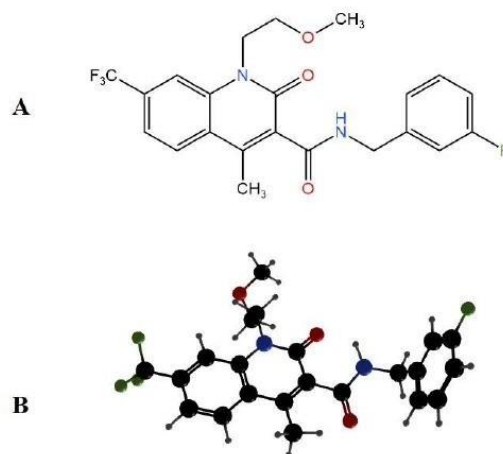
Here, we assessed the role of GRT-X on neurite growth in embryonic E13.5 dorsal root ganglia (DRG) explant cultures prepared from C57BL6/J or TSPO-KO (*Tspo*<sup>-/-</sup>) mice [25], and compared its effects to other treatments including two TSPO ligands: XBD173 (AC-5216, Emapunil) and etifoxine; a Kv7.2/3 agonist: ICA27243 and a Kv7.2/3 antagonist: XE991. We also evaluated and compared the effects of the different treatments on the expression levels of genes coding for the so far identified GRT-X targets (Kv7.2, Kv7.3, and *Tspo*) ; genes involved in the timing of Schwann cell development including cadherin 19 (*Cad19*, *Cdh19*), transcription factors AP-2alpha (*Tfap2α*, AP-2) and *Krox20* ; genes implicated in myelin formation or coding for major myelin structural proteins comprising desert hedgehog (*Dhh*), the 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase (*CNPase*), myelin protein zero (*Mpz*), myelin basic protein (*Mbp*) and myelin proteolipid protein (*Plp*) ; and genes involved in axonal maintenance and outgrowth, in particular stathmin-2 (*Stmn2*), peripherin and neurofilament heavy (*Nfh*). All

these genes have been shown to be expressed in E13.5 mouse DRG neuron/Schwann cell cultures [26].

## 2 Materials and methods

### 2.1 Chemicals

GRT-X (N-[(3-fluorophenyl)-methyl]-1-(2-methoxyethyl)-4-methyl-2-oxo-(7-trifluoromethyl)-1H-quinoline-3-carboxylic acid amide, chemical structure represented in **Figure 1**) and Etifoxine were provided by Grünenthal GmbH (Aachen, Germany). XBD173 and XE991 were purchased from Sigma Aldrich Chimie (SML1223 and X2254 respectively). ICA27243 was purchased from TargetMol (T15545). All compounds were dissolved in ethanol (final concentration 0.1%) with a final concentration of 10  $\mu$ M, except for the Etifoxine that was used at a final concentration of 20  $\mu$ M based on the literature [24].



**Figure 1. A:** Chemical structure of GRT-X (N-[(3-fluorophenyl)-methyl]-1-(2-methoxyethyl)-4-methyl-2-oxo-(7-trifluoromethyl)-1H-quinoline-3-carboxylic acid amide), **B:** 2D representation of GRT-X.

### 2.2 MTT cell viability assay ((3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)

The effect of the GRT-X on the viability of rat pheochromocytoma cells (PC12 cells, ATCC CRL-1721) was investigated by MTT assay. In each well, 2 700 PC12 cells were seeded in a 96-well plate containing the culture medium. Twenty-four hours later, different doses of GRT-X (5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 15  $\mu$ M, and 20  $\mu$ M) and the equivalent EtOH doses (0.025%, 0.05%, 0.1%, and 0.15%) were added to the wells and internal triplicates for each concentration were included in the experiment. 72h later, the cells were incubated for 2h at 37°C in the presence of MTT

solution according to the manufacturer's protocol. The culture medium was then removed and replaced by dimethyl sulfoxide (DMSO). The absorbance was read at 590 nm and the viability percentage of PC12 cells was assessed. The experiment was repeated 4 times.

### 2.3 Animals and Tissue Harvesting

Our experiments were performed on timed pregnant C57Bl6/J mice (Janvier Labs SC-C57J-F) and TSPO-knockout (TSPO-KO) mice (provided by Richard Banati, The University of Sydney) [25] at E13.5. The pregnant mice were sacrificed by cervical dislocation after being anesthetized with isoflurane. Embryos were surgically removed and placed in ice-cold L-15 media (Gibco 11415-064). Spinal cords were extracted from these embryos and DRGs were harvested based on established protocols [27,28]. All aspects of animal care and animal experimentation were performed in accordance with the relevant guidelines and regulations of INSERM and Université Paris-Saclay.

### 2.4 DRG Explants Cultures

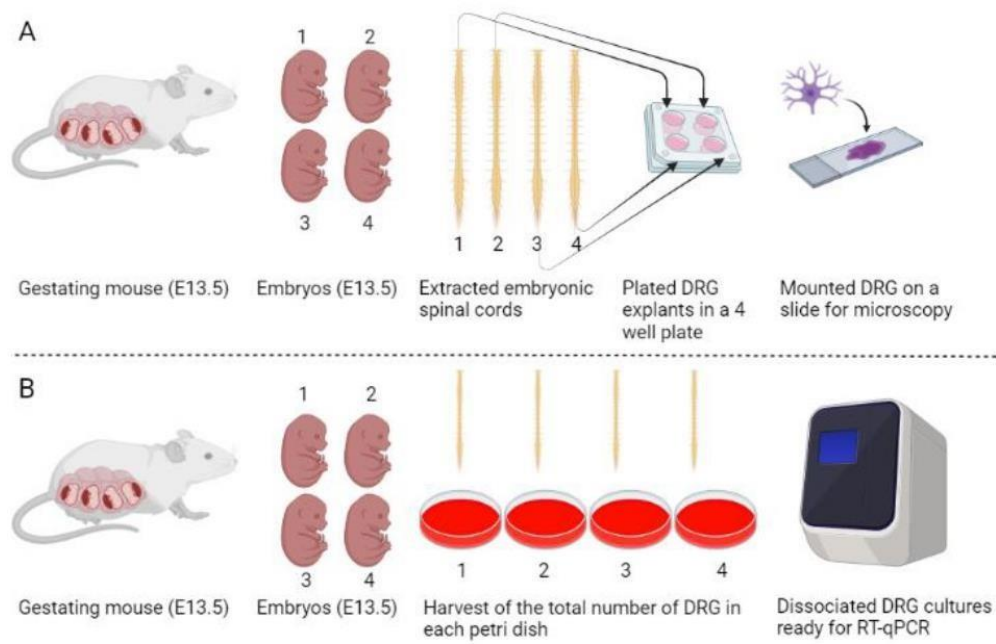
Following DRG harvesting as previously described, one DRG explant was placed and seeded in the center of a circular plastic coverslip (LFG distribution 174950) (**Figure 2 A**) previously coated with poly-L-lysine (PLL) (Sigma P7890) and collagen (R&D systems 3440-100-01) (**refer to Supplementary Material 1A for coating details**). The coverslips were placed in 4-well culture plates. The cells were first cultured in the DRG Plating Media (refer to Supplementary Material for media composition) for 16 h to allow the cells to adhere. The next day, the medium was replaced with Neurobasal Media (**refer to Supplementary Material 1B for media composition**) containing the different treatments (NT, GRT-X 10  $\mu$ M, XBD173 10  $\mu$ M, Etifoxine 20  $\mu$ M, XE991 10  $\mu$ M, ICA2743 10  $\mu$ M, EtOH 0.1%), and the cells were kept in culture for a specific period of time according to the groups (**Table 1**). For each experiment, n=3-4 DRG explants were cultured per group, and in each group, every DRG originated from a different embryo. Each experiment was repeated 2-3 times.

Group name	Mice species	Number of treatments	Day of treatment (DIV: Day <i>in vitro</i> )	Time <i>in vitro</i> before fixation
A	C57BL6/J	1	DIV1	4 days
B	C57BL6/J	1	DIV1	8 days
C	C57BL6/J	2	DIV1 and DIV4	8 days
D	TSPO-KO	1	DIV1	4 days

**Table 1. DRG explants groups' repartition.** Group A represents the DRGs that were extracted from C57BL6/J embryos, treated at Day *in vitro* 1 (DIV1), and stopped at DIV4. Group B represents the DRGs that were extracted from C57BL6/J embryos, treated at DIV1, and stopped at DIV8. Group C represents the DRGs that were extracted from C57BL6/J embryos, treated at DIV1 and DIV8, and stopped at DIV8. Group D represents the DRGs that were extracted from TSPO-KO embryos, treated at DIV1, and stopped at DIV4.

## 2.5 Dissociated DRG Cultures

DRG were extracted from C57BL6/J embryos as previously described. A total of 40 DRG were harvested per embryo for each group (**Figure 2 B**). Based on the experimental protocol developed by our collaborators [26], DRG were then trypsinized (0.25% trypsin in 1X HBSS) and incubated at 37°C for 30 minutes. Trypsinization was then stopped by L-15 medium containing 10% horse serum (Gibco, 26050088). DRG were centrifuged at 1500 rpm for 5 minutes. The supernatant was removed and the tissues were resuspended in DRG Plating Media and triturated 30 times with a sterilized Pasteur pipette until a homogeneous cell suspension was obtained. For each treatment (NT, GRT-X, XBD173, XE991, ICA27243, EtOH), 40 dissociated DRGs were plated on 35 mm culture dishes previously coated with PLL (Sigma P7890) and collagen (R&D systems 3440-100-01). The cells were first cultured in 'DRG Plating Media' for 16 hours to allow the cells to adhere. The next day, the culture medium was replaced with Neurobasal Media containing the different treatments (NT, GRT-X 10  $\mu$ M, XBD173 10  $\mu$ M, Etifoxine 20  $\mu$ M, XE991 10  $\mu$ M, ICA2743 10  $\mu$ M, EtOH 0.1%), and the cells were kept in culture for a period of 4 days. The experiments were repeated 3 times.



**Figure 2. Experimental Design (A)** For DRG explant cultures, embryos are surgically removed from pregnant females at E13.5, and spinal cords are subsequently extracted. Each treatment (NT, GRT-X, XBD173, XE991, ICA27243, and EtOH) is allocated to a separate 4-well plate, with each well containing a DRG explant from a distinct embryo. Confocal microscopy is conducted at the designated time points after mounting the DRG explants on slides. **(B)** In the case of DRG dissociated cultures, spinal cords are obtained following the same procedure as in (A). A total of 40 DRGs per spinal cord are harvested and cultured in individual petri dishes, each representing a distinct treatment group (NT, GRT-X, XBD173, XE991, ICA27243, and EtOH). Real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) analysis is performed according to the specified time points.

## 2.6 Immunocytochemistry

The DRG explants, whether extracted from C57BL6/J or TSPO-KO mice under different conditions, were first fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) for 30 minutes at room temperature (RT). After 3 washes with 1X phosphate buffered saline (PBS), the coverslips were incubated in Antigen Retrieval Buffer (10 mM Sodium Citrate, 0.05% Tween20, pH 6.0) preheated to 95°C for 3 minutes. The samples were washed twice with PBS 1X, incubated for 30 minutes in a 0.1 M Glycine solution, permeabilized (0.25% Triton X100 0.1% Tween 20 in PBS 1X, 20 min at RT), and then blocked (2% BSA, 0.1% Tween 20, 10% Normal Donkey Serum, 1 h at RT). DRG explants were incubated overnight with a primary antibody against heavy neurofilaments (anti-NFH 1:600, Millipore AB1989) at 4°C. The next day, coverslips were washed three times with PBS 1X 910 minutes for every wash) and were incubated with

donkey anti-rabbit secondary antibody (1:1000, Jackson 711-545-152) for 1h at RT in the dark. Samples were then washed with PBS 1X, and nuclei were stained with DAPI (1:1500, Thermo Fisher Scientific 62247). Samples were then mounted on slides using a mounting media (Inova Diagnostics Inc 426950) and stored at 4°C until confocal imaging.

## 2.7 Imaging and Image Analysis

Confocal imaging of fixed DRG explants was performed using the Leica SP8 microscope. Images were acquired as z-stacks at 10X magnification and then analyzed using ImageJ software. For every experimental condition, 3-4 biological replicates (embryos) and 2-3 technical replicates (gestating females) were analyzed. Neurite length and density were performed on z-projections with maximal intensity using the Neurite-J plugin of ImageJ after thresholding the images. The plugin indicates the number of neurites at different distances from the explant [29]. Data was exported to Microsoft Excel, graphs were plotted using Prism v9.5.1 software, and areas under the curve (AUC) were calculated based on the trapezoidal method.

## 2.8 Total RNA Isolation

RNA was extracted from the samples using 500 µl of TRIzol reagent (Ambion Life Technologies 15596018) as described in the manufacturer's protocol with some modifications. In order to limit salts precipitation, isopropanol was used instead of 100% ethanol. Moreover, RNA was allowed to precipitate overnight in the presence of glycogen at -20°C. The next day, RNA pellets were obtained after centrifugation and possible contaminations were eliminated after three washes with 70% ethanol. Tubes were kept open under the hood for 10 minutes to allow them to dry. RNA was resuspended in 20 µl of RNase-free water containing 0.1 mM EDTA, pH 8,0 (Invitrogen AM9912). RNA samples were stored at -80°C until RT-qPCR.

### 2.8.1 RT-qPCR

Five hundred nanogram of the total RNA was reverse transcribed using the M-MLV RT buffer pack (Invitrogen, Charbonnières-les-Bains, France). After that, real-time PCR (qPCR) was conducted with the CFX96TM Real-time system (Biorad) using the Maxima SYBR Green Rox qPCR master mix (Thermo Scientific, Villebon-sur-Yvette, France), according to the manufacturer's instructions. Each experiment was performed at least three times in duplicates. Relative gene expression of the targeted genes was determined by the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method and normalized to GAPDH mRNA expression levels of the treated DRG groups were compared to non-treated (NT) DRG.

### 2.8.2 Primer Design and Efficiency

Tspo, Kv7.2, Kv7.3, Stmn2, Peripherin, Nfh, and GAPDH primers used in this study were designed using the Oligo Explorer software. Splice variants and the protein-coding sequence of the genes were found using the National Center for Biotechnology (NCBI) database. For every gene, the common sequence between the different variants was identified using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Primer sequences were then generated by the Oligo Explorer software. Serial dilutions of cDNA followed by qPCR were used to calculate the amplification efficiency of the primers. qPCR results were plotted as a standard curve against the respective concentrations of cDNA. Amplification efficiency was calculated by linear regression of standard curves using the following equation:  $E = 10^{-(1/\text{slope of the standard curve})}$ . Primer pairs with an efficiency between 95 and 100%, as well as an  $R^2$  value (Determination coefficient) equal or greater than 0.98 were chosen for the study (refer to the **Supplementary Material 2** for the sequences of the chosen primers).

The other primers used in this study (Mpz, Mbp, Dhh, PLP, Krox20, CNPase, Cad19, and Tfap2 $\alpha$ ) were designed and chosen by our collaborators after the calculation of the amplification efficiency [26] (refer to the **Supplementary Material 2** for the primer sequences).

### 2.9 Statistical Analysis

Statistics were computed using the GraphPad Prism 9.5.1 software. Differences between groups were calculated by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test. A value of  $p < 0.05$  was considered significant. Results are plotted as mean  $\pm$  SD.

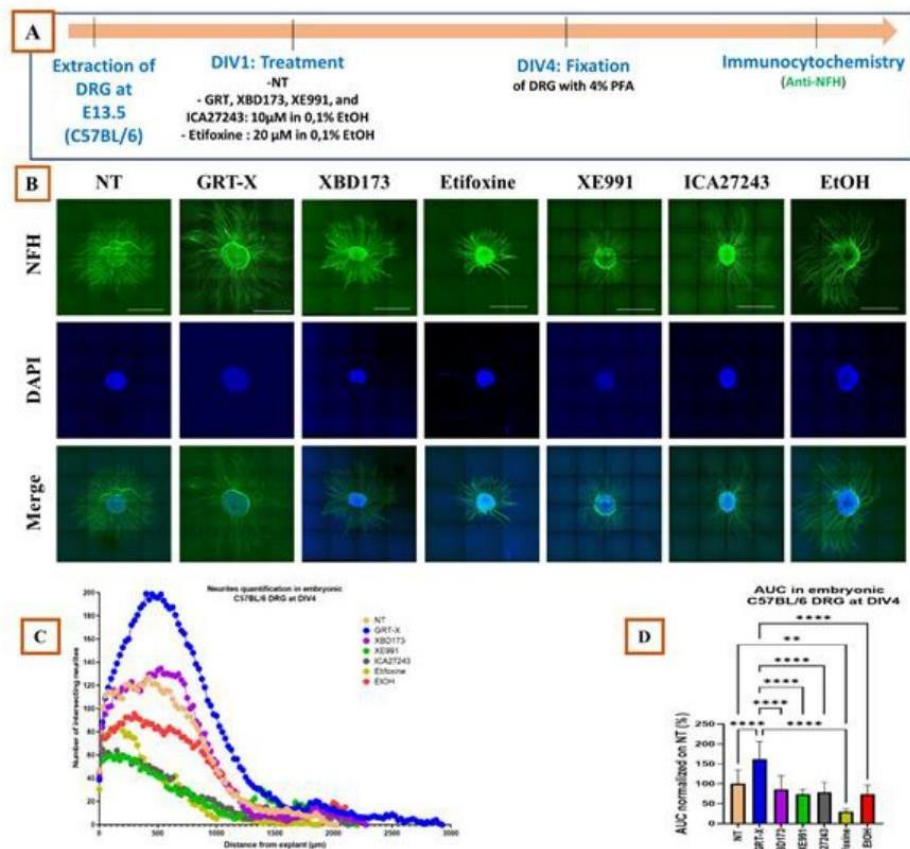
### 3 Results

#### 3.1 GRT-X promotes neurite growth in embryonic C57BL6/J DRG at DIV4

We initially established our experimental procedures, beginning with a cell viability assessment of GRT-X at various concentrations (5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 15  $\mu$ M, 20  $\mu$ M) in PC12 cells using the MTT assay. Concentrations were based on previously established binding properties and functional potencies of GRT-X [19]. All tested concentrations of GRT-X did not adversely affect cell viability (**Supplementary Figure 1**). Consequently, we selected the 10  $\mu$ M dose for our subsequent experiments.

We then conducted an initial assessment of the positive impact of 10  $\mu$ M GRT-X on neurite network growth in E13.5 C57BL6/J DRG explants at DIV4 (**Supplementary Figure 2**). Subsequently, we compared the effects of GRT-X on axonal growth to other treatments in E13.5 C57BL6/J DRG explants, including two TSPO agonists (XBD173 and etifoxine at 10  $\mu$ M and 20  $\mu$ M, respectively), a Kv7.2/3 antagonist (XE991 at 10  $\mu$ M), a Kv7.2/3 agonist (ICA27243 at 10  $\mu$ M), and the control vehicle (0.1% ethanol). DRG explants were obtained from embryos at E13.5, treated at DIV1, and cultured until DIV4, followed by fixation with 4% PFA (**Figure 3A**). Axons were immunolabeled with anti-NFH, and cell nuclei were stained with DAPI (**Figure 3B**). Each group comprised 3 to 4 DRGs, and the experiment was repeated thrice. Neurite quantification was performed using Neurite-J, and the graph depicting the number of intersections at varying distances (in  $\mu$ m) was generated in Prism (**Figure 3C**). Areas under the curve (AUC) were calculated using the trapezoidal method and compared among the groups (**Figure 3D**).

The results affirm that GRT-X significantly enhances the length and density of the neurite network at DIV4, with a marked increase in AUC compared to the other groups. In contrast, XBD173, XE991, ICA27243, and EtOH treatments exhibited no effect on neurite growth. However, etifoxine inhibited axonal growth at DIV4 and was cytotoxic, leading to its exclusion from subsequent experiments.

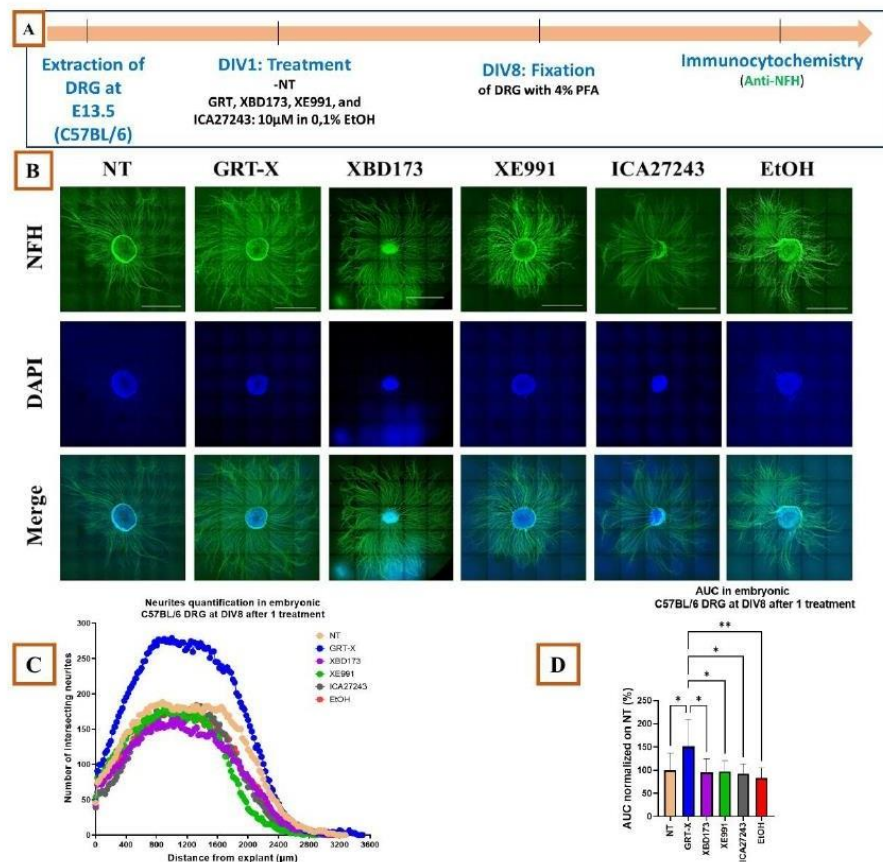


**Figure 3. Impact of various compounds on axonal growth in embryonic C57BL/6 DRG explants at DIV4.** (A) Depicts the experimental protocol, (B) Displays confocal microscopy images of DRG explants at DIV4 following treatments initiated at DIV1. (C) Shows the mean of 3-4 DRGs per treatment across 3 independent experiments after quantification using Neurite-J. (D) represents the mean and the SD of the calculation of the areas under the curve (AUC) for the different treatment groups after normalizing on non-treated (NT). The data is presented as mean  $\pm$  standard deviation with statistical significance indicated as \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , and \*\*\*\* $p < 0.0001$  (ANOVA analysis followed by Tukey's Multiple Comparison Test).

### 3.2 GRT-X maintains its positive effect on axonal growth in E13.5 C57BL6/J DRG explants at DIV8

To assess the durability of GRT-X's positive effects over time, we extracted DRG explants from E13.5 embryos of pregnant C57BL/6 females. The DRG groups were treated at DIV1 and categorized as follows: NT, GRT-X 10µM, XBD173 10µM, XE991, ICA-27243 10µM, and EtOH 0.1%. Cultures were terminated at DIV8 and subsequently fixed in 4% PFA (Figure 4A). Axons were labeled with anti-NFH, and cell nuclei were stained with DAPI (Figure 4B). Each group comprised 3 to 4 DRGs, and the experiment was repeated thrice. Following microscopic

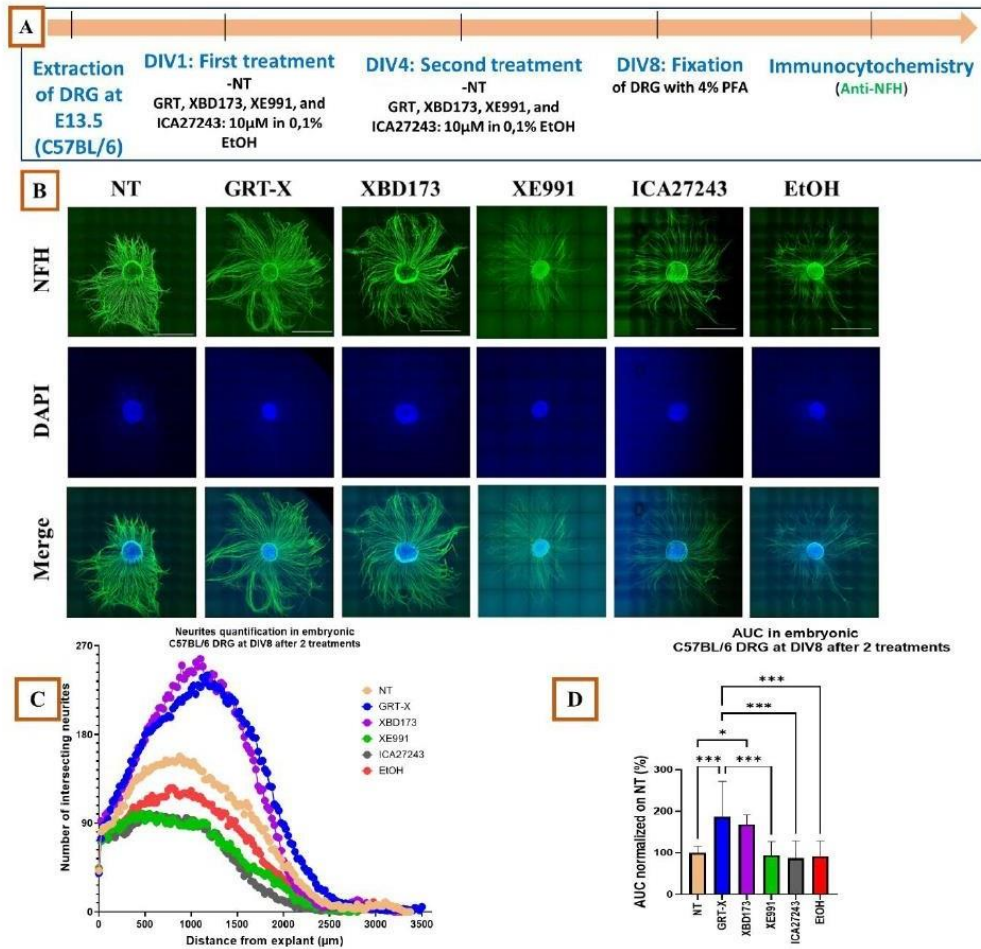
examinations, neurites were quantified using Neurite-J, and the graph displaying the number of intersections (intersection of neurites with each circumscribed circle around the DRG soma) as a function of distance (in  $\mu\text{m}$ ) was generated in Prism (**Figure 4C**). The areas under the curve (AUC) were calculated using the trapezoidal method and compared among the different groups (**Figure 4D**). The results show that the AUC of the GRT-X-treated group is significantly higher than that of the other groups. This suggests that the positive effect of GRT-X is sustained over time up to DIV8, and that a single treatment dose is adequate to promote axonal growth.



**Figure 4. GRT-X maintains a positive effect on axonal growth in C57BL/6 DRG explants at DIV8 after a single dose of treatment.** (A) represents the experimental protocol, (B) represents confocal microscopy images of DRGs at DIV8 following their treatment with the different molecules at DIV1. (C) represents the mean of 3-4 DRGs per treatment across 3 independent experiments after quantification using Neurite-J (D) represents the calculation of the areas under the curve of the different groups after normalizing to the non-treated group (NT). Data represent mean  $\pm$  S.D; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , and \*\*\* $p < 0.0001$  (ANOVA analysis followed by Tukey's Multiple Comparison Test).

### 3.3 GRT-X and XBD173 increase axonal growth in E13.5 C57BL/6/J DRG explants at DIV8 after two treatments

The objective of this experiment was to assess the impact of two doses of various treatments on axonal growth. DRG explants were obtained from pregnant C57BL/6 females' embryos at E13.5 and treated initially at DIV1 and subsequently at DIV4, using the same treatment concentrations as at DIV1. The different DRG groups were categorized as follows: NT, GRT-X 10 $\mu$ M, XBD173 10 $\mu$ M, XE991, ICA-27243 10 $\mu$ M, and EtOH 0.1%. Cultures were halted at DIV8 and fixed with 4% PFA (**Figure 5A**). Axons were immunolabeled with anti-NFH, and cell nuclei were stained with DAPI (**Figure 5B**). Each group comprised 3 to 4 DRGs, and the experiment was repeated thrice. After microscopic examinations, neurites were quantified using Neurite-J, and the graph displaying the number of intersections (intersection of neurites with each circumscribed circle around the DRG soma) in relation to distance (in  $\mu$ m) was generated in Prism (**Figure 5C**). The areas under the curve (AUC) were determined employing the trapezoidal method and subsequently compared across different experimental groups (**see Figure 5D**). Our findings reveal that the AUCs for the GRT-X and XBD173-treated groups exhibit a significantly elevated AUC compared to the other groups. We observed that GRT-X outperforms XBD-173 in promoting axonal growth. It emerges as a potentially novel and efficient ligand for TSPO, demonstrating the ability to stimulate axonal growth.



**Figure 5. Effect of different treatments on axonal growth in C57BL/6 embryonic DRGs at DIV8 after two treatment sessions.** (A) Illustrates the experimental protocol, (B) displays confocal microscopy images of DRGs at DIV8 following treatment with various molecules at DIV1 and DIV4. (C) Presents the graph resulting from Neurite-J quantification of neurites from 3-4 DRGs per treatment across 3 independent experiments. (D) Shows the calculation of the areas under the curve (AUC) for the different treatment groups after normalizing to the non-treated (NT) group. The data is presented as mean  $\pm$  standard deviation, and statistical analysis was conducted using ANOVA followed by Tukey's Multiple Comparison Test. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , and \*\*\* $p < 0.0001$

### 3.4 GRT-X induces increases in the expression of genes involved in myelination, Schwann cell and neuronal development and differentiation, and axonal structure

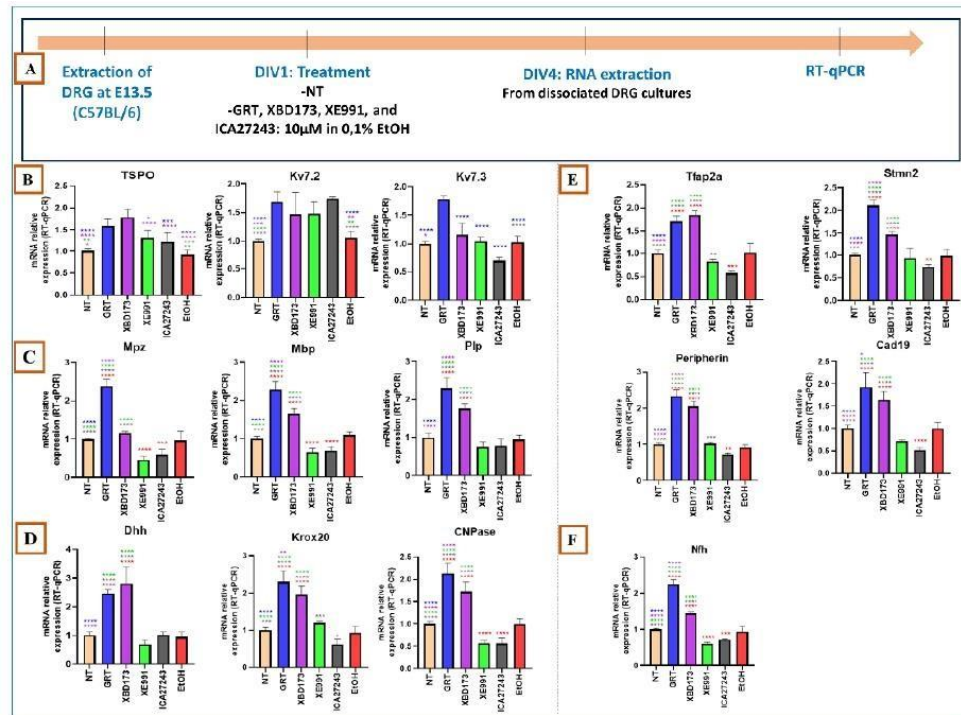
The purpose of this experiment was to conduct a molecular study assessing the impact of GRT-X on the expression of genes associated with myelination, Schwann cell differentiation, axonal structure, and to compare these effects to other treatments (XBD173, XE991, and ICA-27243). To achieve this, dissociated cultures of embryonic DRGs from pregnant C57BL/6 females at

E13.5 were established, treated at DIV1, and divided into the following groups: NT, GRT-X 10 $\mu$ M, XBD173 10 $\mu$ M, XE991, ICA-27243 10 $\mu$ M, and EtOH 0.1%. Cultures were terminated at DIV4, and total RNA was extracted from the samples for RT-qPCR studies (**Figure 6**). mRNA levels of Tspo, Kv7.2, Kv7.3, Mpz, Mbp, Plp, Dhh, Krox20, CNPase, Tfap2 $\alpha$ , Peripherin, Cad19, and Nfh were quantified relative to Gapdh mRNA levels (**Figure 6A**). Each group consisted of all DRGs present in the spinal cord, with 37 to 40 DRGs per group, and the experiment was repeated three times.

Regarding GRT-X target genes, our findings reveal that all treatments induce a significant increase in Tspo and Kv7.2 expression, with GRT-X and XBD173 treatments leading to significantly higher increases compared to the other groups (**Figure 6B**). However, only GRT-X and XBD173 treatments induced a significant increase in Kv7.3 mRNA levels.

Relating to genes involved in myelination, both GRT-X and XBD173 treatments promote increased total mRNA expression levels of myelin-related genes (Mpz, Mbp, and Plp), with GRT-X having a significantly greater effect (**Figure 6C**). On the other hand, XE991 and ICA27243 decreased mRNA expression levels of Mpz and Mbp genes but had no effect on Plp. For genes related to Schwann cell development and differentiation, GRT-X and XBD173 treatments significantly increased the relative expression of Dhh, Krox20, and CNPase genes, with XBD173 having a significantly greater impact on Dhh expression, and GRT-X on Krox20 and CNPase (**Figure 6D**). XE991 had no effect on Dhh gene expression but increased Krox20 expression and decreased CNPase expression. ICA-27243 had no effect on Dhh expression but led to a decrease in Krox20 and CNPase mRNA expression.

Regarding genes associated with neuronal development and differentiation, GRT-X and XBD173 increased total mRNA expression levels of genes Tfap2 $\alpha$ , Stmn2, Peripherin, and Cad19, with GRT-X having a significantly greater effect (except for Tfap2 $\alpha$ ) (**Figure 6E**). XE991 had no effect on gene expression, while ICA-27243 decreased mRNA expression levels of all the listed genes. Concerning the axonal Nfh gene, GRT-X and XBD173 increased Nfh mRNA levels, with GRT-X having a significantly greater effect (**Figure 6F**). XE991 and ICA-27243 reduced Nfh mRNA levels, and ethanol had no effect on the expression of any of the mentioned genes.

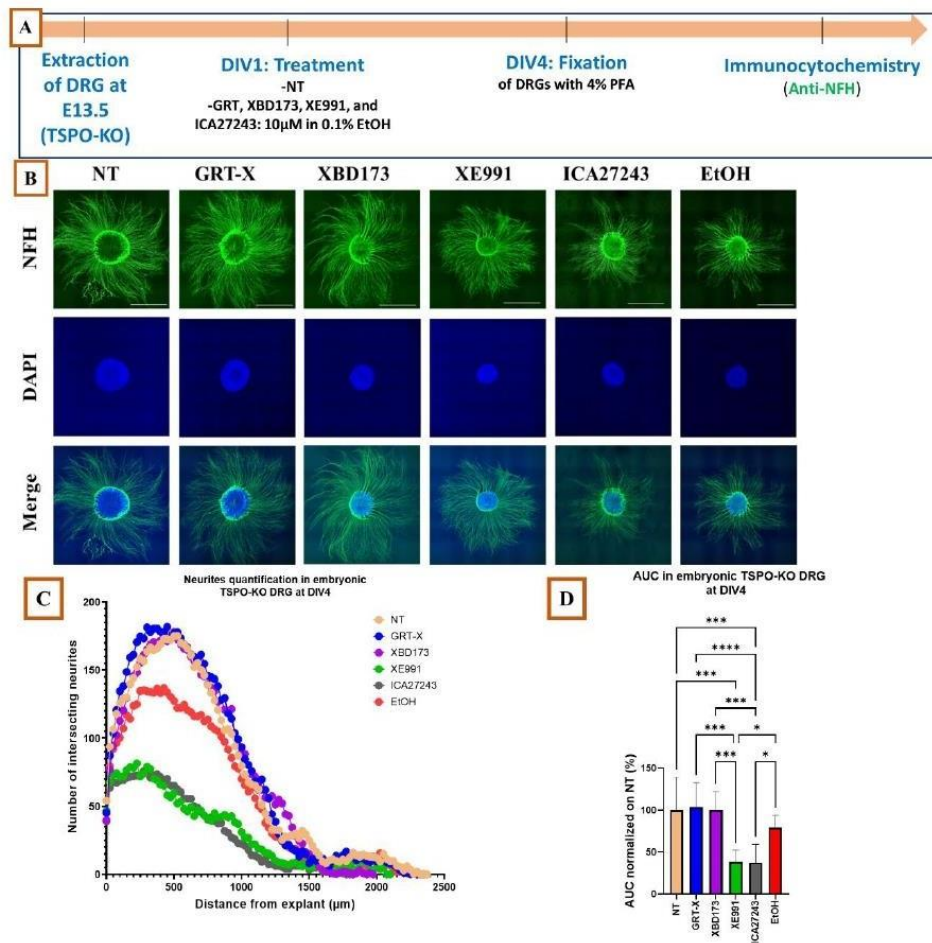


**Figure 6.** mRNA expression of GRT-X target genes (B) and genes involved in myelination (C), Schwann cells differentiation (D) and neuronal structure (E and F) in C57BL/6. (A): protocol used. (B-F): Relative quantification of mRNA levels of Tspo, Kv7.2, Kv7.3, Mpz, Mbp, Plp, Dhh, Krox20, CNPase, Tfp2a, Peripherin, Cad19, and Nfh from dissociated cultures of C57BL/6 embryonic DRGs at DIV4 following the different treatments. Data represent mean  $\pm$  S.D over 3 independently performed manipulations. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  (ANOVA analysis followed by Tukey's Multiple Comparison Test).

### 3.5 GRT-X has no effect on neurite growth in embryonic TSPO-KO<sup>-/-</sup> DRG explants at DIV4

To validate that the beneficial impact of GRT-X on axonal growth is indeed mediated by TSPO, we conducted experiments using embryonic DRG explants obtained from pregnant females with TSPO-KO<sup>-/-</sup> embryos at E13.5. As there are no pharmacological tools available to block TSPO expression, we replicated our experiments with these TSPO-KO<sup>-/-</sup> explants. These explants were treated at DIV1 and maintained in culture until DIV4, after which they were fixed with 4% PFA (Figure 7A). Subsequently, axons were immunolabeled using anti-NFH, and cell nuclei were stained with DAPI (Figure 7B). Each group consisted of 3 to 4 DRGs, and the experiment was repeated three times. Following microscopic observations, neurite quantification was conducted using Neurite-J, and the data were plotted in Prism (Figure 7C). Areas under the curve (AUC) were calculated using the trapezoidal method and then compared between the different groups (Figure 7D).

Our findings indicate that GRT-X and XBD-173 do not influence axonal growth, confirming that the impact of both ligands is mediated by TSPO. Consistent with expectations, the area under the curves (AUCs) for groups treated with XE991 and ICA27243 are significantly lower than those of all other groups. This substantiates the inhibitory effect of XE991 and ICA27243 on axonal growth in embryonic TSPO-KO DRGs at DIV4.



**Figure 7. GRT-X has no effect on axonal growth of TSPO-KO<sup>-/-</sup> embryonic DRG explants at DIV4.** (A) represents the experimental protocol, (B) represents confocal microscopy images of DRG explants at DIV4 following their treatment with the different molecules at DIV1. (C) represents the graph plotted over 3 independent experiments following Neurite-J quantification of neurites from 3 or 4 DRGs per treatment. (D) represents the calculation of the areas under the curve of the different groups after normalizing to the non-treated (NT) group. Data represent mean  $\pm$  S.D over 3 independent experiments. \* $p < 0.05$  \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  (ANOVA analysis followed by Tukey's Multiple Comparison Test).

### 3.6 GRT-X increases the expression of genes related to myelination, Schwann cell and neuron development, but not those involved in axonal structure in dissociated cultures of embryonic TSPO-KO<sup>-/-</sup> DRGs

To validate the confocal microscopy results, we established dissociated cultures of embryonic DRGs from pregnant TSPO-KO<sup>-/-</sup> females at E13.5. These cultures were treated at DIV1 and grouped as follows: NT, GRT-X 10 $\mu$ M, XBD173 10 $\mu$ M, XE991, ICA-27243 10 $\mu$ M, and EtOH 0.1%. Cultures were stopped at DIV4, and total RNA was extracted from the samples for RT-qPCR studies. mRNA levels of Kv7.2, Kv7.3, Mpz, Mbp, Plp, Dhh, Krox20, CNPase, Tfap2 $\alpha$ , Peripherin, Cad19, and Nfh were quantified relative to Gapdh mRNA levels (**Figure 8A**). Each group consisted of all DRGs present in the spinal cord, totaling 37 to 40 DRGs per group, and the experiment was repeated three times.

Regarding GRT-X target genes (except for *Tspo* in TSPO-KO<sup>-/-</sup> mice), our findings indicate that GRT-X, XBD173, and XE991 lead to an increase in Kv7.2 mRNA levels, with GRT-X having a significantly stronger effect (**Figure 8B**). Conversely, ICA-27243 results in a reduction in relative Kv7.2 expression. Moreover, GRT-X promotes an increase in Kv7.3 mRNA levels, while XE991 and ICA-27243 induce a significant decrease (**Figure 8B**).

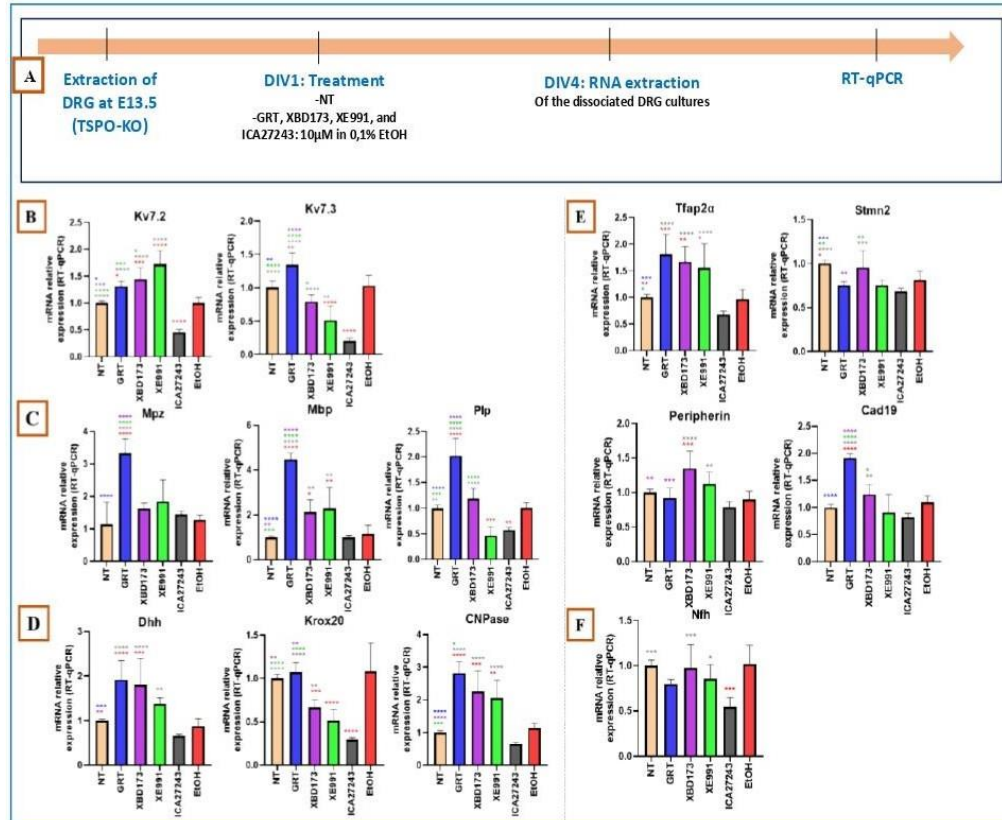
Concerning genes associated with myelination, GRT-X enhances the mRNA levels of all genes (Mpz, Mbp, and Plp). XBD173 and XE991 also increase Mbp expression, though the impact of GRT-X remains significantly stronger. Conversely, Plp expression is reduced by XE991 and ICA-27243 (**Figure 8C**).

For the genes related to Schwann cell development and differentiation, our findings reveal that GRT-X enhances the mRNA levels of the Dhh and CNPase genes but does not affect Krox20 expression. In contrast, XBD173 increases the expression of all three genes (Dhh, Krox20, and CNPase). Conversely, XE991 reduces the mRNA levels of Krox20 and CNPase. ICA-27243 decreases Krox20 expression but does not influence the other two genes (**Figure 8D**).

In terms of genes associated with neuronal development and differentiation, GRT-X increased Tfap2 $\alpha$  and Cad19 gene expression while decreasing *Stmn2* expression, with no impact on peripherin. On the other hand, XBD173 elevated Tfap2 $\alpha$  and peripherin mRNA levels but had no effect on *Stmn2* and Cad19 gene expression. XE991 led to an increase in Tfap2 $\alpha$  expression and a decrease in *Stmn2* expression. ICA-27243 caused a reduction in *Stmn2* mRNA levels (**Figure 8E**).

Regarding the axonal Nfh gene, ICA-27243 treatment resulted in reduced mRNA levels. Conversely, the other treatments had no effect, corroborating the confocal microscopy results

(Figure 8F). Notably, ethanol had no impact on the expression of the aforementioned genes.



**Figure 8.** mRNA expression of GRT-X target genes (B) and genes involved in myelination (C), Schwann cells differentiation (D) and neuronal structure (E and F) in TSPO<sup>-/-</sup>. (A): protocol used. (B-F): Relative quantification of mRNA levels of Kv7.2, Kv7.3, Mpz, Mbp, Plp, Dhh, Krox20, CNPase, Tfap2 $\alpha$ , Peripherin, Cad19, and NfH from dissociated cultures of TSPO-KO embryonic DRGs at DIV4 following the different treatments. Data represent the mean  $\pm$  S.D of 3 independently performed experiments. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.0001 (ANOVA analysis followed by Tukey's 'Multiple Comparison Test').

#### 4 Discussion

This study aimed to explore the influence of GRT-X on axonal growth and to clarify the specific involvement of its TSPO and Kv7.2/3 targets. The proof-of-concept investigation was carried out using both explant and dissociated cultures of embryonic DRG at E13.5, derived from C57BL6/J or Tspo<sup>-/-</sup> mice. Prepared from DRG embryos, these cultures allow to study the role of GRT-X and TSPO in early axonal and Schwann cell development [26]. Of note, the vast majority of the DRG neurons still express trkA at this early developmental stage and survive after supplementation with NGF as in our culture conditions [30].

Ganglionic and dissociated DRG cultures represent excellent models for investigating the molecular and cellular mechanisms underlying the role of GRT-X and TSPO in axonal elongation and Schwann cell plasticity under controlled conditions, with possible implications for axonal regeneration after injury or peripheral neuropathies [31] [32]. Indeed, both adult peripheral neurons and Schwann cells respond to injury by reprogramming their phenotypes to pro-regenerative conditions. Neurons switch to a cell-autonomous regenerative state, whereas both myelinating and Remak Schwann cells partially de-differentiate and transform into repair Schwann cells, with the ability to promote axonal growth and to remyelinate the regenerating axons [2]. However, although Schwann cells re-express developmental genes, one has to be aware of differences in molecular mechanisms between repair and immature Schwann cells [33] [34].

First, we initiated experiments, comparing GRT-X to TSPO (etifoxine and XBD173) and Kv7.2/3 (ICA-27243 and XE991) ligand effects on axonal growth. Treatments at DIV1 were assessed at DIV4. For all genes studied, there were no differences between non-treated (NT) and the ethanol treated groups. GRT-X significantly increased neurite length and density compared to the other treatments. Analysis of the areas under the neurite extension curves (AUC) showed a significant increase by GRT-X, but no effect of XBD173, XE991, ICA27243 and EtOH. Etifoxine inhibited axonal growth and proved to be neurotoxic, excluding it from further experiments. The inhibitory influences of etifoxine on axonal growth in our primary DRG cultures contrasted with its stimulatory effects on adult rat sciatic nerve regeneration after injury and on neurite extension by PC12 cells [24]. This discrepancy may be attributed to etifoxine's dual action as a positive allosteric modulator of TSPO and GABA<sub>A</sub> receptors, with the latter possibly mediating its negative influences on our embryonic DRG explants. Indeed, differences exist in GABA<sub>A</sub> receptor subunit composition between neurons cultured from embryonic and adult DRGs [35]. Moreover, GABA<sub>A</sub> receptors are excitatory during early development due to high intracellular chloride concentrations, while in adults, they mediate neuronal inhibition [36].

Then, the effects of GRT-X, XBD173, ICA-27243 and XE991 on axonal growth were tested over an extended period (DIV8). At DIV8, following a single treatment, the AUC of the GRT-X group was significantly higher than that of other treatment groups (non treated, ethanol, XBD173, ICA-27243 and XE991). Thus, GRT-X maintains a positive axonal growth effect up to DIV8 after a single treatment, while the other treatments show no impact. However, following two successive treatments at the same dose (10  $\mu$ M), administered three days apart at DIV1 and DIV4, XBD173 also stimulated axonal elongation and increased AUCs, with the

effects of GRT-X and XBD173 surpassing those of the other treatments. Thus, both the dual mode-of action GRT-X and the supposed selective TSPO activator XBD173 can promote axonal growth.

To determine whether TSPO activation by GRT-X plays a key role in its stimulatory effects on axonal growth, we compared its effects to those of XBD173, XE991, and ICA-27243 in ganglionic DRG cultures prepared from *Tspo*<sup>-/-</sup> embryos at E13.5. Again, cultures were treated at DIV 1 and axon length and density were quantified by confocal microscopy at DIV 4. Invalidation of TSPO resulted in the complete loss of the stimulatory effects of GRT-X on axon growth, demonstrating a key role of TSPO activation in its axonotrophic effects. This is to our knowledge the first demonstration of a role of TSPO in neurodevelopmental processes at such an early embryonic stage. The effects of TSPO ligands on neuronal differentiation have so far mainly been demonstrated in neuronal cell lines [37]. The not selective TSPO ligand 4'-chlorodiazepam, which is also active at GABA<sub>A</sub> receptors, has previously been shown to increase neurite formation by mouse hippocampal neurons at E17 [38]. TSPO expression in the nervous system has been demonstrated as early as E12 [39]. Of note, in the absence of TSPO and in contrast to wild-type mice, the Kv7.2/3 ligands ICA27243 and XE991 significantly inhibited axonal elongation. It has previously been shown that Kv7 channel activation inhibits neurite growth [40]. Thus, the double target action of GRT-X may compensate for the negative influence of Kv7 channel activation on axonal elongation.

GRT-X was more potent in stimulating axonal growth via TSPO than XBD173 at the dose of 10  $\mu$ M, with GRT-X already showing a significant effect 4 days after a single administration, whereas XBD173 only having an effect at DIV8 after two administrations. The different potencies of both compounds cannot be explained by their apparent affinities for TSPO, as they both show estimated  $K_i$  values in the nanomolar range [19] [41]. That is, the efficacy of TSPO ligands are difficult to predict from their affinities and pharmacokinetics, possibly because TSPO is part of a mitochondrial multi-protein complex [42,43]. Moreover, TSPO binding sites for different ligands remain to be characterized, as are the 3D structures of TSPO complexed with different ligands [44].

To strengthen our findings, we conducted RT-qPCR analysis to assess the impact of the different treatments on the expression of selected genes in dissociated cultures of embryonic DRGs from timed E13.5 pregnant C57BL/6 females. GRT-X at 10 $\mu$ M was compared to the other ligands (XBD173, ICA-27243, and XE991, all at the dose of 10  $\mu$ M) (results are summarized in **Table 2**). Treatments were administered at DIV1 and assessed at DIV4. In cultures prepared from wild-type mice, our RT-qPCR results reveal that GRT-X induces a

significant increase in the expression of all genes (Tspo, Kv7.2, Kv7.3, Mpz, Mbp, Plp, Dhh, Krox20, CNPase, Tfp2 $\alpha$ , Stmn2, Peripherin, Cad19, and Nfh) when compared to the non-treated (NT) group. For all genes studied, no differences were found between the NT and the ethanol treated groups.

These findings are consistent with our confocal microscopy results, demonstrating that GRT-X increases the length and density of Nfh labeled axons. In addition, the increase in the expression of myelin-related genes shows that GRT-X also promotes the developmental maturation of Schwann cells. GRT-X therefore modulates both neuron and Schwann cell dependent mechanisms necessary peripheral nerve development. Importantly, all studied neuronal and Schwann cell genes play important roles in both peripheral nerve development and adult nerve regeneration [45] [46] [47] [48] [49] [50,51] [52]. Thus, our findings are likely to be relevant for both developmental and regenerative processes. GRT-X has indeed been shown to promote the survival and regeneration of sensory and motor neurons and to accelerate the recovery of sensory functions after severe crush lesion of cervical spinal nerves in adult rats [19].

Notably, treatment with XBD173 at the same concentration as GRT-X (10 $\mu$ M) also increased the expression of all genes, contrasting with its lack of effect on axonal elongation in the ganglionic DRG cultures after a single administration at DIV4. In contrast, the Kv7.2/3 ligands ICA-27243 and XE991 inhibited the expression of most of the genes, suggesting that their activation does not contribute to the greater efficacy of GRT-X when compared to XBD173.

Whereas GRT-X lost its axonal growth enhancing actions in DRG explant cultures prepared from Tspo<sup>-/-</sup> embryos, its stimulatory effects on the expression of most genes were preserved in the absence of TSPO, except for the neuronal genes peripherin and Nfh, both involved in axonal outgrowth and the latter also in radial expansion, and for Krox20 involved in Schwann cell maturation. How to explain the significant upregulation of 10 genes by GRT-X in the absence of Tspo gene expression, confirmed by RT-qPCR. An explanation could be the dual action of GRT-X on both TSPO and Kv7.2/3. This is however unlikely as the Kv7.2/3 activator ICA-27243 had either no effect or even decreased gene expression, consistent with its inhibitory effect on axonal outgrowth in TSPO<sup>-/-</sup> mice. A more likely explanation would be the potential presence of a third or other multiple targets of GRT-X, warranting further molecular investigations for confirmation. Surprisingly, even the supposedly selective TSPO activator XBD173 increased expression of the key neuronal and Schwann cell genes Kv7.2, Mpz, Dhh, Krox20, CNPase, Tfp2 $\alpha$  and peripherin in the Tspo<sup>-/-</sup> DRG. This strongly suggests that

XBD173 may activate these genes by acting through other targets than TSPO. From these observations, it follows that pharmacological tools may not always be sufficient to delineate the role of a target, but that its genetic invalidation provides additional important information. Consistent with the inhibitory effects of ICA-27243 and XE991 on axonal elongation, both compounds decreased or had no effect on the expression of most genes, except for an increase in *Kv7.2*, *Mpz* and *Tfap2 $\alpha$*  by XE991, which may oppose the inhibitory effects of intrinsic *Kv7.2/3* activity. That the *Kv7.2/3* activator ICA-27243 and inhibitor XE991 show in some cases similar effects on gene expression could result from the disturbance of developing neuronal circuits [40].

Our data demonstrate that the potent stimulatory effects of GRT-X on axonal growth require activation of its TSPO target. Interestingly, whereas neuron hyperpolarization by *Kv7.2/3* activation has been reported to inhibit neurite growth, consistent with the here observed downregulation of neuronal and Schwann cell genes, dual activation of the potassium channels and TSPO by GRT-X results in strong axonotrophic effects. TSPO activation by GRT-X may thus compensate for *Kv7.2/3* mediated inhibition. Indeed, the *Kv7.2/3* ligands ICA-27243 and XE991 significantly inhibited axonal growth in *TSPO<sup>-/-</sup>* mice. GRT-X thus has an interesting therapeutic potential by combining neuropathy pain relief via *Kv7.2/3* channels with neuroregenerative benefits via TSPO. The intriguing observation that both the GRT-X and XBD173 activate the expression of neuron and Schwann cell genes in *TSPO<sup>-/-</sup>* mice strongly suggests the existence of additional targets of both compounds, and points to the necessity to genetically invalidate targets for ensuring ligand selectivity.

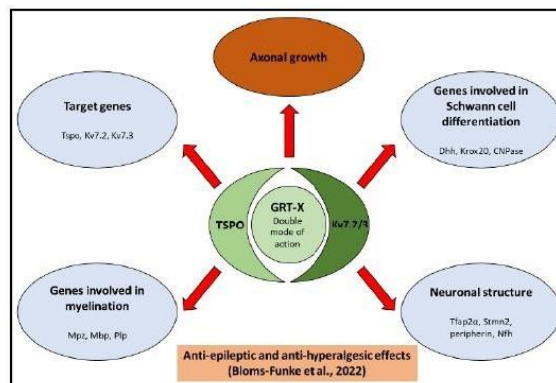
**Table 2.** Comparison of treatment effects on gene expression in DIV4 dissociated DRG cultures from E13.5 pregnant C57BL/6 and TSPO-KO<sup>-/-</sup> mice.

	Embryonic C57BL/6 DRGs					Embryonic TSPO-KO <sup>-/-</sup> DRGs				
	GRT-X	XBD173	XE991	ICA-27243	EtOH	GRT-X	XBD173	XE991	ICA-27243	EtOH
Tspo	↑	↑	↑	↑	-	N/A	N/A	N/A	N/A	-
Kv7.2	↑	↑	↑	↑	-	↑	↑	↑	↓	-
Kv7.3	↑	↑	-	-	-	↑	-	↓	↓	-
Mpz	↑	↑	↓	↓	-	↑	↑	↑	-	-
Mbp	↑	↑	↓	↓	-	↑	-	-	-	-
Plp	↑	↑	-	-	-	↑	-	↓	↓	-
Dhh	↑	↑	-	-	-	↑	↑	-	-	-
Krox20	↑	↑	↑	↓	-	-	↑	↓	↓	-
CNPase	↑	↑	↓	↓	-	↑	↑	↓	-	-
Tfap2a	↑	↑	-	↓	-	↑	↑	↑	-	-
Stmn2	↑	↑	-	↓	-	↑	-	↓	↓	-
Peripherin	↑	↑	-	↓	-	-	↑	-	-	-
Cad19	↑	↑	-	↓	-	↑	-	-	-	-
Nfh	↑	↑	↓	↓	-	-	-	-	↓	-

↑ : increased gene expression; ↓ : decreased gene expression; - : no effect on gene expression; N/A : not applicable for TSPO-KO<sup>-/-</sup> DRGs because the gene is not expressed

In conclusion, GRT-X exerts its effects through dual targeting of TSPO and Kv7.2/3, resulting in the stimulation of axonal growth and upregulation of various gene expression related to myelination, Schwann cell differentiation, and neuronal structure (**Scheme I summarizes our findings**). The simultaneous activation of TSPO and Kv7.2/3 by GRT-X suggests its potential as a therapeutic candidate for nerve lesions and neuropathic pain. Future studies should explore combined treatments and *in vivo* nerve lesions to further validate these effects on axonal growth.

**Scheme I.** Representation of the GRT-X effects according to our results



The anti-epileptic, anti-hyperalgesic effects of GRT-X described by Bloms-Funke *et al.* are probably mediated by the stimulation of axonal growth and modulation of genes involved in myelination, Schwann cell differentiation and neuronal structure.

## 5 Supplementary Materials

Supplementary Material 1: Media compositions and Coverslips' coating; Supplementary Material 2: Primer sequences; Supplementary Figure 1: MTT test; Supplementary Figure 2: GRT-X promotes axonal growth in C57BL6/J embryonic DRG explants at DIV4

## 6 Author Contributions

L.-El-C: Conceptualization, designed and performed the experiments and wrote the manuscript L.M-M and M.S; PIs who supervised and designed the formal analysis and writing—review and All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

## 7 Funding

This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (Grant FOR 2858).

## 8 Institutional Review Board Statement

Not applicable.

## 9 Informed Consent Statement

Not applicable.

## 10 Data Availability Statement

The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

## 11 Acknowledgments

We are thankful to Doctor Venkat Krinshnan Sundaram for helping us in establishing the explant and the dissociated DRG culture systems.

## 12 Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest

## 13 References

1. Sulaiman, O.A. Development of strategies to overcome limitations to functional recovery after peripheral nerve injuries. **2001**.
2. Jessen, K.; Mirsky, R. The repair Schwann cell and its function in regenerating nerves. *The Journal of physiology* **2016**, *594*, 3521-3531.
3. Ronchi, G.; Raimondo, S. Chronically denervated distal nerve stump inhibits peripheral nerve regeneration. *Neural Regen Res* **2017**, *12*, 739-740, doi:10.4103/1673-5374.206638.
4. Allodi, I.; Udina, E.; Navarro, X. Specificity of peripheral nerve regeneration: interactions at the axon level. *Prog Neurobiol* **2012**, *98*, 16-37, doi:10.1016/j.pneurobio.2012.05.005.
5. Zhao, Q.; Jiang, C.; Zhao, L.; Dai, X.; Yi, S. Unleashing Axonal Regeneration Capacities: Neuronal and Non-neuronal Changes After Injuries to Dorsal Root Ganglion

- Neuron Central and Peripheral Axonal Branches. *Mol Neurobiol* **2023**, doi:10.1007/s12035-023-03590-7.
6. Scheib, J.; Höke, A. Advances in peripheral nerve regeneration. *Nat Rev Neurol* **2013**, *9*, 668-676, doi:10.1038/nrneurol.2013.227.
  7. Dworkin, R.H.; O'Connor, A.B.; Backonja, M.; Farrar, J.T.; Finnerup, N.B.; Jensen, T.S.; Kalso, E.A.; Loeser, J.D.; Miaskowski, C.; Nurmikko, T.J.; et al. Pharmacologic management of neuropathic pain: Evidence-based recommendations. *PAIN* **2007**, *132*, 237-251, doi:10.1016/j.pain.2007.08.033.
  8. Benyamin, R.; Trescot, A.M.; Datta, S.; Buenaventura, R.; Adlaka, R.; Sehgal, N.; Glaser, S.E.; Vallejo, R. Opioid complications and side effects. *Pain Physician* **2008**, *11*, S105-120.
  9. Abd-Elseyed, A.; Jackson, M.; Gu, S.L.; Fiala, K.; Gu, J. Neuropathic pain and Kv7 voltage-gated potassium channels: The potential role of Kv7 activators in the treatment of neuropathic pain. *Mol Pain* **2019**, *15*, 1744806919864256, doi:10.1177/1744806919864256.
  10. Maljevic, S.; Wuttke, T.V.; Lerche, H. Nervous system KV7 disorders: breakdown of a subthreshold brake. *The Journal of physiology* **2008**, *586*, 1791-1801.
  11. Ishikawa, K.; Tanaka, M.; Black, J.A.; Waxman, S.G. Changes in expression of voltage-gated potassium channels in dorsal root ganglion neurons following axotomy. *Muscle Nerve* **1999**, *22*, 502-507, doi:10.1002/(sici)1097-4598(199904)22:4<502::aid-mus12>3.0.co;2-k.
  12. Yang, E.K.; Takimoto, K.; Hayashi, Y.; de Groat, W.C.; Yoshimura, N. Altered expression of potassium channel subunit mRNA and alpha-dendrotoxin sensitivity of potassium currents in rat dorsal root ganglion neurons after axotomy. *Neuroscience* **2004**, *123*, 867-874, doi:10.1016/j.neuroscience.2003.11.014.
  13. Barrese, V.; Stott, J.B.; Greenwood, I.A. KCNQ-Encoded Potassium Channels as Therapeutic Targets. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **2018**, *58*, 625-648, doi:10.1146/annurev-pharmtox-010617-052912.
  14. Wickenden, A.D.; McNaughton-Smith, G. Kv7 channels as targets for the treatment of pain. *Curr Pharm Des* **2009**, *15*, 1773-1798.
  15. Barrese, V.; Tagliatalata, M.; Greenwood, I.A.; Davidson, C. Protective Role of Kv7 Channels in Oxygen and Glucose Deprivation-Induced Damage in Rat Caudate Brain Slices. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* **2015**, *35*, 1593-1600, doi:10.1038/jcbfm.2015.83.
  16. Borgini, M.; Mondal, P.; Liu, R.; Wipf, P. Chemical modulation of Kv7 potassium channels. *RSC Med Chem* **2021**, *12*, 483-537, doi:10.1039/d0md00328j.
  17. Blom, S.M.; Schmitt, N.; Jensen, H.S. Differential effects of ICA-27243 on cloned K(V)7 channels. *Pharmacology* **2010**, *86*, 174-181, doi:10.1159/000317525.
  18. Kühnert, S.; Bahrenberg, G.; Kless, A.; Schröder, W. Substituted 2-oxo-and 2-thioxo-dihydroquinoline-3-carboxamides as KCNQ2/3 modulators. **2014**.
  19. Bloms-Funke, P.; Schumacher, M.; Liu, S.; Su, D.; Li, J.; Liere, P.; Rupprecht, R.; Nothdurfter, C.; Bahrenberg, G.; Christoph, T.; et al. A novel dual mode-of-action anti-hyperalgesic compound in rats which is neuroprotective and promotes neuroregeneration. *Eur J Pharmacol* **2022**, *923*, 174935, doi:10.1016/j.ejphar.2022.174935.
  20. Bloms-Funke, P.; Bankstahl, M.; Bankstahl, J.; Kneip, C.; Schröder, W.; Löscher, W. The novel dual-mechanism Kv7 potassium channel/TSPO receptor activator GRT-X is more effective than the Kv7 channel opener retigabine in the 6-Hz refractory seizure mouse model. *Neuropharmacology* **2022**, *203*, 108884, doi:10.1016/j.neuropharm.2021.108884.

21. El Chemali, L.; Akwa, Y.; Massaad-Massade, L. The mitochondrial translocator protein (TSPO): a key multifunctional molecule in the nervous system. *Biochemical Journal* **2022**, *479*, 1455-1466, doi:10.1042/bcj20220050.
22. Ma, B.; Liu, X.; Huang, X.; Ji, Y.; Jin, T.; Ma, K. Translocator protein agonist Ro5-4864 alleviates neuropathic pain and promotes remyelination in the sciatic nerve. *Mol Pain* **2018**, *14*, 1744806917748019, doi:10.1177/1744806917748019.
23. Leaver, K.R.; Reynolds, A.; Bodard, S.; Guilloteau, D.; Chalon, S.; Kassiou, M. Effects of translocator protein (18 kDa) ligands on microglial activation and neuronal death in the quinolinic-acid-injected rat striatum. *ACS Chem Neurosci* **2012**, *3*, 114-119, doi:10.1021/cn200099e.
24. Girard, C.; Liu, S.; Cadepond, F.; Adams, D.; Lacroix, C.; Verleye, M.; Gillardin, J.M.; Baulieu, E.E.; Schumacher, M.; Schweizer-Groyer, G. Etifoxine improves peripheral nerve regeneration and functional recovery. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2008**, *105*, 20505-20510, doi:10.1073/pnas.0811201106.
25. Banati, R.B.; Middleton, R.J.; Chan, R.; Hatty, C.R.; Kam, W.W.; Quin, C.; Graeber, M.B.; Parmar, A.; Zahra, D.; Callaghan, P.; et al. Positron emission tomography and functional characterization of a complete PBR/TSPO knockout. *Nat Commun* **2014**, *5*, 5452, doi:10.1038/ncomms6452.
26. Sundaram, V.K.; El Jalkh, T.; Barakat, R.; Fernandez, C.J.I.; Massaad, C.; Grenier, J. Retracing Schwann Cell Developmental Transitions in Embryonic Dissociated DRG/Schwann Cell Cocultures in Mice. *Front Cell Neurosci* **2021**, *15*, 590537, doi:10.3389/fncel.2021.590537.
27. Kim, J.; Kim, H.A. Isolation and Expansion of Schwann Cells from Transgenic Mouse Models. *Methods Mol Biol* **2018**, *1739*, 39-48, doi:10.1007/978-1-4939-7649-2\_3.
28. Taveggia, C.; Bolino, A. DRG Neuron/Schwann Cells Myelinating Cocultures. *Methods Mol Biol* **2018**, *1791*, 115-129, doi:10.1007/978-1-4939-7862-5\_9.
29. Torres-Espín, A.; Santos, D.; González-Pérez, F.; del Valle, J.; Navarro, X. Neurite-J: an image-J plug-in for axonal growth analysis in organotypic cultures. *J Neurosci Methods* **2014**, *236*, 26-39, doi:10.1016/j.jneumeth.2014.08.005.
30. Emsberger, U. The role of GDNF family ligand signalling in the differentiation of sympathetic and dorsal root ganglion neurons. *Cell Tissue Res* **2008**, *333*, 353-371, doi:10.1007/s00441-008-0634-4.
31. Melli, G.; Höke, A. Dorsal Root Ganglia Sensory Neuronal Cultures: a tool for drug discovery for peripheral neuropathies. *Expert Opin Drug Discov* **2009**, *4*, 1035-1045, doi:10.1517/17460440903266829.
32. Monje, P.V. Schwann Cell Cultures: Biology, Technology and Therapeutics. *Cells* **2020**, *9*, doi:10.3390/cells9081848.
33. Balakrishnan, A.; Belfiore, L.; Chu, T.H.; Fleming, T.; Midha, R.; Biernaskie, J.; Schuurmans, C. Insights Into the Role and Potential of Schwann Cells for Peripheral Nerve Repair From Studies of Development and Injury. *Front Mol Neurosci* **2020**, *13*, 608442, doi:10.3389/fnmol.2020.608442.
34. Jessen, K.R.; Mirsky, R. The Role of c-Jun and Autocrine Signaling Loops in the Control of Repair Schwann Cells and Regeneration. *Front Cell Neurosci* **2021**, *15*, 820216, doi:10.3389/fncel.2021.820216.
35. Maddox, F.N.; Valeyev, A.Y.; Poth, K.; Holohean, A.M.; Wood, P.M.; Davidoff, R.A.; Hackman, J.C.; Luetje, C.W. GABAA receptor subunit mRNA expression in cultured embryonic and adult human dorsal root ganglion neurons. *Brain Res Dev Brain Res* **2004**, *149*, 143-151, doi:10.1016/j.devbrainres.2004.01.001.
36. Ben-Ari, Y. Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture. *Nature Reviews Neuroscience* **2002**, *3*, 728-739.

37. Cheung, G.; Lin, Y.C.; Papadopoulos, V. Translocator protein in the rise and fall of central nervous system neurons. *Front Cell Neurosci* **2023**, *17*, 1210205, doi:10.3389/fncel.2023.1210205.
38. Arbo, B.D.; Vieira-Marques, C.; Ruiz-Palmero, I.; Ortiz-Rodriguez, A.; Arevalo, M.A.; Garcia-Segura, L.M.; Ribeiro, M.F. 4'-Chlorodiazepam modulates the development of primary hippocampal neurons in a sex-dependent manner. *Neurosci Lett* **2017**, *639*, 98-102, doi:10.1016/j.neulet.2016.12.067.
39. Bürgi, B.; Lichtensteiger, W.; Lauber, M.E.; Schlumpf, M. Ontogeny of diazepam binding inhibitor/acyl-CoA binding protein mRNA and peripheral benzodiazepine receptor mRNA expression in the rat. *J Neuroendocrinol* **1999**, *11*, 85-100, doi:10.1046/j.1365-2826.1999.00292.x.
40. Zhou, N.; Huang, S.; Li, L.; Huang, D.; Yan, Y.; Du, X.; Zhang, H. Suppression of KV7/KCNQ potassium channel enhances neuronal differentiation of PC12 cells. *Neuroscience* **2016**, *333*, 356-367, doi:10.1016/j.neuroscience.2016.07.024.
41. Owen, D.R.; Phillips, A.; O'Connor, D.; Grey, G.; Aimola, L.; Nicholas, R.; Matthews, P.M. Human pharmacokinetics of XBD173 and etifoxine distinguish their potential for pharmacodynamic effects mediated by translocator protein. *Br J Clin Pharmacol* **2022**, *88*, 4230-4236, doi:10.1111/bcp.15392.
42. Rone, M.B.; Midzak, A.S.; Issop, L.; Rammouz, G.; Jagannathan, S.; Fan, J.; Ye, X.; Blonder, J.; Veenstra, T.; Papadopoulos, V. Identification of a dynamic mitochondrial protein complex driving cholesterol import, trafficking, and metabolism to steroid hormones. *Mol Endocrinol* **2012**, *26*, 1868-1882, doi:10.1210/me.2012-1159.
43. Midzak, A.; Zirkin, B.; Papadopoulos, V. Translocator protein: pharmacology and steroidogenesis. *Biochem Soc Trans* **2015**, *43*, 572-578, doi:10.1042/bst20150061.
44. Jaremko, M.; Jaremko, L.; Jaipuria, G.; Becker, S.; Zweckstetter, M. Structure of the mammalian TSPO/PBR protein. *Biochem Soc Trans* **2015**, *43*, 566-571, doi:10.1042/bst20150029.
45. George, D.; Ahrens, P.; Lambert, S. Satellite glial cells represent a population of developmentally arrested Schwann cells. *Glia* **2018**, *66*, 1496-1506, doi:10.1002/glia.23320.
46. Zhang, F.; Gu, X.; Yi, S.; Xu, H. Dysregulated Transcription Factor TFAP2A After Peripheral Nerve Injury Modulated Schwann Cell Phenotype. *Neurochem Res* **2019**, *44*, 2776-2785, doi:10.1007/s11064-019-02898-y.
47. Zhang, Y.; Zhao, Q.; Chen, Q.; Xu, L.; Yi, S. Transcriptional Control of Peripheral Nerve Regeneration. *Mol Neurobiol* **2023**, *60*, 329-341, doi:10.1007/s12035-022-03090-0.
48. Bajestan, S.N.; Umehara, F.; Shirahama, Y.; Itoh, K.; Sharghi-Namini, S.; Jessen, K.R.; Mirsky, R.; Osame, M. Desert hedgehog-patched 2 expression in peripheral nerves during Wallerian degeneration and regeneration. *J Neurobiol* **2006**, *66*, 243-255, doi:10.1002/neu.20216.
49. Verrier, J.D.; Kochanek, P.M.; Jackson, E.K. Schwann Cells Metabolize Extracellular 2',3'-cAMP to 2'-AMP. *J Pharmacol Exp Ther* **2015**, *354*, 175-183, doi:10.1124/jpet.115.225219.
50. Thornburg-Suresh, E.J.C.; Richardson, J.E.; Summers, D.W. The Stathmin-2 membrane-targeting domain is required for axon protection and regulated degradation by DLK signaling. *J Biol Chem* **2023**, *299*, 104861, doi:10.1016/j.jbc.2023.104861.
51. Keddie, S.; Smyth, D.; Keh, R.Y.S.; Chou, M.K.L.; Grant, D.; Surana, S.; Heslegrave, A.; Zetterberg, H.; Wieske, L.; Michael, M.; et al. Peripherin is a biomarker of axonal damage in peripheral nervous system disease. *Brain* **2023**, *146*, 4562-4573, doi:10.1093/brain/awad234.

52. Julien, J.P. Neurofilament functions in health and disease. *Curr Opin Neurobiol* **1999**, *9*, 554-560, doi:10.1016/s0959-4388(99)00004-5.

## Supplementary Material

### Supplementary Material 1: Media compositions and Coverslips' coating

#### A- Coverslips' coating:

Circular plastic coverslips (**LFG distribution 174950**) were incubated with poly-L-lysine (**Sigma P7890**) at a final concentration of 0.05mg/mL in 0.15M Sodium Borate Buffer for 30 mins. After 3 washes (5 minutes each) with PBS 1X, the coverslips were incubated 30 minutes with collagen (**R&D systems 3440-100-01**) diluted (1:7) in acetic water, in the presence of 35% Ammonia. After collagen removal, the resulting thin layer allowed DRG adherence to the coverslips.

#### B-Media compositions:

##### ❖ DRG Plating Media

<b>Component</b>	<b>Final Concentration</b>	<b>Reference</b>
DMEM high glucose	Base medium	11960044 Gibco
Glutamax (100X)	1X	35050061 Gibco
Heat inactivated Horse Serum	10%	26050088 Gibco
2.5S NGF	50ng/ml	1156NG R&D
Antibiotic/ Antimycotic (100X)	1X	15240062 Gibco

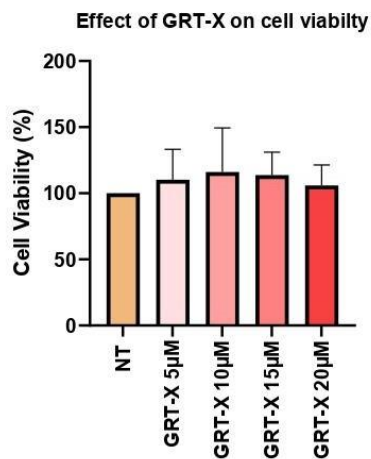
##### ❖ Neurobasal Media

<b>Component</b>	<b>Final Concentration</b>	<b>Reference</b>
Neurobasal Medium	Base medium	21103049 Gibco
Glutamax (100X)	1X	35050061 Gibco
2.5S NGF	50ng/ml	1156 NG R&D
B27 supplement (50X)	1X	17504044 Gibco
Antibiotic/ Antimycotic (100X)	1X	15240062 Gibco

**Supplementary Material 2: Primer sequences**

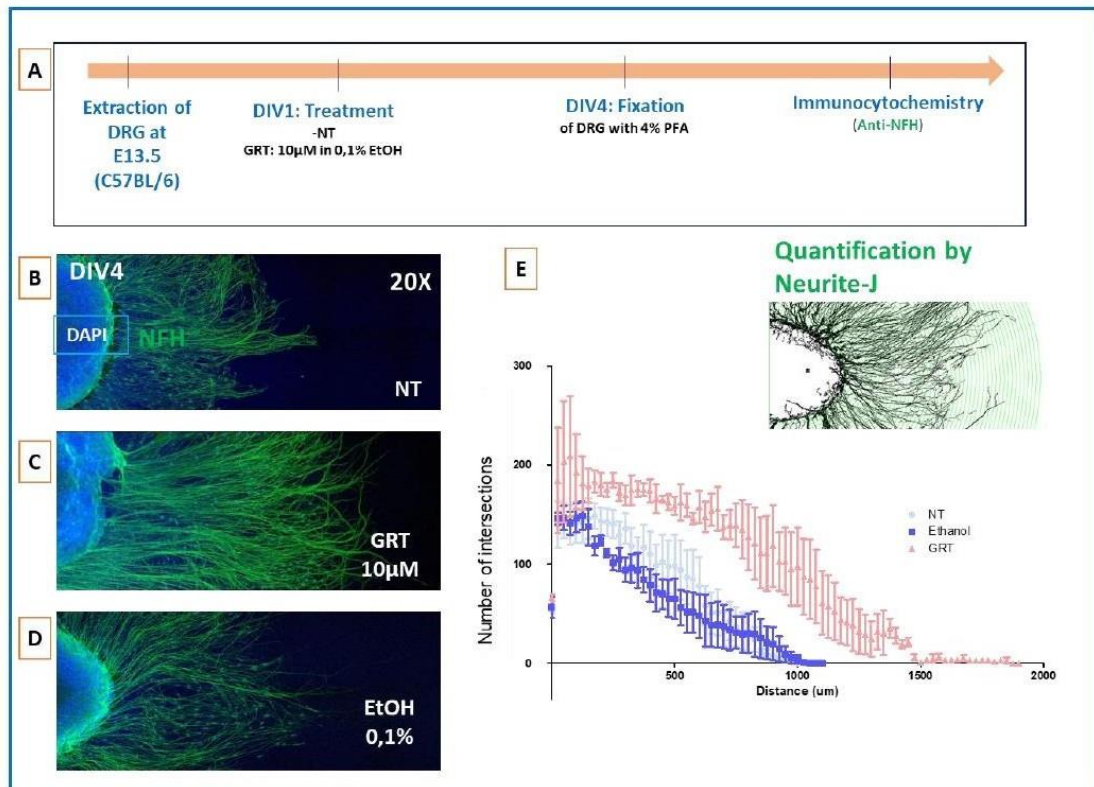
<b>Primer name</b>	<b>Sequence</b>
<b>Tspo Forward</b>	GCCTCCGGTGGTATGCTAG
<b>Tspo Reverse</b>	GCGTCCTCTGTGAAACCTC
<b>Kv7.2 Forward</b>	CGTGA CTATCGTGGTATTCG
<b>Kv7.2 Reverse</b>	GCTTCCTGGCAA ACTTGAG
<b>Kv7.3 Forward</b>	CCCAGTCAAGAGGAACAACG
<b>Kv7.3 Reverse</b>	ACGGCCAGAATCAAGCATC
<b>Mpz Forward</b>	ATCTCTTTTACCTGGCGCTACC
<b>Mpz Reverse</b>	ACTGGATGCGCTCTTIGAAG
<b>Mbp Forward</b>	ACTCACACACGAGAACTACCC
<b>Mbp Reverse</b>	GGTGTTCGAGGTGTCACAATG
<b>Dhh Forward</b>	ATCCACGTATCGGTCAAAGC
<b>Dhh Reverse</b>	AGTCACCACGATGTAGTTCCC
<b>Plp Forward</b>	AGCAAAGTCAGCCGAAAAC
<b>Plp Reverse</b>	CCAGGGAAGCAAAGGGGG
<b>Krox20 Forward</b>	TGCACCTAGAAACCAGACCTTC
<b>Krox20 Reverse</b>	TGCCCCCACTCACAATATTG
<b>CNPase Forward</b>	ACTCCTTACCTCACGCCATC
<b>CNPase Reverse</b>	AGCATTGCTGTTG GACTTGG
<b>Cad19 Forward</b>	TGACATAGGGGAGAATGCAGAG
<b>Cad19 Reverse</b>	AAGCTCTTCATCCACATGGC
<b>Tfap2<math>\alpha</math> Forward</b>	ACTCCTTACCTCACGCCATC
<b>Tfap2<math>\alpha</math> Reverse</b>	AGCATTGCTGTTG GACTTGG
<b>Stmn2 Forward</b>	AGGACGAGGGTAAAGAAGAG
<b>Stmn2 Reverse</b>	TTGCCACACAGAGAGAAAG
<b>Peripherin Forward</b>	GGTGCTCTTCCGTAAGGAC
<b>Peripherin Reverse</b>	GCACCTGCTGGCTCTCTAC
<b>Nfh Forward</b>	AAGCACCCACAGACATCAG
<b>Nfh Reverse</b>	CCTTGGGAGCTTCGTCTTTC
<b>GAPDH Forward</b>	ATCCCATCACCATCTTCCAG
<b>GAPDH Reverse</b>	CCATCACGCCACAGTTTCC

**Supplementary Figure 1: GRT-X has no effect on PC12 cell viability**



In order to assess the effect of GRT-X on cell viability, 2700 PC12 cells were plated per well in a 96 well plate. Different concentrations of GRT-X (5µM, 10 µM, 15µM, and 20 µM), as well as their corresponding ethanol concentrations (0.05%, 0.1%, 0.15%, and 0.2%) were added to the culture medium. After 72h, the cells were incubated with MTT solution which was then replaced by DMSO. The absorbance was read at 590 nm and the cell viability was then calculated. Our results show that the different concentrations of GRT-X have no effect on PC12 cell viability. Data represents mean  $\pm$  S.D. of four experiments when compared by ANOVA followed by Tukey's multiple comparison.

**Supplementary Figure 2: GRT-X promotes axonal growth in C57BL/6/J embryonic DRG explants at DIV4**



In order to assess whether GRT-X has an effect on neurite growth or not, E13.5 embryonic DRG explants were extracted from C57BL/6/J mice, treated (GRT-X 10 µM or 0.1% EtOH) and kept in culture till DIV4. After fixing the explants with 4% PFA and immunostaining them with anti-NFH, they were mounted on slides and then observed by confocal microscopy. The images showed the east side of three DRG. **(A)** : protocol used, **(B)** non treated DRG, **(C)** DRG treated with 10 µM of GRT-X and **(D)** DRG treated with 0.1% of ethanol, which is the vehicle. The represented images are shown at 20X. **(E)** After Neurite-J quantification an increase in neurite length and density was observed in GRT-X-treated DRG compared with the other groups.

## Discussion

Le but de cette étude est **d'étudier le rôle du GRT-X dans la poussée axonale**. Cette preuve de concept a été effectuée sur des cultures d'explants et des cultures dissociées de ganglions spinaux (ou Dorsal Root Ganglia, DRG) embryonnaires à E13.5 provenant soit de souris C57BL6/J, soit de souris TSPO-KO. En effet, les cultures primaires de DRG constituent un système idéal pour l'étude de voies moléculaires et cellulaires de nouveaux traitements qui stimulent la neuroprotection et la régénération axonale (Melli and Höke 2009).

Dans un premier temps, nous avons mis au point les paramètres indispensables à la poursuite de l'étude : viabilité cellulaire, culture de DRG embryonnaire et immunomarquage en utilisant l'anticorps NFH.

Pour tester la capacité du GRT-X à maintenir la viabilité cellulaire sur la lignée cellulaire de phéochromocytomes de rats (PC12), un test MTT a été effectué. Les cellules PC12 ont été choisies comme modèle pour cette étude car elles sont largement utilisées *in vitro* pour étudier l'apoptose et la différenciation neuronale (Liu, Xu et al. 2010). En présence des concentrations croissantes de GRT-X (5 $\mu$ M, 10 $\mu$ M, 15 $\mu$ M, 20 $\mu$ M), le test MTT ne montre aucun effet sur la viabilité cellulaire. Sachant que la concentration de GRT-X n'est toujours pas connue et testée *in vitro*, nous avons choisi la concentration de 10  $\mu$ M pour poursuivre nos expériences. Cette concentration de 10  $\mu$ M a été établie en fonction des concentrations des autres molécules : XBD173, XE991 et ICA-27243. Ces différents composés ont déjà été testés *in vitro* et publiés (Wickenden, Krajewski et al. 2008, Padilla, Wickenden et al. 2009, Bader, Wolf et al. 2019).

Après avoir développé la culture cellulaire des DRG embryonnaires, nous avons mis au point la méthode d'immunomarquage pour **évaluer l'efficacité de l'anti-NFH comme marqueur axonal**. Cet anticorps est utilisé comme marqueur des neurofilaments lourds, surtout dans les études de lésion axonale et de dégénération (Petzold 2005). Des explants de DRG ont été extraits d'embryons provenant d'une femelle C57BL/6 gestante à E13.5 et ont été cultivés jusqu'à DIV4. Les DRG ont ensuite été immunomarqués à l'anti-NFH, ayant pour fluorophore le composé Alexa Fluor 488. Nos observations par microscopie confocale montrent que les neurofilaments des axones du DRG sont bien reconnus par l'anti-NFH. Ainsi, l'anti-NFH a été utilisé dans toutes les manipulations qui suivent.

Ensuite, nous avons effectué une expérience préliminaire pour étudier le **rôle du GRT-X dans la poussée axonale d'explants de DRG embryonnaires C57BL/6 à E13.5**. Pour cela, le groupe de DRG traités au GRT-X 10 $\mu$ M a été comparé à un groupe non traité et à un autre traité au véhicule, l'EtOH. Tous les groupes ont été traités à DIV1 et arrêtés à DIV4. Les neurofilaments des DRG ont été marqués à l'anti-NFH et puis visualisés par microscopie confocale. Les neurites ont ensuite été quantifiés par NeuriteJ. Nos résultats montrent que les neurites des DRG traités au GRT-X sont plus longs (environ 2000  $\mu$ m) et que le réseau axonal est plus dense que ceux non traités ou traités au véhicule (environ 1000  $\mu$ m), confirmant ainsi un effet positif du GRT-X sur la poussée axonale.

Dans un second temps, nous avons comparé l'effet du GRT-X sur la poussée axonale aux ligands connus de TSPO (étifoxine et XBD173) et des Kv7.2/3 (ICA-27243 et XE991). Tous les groupes ont été traités à DIV1 et arrêtés à DIV4. Après immunomarquage et quantification par NeuriteJ, les aires sous la courbe (AUC) ont été calculées par la méthode trapézoïdale puis comparées entre les différents groupes. Nos résultats confirment que le GRT-X augmente la longueur et la densité du réseau de neurites à DIV4. En effet, le traitement au GRT-X a provoqué une augmentation significative de l'AUC en comparaison aux autres groupes. En revanche, XBD173, XE991, ICA27243 et EtOH ne montrent pas d'effet sur la croissance des neurites. Cependant, l'étifoxine induit une inhibition de la poussée axonale à DIV4 et s'avère être toxique pour les cellules, c'est pourquoi elle a été exclue du reste de nos expériences.

Un effet positif de l'étifoxine sur la poussée axonale a été démontré suite à des lésions nerveuses du nerf sciatique chez le rat adulte (âgé de 7 semaines) (Girard, Liu et al. 2008). Néanmoins, nos résultats montrent un effet inhibiteur dans nos cultures primaires de DRG. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que l'étifoxine est connue pour agir en tant que modulateur allostérique positif du récepteur GABAA et comme stimulateur de la production de neurostéroïdes suite à sa liaison à TSPO. Cependant, il existe des différences entre les récepteurs GABAA exprimés par les neurones cultivés à partir de DRG embryonnaires et adultes. Ces différences sont liées à des changements dans la composition des sous-unités des récepteurs (Maddox, Valeyev et al. 2004). Ainsi, le rôle des récepteurs GABAA semble changer radicalement au cours du développement. Chez l'adulte, les récepteurs GABAA assurent la médiation de l'inhibition synaptique, alors que chez l'embryon, les récepteurs GABAA sont excitateurs en raison d'une concentration de chlore intracellulaire élevée (Ben-Ari 2002). De plus, la dose de 20 $\mu$ M d'étifoxine (dose utilisée dans notre expérience) montre un effet positif

sur la poussée axonale chez un modèle adulte de rongeur (Girard, Liu et al. 2008) mais inhibe la poussée axonale dans les DRG embryonnaires. Puisque l'étéfoxine s'est avérée inhibitrice de la poussée axonale des DRG embryonnaires, et n'étant pas un ligand spécifique de TSPO (elle se lie aussi aux récepteurs GABAA), elle a été exclue de la suite de nos expériences. Néanmoins, le XBD173 s'est comporté comme ligand spécifique de TSPO et sera utilisé pour comparer l'effet sur la poussée axonale de GRT-X. L'absence d'effet des composés XBD173, ICA-27243, et XE991 sur la poussée axonale peut s'expliquer par l'importance du double mode d'action : en effet, la stimulation d'une cible ou d'une autre n'aurait pas d'effet sur la croissance axonale d'explants de DRG à DIV4, mais cette dernière serait plutôt le résultat de l'activation concomitante des deux cibles TSPO et Kv7.2/3 par le GRT-X.

L'effet du GRT-X, XBD173, ICA-27243, et XE991 à plus long terme (DIV8) a été ensuite testé après un traitement à DIV1 suivi ou non d'un autre traitement à DIV4.

Après un seul traitement (DIV8), nos résultats montrent que l'AUC du groupe traité au GRT-X est significativement supérieure à celle des autres groupes. En effet, l'AUC représentant les DRG traités au GRT-X est plus élevée que celle des autres groupes (GRT-X : 170 vs 100 pour XBD173, ICA-27243, et XE991). Ainsi, un seul traitement par le GRT-X serait suffisant pour maintenir un effet positif sur la poussée axonale jusqu'à DIV8, alors que tous les autres traitements n'ont aucun effet.

Suite à deux administrations à trois jours d'intervalle, à une dose de 10  $\mu$ M, les aires sous les courbes (AUC) des groupes traités avec GRT-X et XBD173 dépassent celles des groupes DRG traités avec XE991, ICA27243 et EtOH. Nos observations indiquent que GRT-X présente statistiquement une efficacité supérieure dans la promotion de la croissance axonale par rapport à XBD-173, ligand spécifique de la TSPO. Ces résultats suggèrent que GRT-X pourrait non seulement se lier au récepteur, mais également stimuler la croissance axonale. Par conséquent, GRT-X serait un candidat prometteur pour améliorer la régénération neuronale.

**L'ensemble des résultats obtenus en immunocytochimie montre que le GRT-X a un effet positif sur la croissance axonale. En revanche, les autres molécules testées (XBD173, XE991, ICA27243) n'ont montré aucun effet.**

Pour consolider les résultats obtenus, nous avons évalué par RT-qPCR les effets des différents traitements sur l'expression des gènes cibles du GRT-X (TSPO, Kv7.2/3), des gènes impliqués dans la myélinisation (Mpz, Mbp, Plp), dans la différenciation des cellules de Schwann (Dhh, Krox20, CNPase), et dans la structure axonale (Tfap2 $\alpha$ , Stmn2, périphérine, Cad19, Nfh). Pour

cela, des cultures dissociées de DRG embryonnaires provenant de femelles gestantes C57BL/6 à E13.5 ont été mises au point. L'effet du GRT-X 10 $\mu$ M sur l'expression des gènes a été comparé à celui des autres ligands : XBD173, ICA-27243, et XE991 à la même dose (10 $\mu$ M). Tous les groupes ont été traités à DIV1 et arrêtés à DIV4. Nos résultats de RT-qPCR montrent que le GRT-X induit une augmentation de l'expression de tous les gènes (Tspo, Kv7.2, Kv7.3, Mpz, Mbp, Plp, Dhh, Krox20, CNPase, Tfp2 $\alpha$ , Stmn2, Périphérine, Cad19, et Nfh) en comparaison à tous les autres groupes. Ces résultats sont très intéressants et concordent avec nos résultats de microscopie confocale. De plus, **ils montrent que le GRT-X agirait non seulement sur la prolifération axonale en augmentant la longueur et la densité axonale (via le marquage NFH) mais aussi sur la myélinisation, la différenciation Schwannienne et la structure axonale.** Ces résultats pourraient aussi expliquer les résultats obtenus par d'autres équipes de recherches. En effet, Bloms-Funke, Bankstahl et al. ont démontré un effet anti-épileptique du GRT-X chez trois modèles expérimentaux d'épilepsie (Bloms-Funke, Bankstahl et al. 2022). Cette observation serait due à l'augmentation de l'expression des Kv7.2/3 par le GRT-X qui aurait ainsi induit une hyperpolarisation. Dans une autre étude portant sur des rats diabétiques, Bloms-Funke, Schumacher et al. montrent une diminution de l'hyperalgésie suite au traitement par le GRT-X (Bloms-Funke, Schumacher et al. 2022). Les mêmes auteurs montrent également que le GRT-X favorise la survie et l'accélération de la régénération des neurones sensoriels et moteurs, ainsi que l'accélération de la récupération comportementale suite à des lésions cervicales chez le rat. Ceci pourrait s'expliquer par la stimulation de l'expression de gènes impliqués dans la myélinisation, la différenciation des cellules de Schwann, et la structure axonale.

En ce qui concerne le traitement des cultures cellulaires des DRG embryonnaires traitées par le XBD173 à 10  $\mu$ M, une augmentation de l'expression des mêmes gènes cités a également été observée comparativement aux cellules non traitées, et à celles traitées par les composés ICA-27243 et XE991 à la même dose (10 $\mu$ M). Cependant, l'activation de ces gènes par le GRT-X reste significativement plus importante. Nous notons une divergence entre l'augmentation de l'expression du gène Nfh suite au traitement par le XBD173, et l'absence d'effet du traitement sur la protéine NFH observée par microscopie confocale. Cette divergence pourrait s'expliquer par le temps séparant la transcription du gène de sa traduction.

Quant au composé XE991, connu comme inhibiteur des Kv7.2/3, une augmentation significative mais légère de l'expression du Kv7.2 et non du Kv7.3 est observée. En se basant

sur les données de la littérature qui montrent que le chromanol 293B, un inhibiteur des Kv7.1, induit une augmentation de l'expression de l'ARNm du KCNQ1 (McCallum, Greenwood et al. 2009), nous pouvons émettre la même hypothèse. **Nous montrons aussi que XE991 inhibe l'expression de gènes impliqués dans la myélinisation (Mpz, Mbp, CNPase) et d'un gène impliqué dans la structure axonale (Nfh).** Cependant aucune différence significative n'est observée entre les cellules non traitées et traitées par XE991 pour l'expression du reste des gènes impliqués dans la différenciation des cellules de Schwann (Dhh, Krox20), et dans la structure axonale (Tfap2 $\alpha$ , Stmn2, péricérine, Cad19). Ces résultats concordent avec nos observations par microscopie confocale qui montrent une légère inhibition non significative de la poussée axonale des DRG traités par le XE991 pour les DRG C57BL/6 à DIV4, et une inhibition significative pour les DRG TSPO-KO à DIV4.

Le composé ICA-27243, un agoniste des canaux potassiques, augmente significativement l'expression du Kv7.2, inhibe légèrement la poussée axonale et significativement l'expression des gènes impliqués dans la myélinisation et dans la différenciation des cellules de Schwann (Mpz, Mbp, Krox20, CNPase) et la structure axonale (Tfap2 $\alpha$ , Stmn2, Péricérine, Cad19, et Nfh). En revanche il n'affecte pas l'expression de certains gènes impliqués dans la différenciation des cellules de Schwann (Dhh, Krox20). De plus, ce résultat est confirmé par des données de la littérature qui ne montrent aucun effet du composé ICA27243 sur la récupération neuronale suite à des lésions cervicales (Bloms-Funke, Schumacher et al. 2022)n. Cependant aucune étude moléculaire n'a été effectuée pour montrer la modulation des gènes par le composé ICA27243.

Afin de **confirmer l'importance du double mode d'action du GRT-X**, et sachant qu'il n'existe pas d'outil pharmacologique permettant de bloquer l'expression de TSPO, les mêmes expériences ont été répétées sur des DRG embryonnaires provenant de souris TSPO-KO. L'effet du GRT-X sur la poussée axonale a été comparé à celui de ligands connus de TSPO (XBD173) et des Kv7.2/3 (ICA-27243 et XE991). Tous les groupes ont été traités à DIV1 et arrêtés à DIV4. Après immunomarquage, quantification et calcul des aires sous la courbe (AUC), **nous ne montrons pas de différence significative entre les AUC des différents groupes, à l'exception du groupe de DRG traités par les composés XE991 et ICA27243.** Ces derniers présentent des AUC significativement plus faibles que celles des autres groupes. Cela peut être dû au double blocage simultané de TSPO et des Kv7.2/3, ou de l'activation des Kv7.2/3 uniquement, ayant ainsi un effet inhibiteur sur la poussée axonale. **La perte de l'effet positif du GRT-X sur la**

**poussée axonale des DRG TSPO-KO confirme que l'effet stimulateur de la molécule observé chez les DRG C57BL/6 est médié par TSPO.** De plus, l'absence d'effet des autres molécules (XBD173, XE991, ICA27243) concorde avec nos observations microscopiques des DRG C57BL/6.

Pour **consolider les résultats obtenus, nous avons évalué par RT-qPCR** dans des cultures dissociées de DRG embryonnaires TSPO-KO, **les effets des différents traitements sur l'expression des gènes cibles du GRT-X (TSPO, Kv7.2/3) ainsi que sur les gènes impliqués dans la myélinisation, la différenciation des cellules de Schwann et la structure axonale.** L'effet du GRT-X 10µM sur l'expression des gènes a été comparé à celui des autres ligands : XBD173, ICA-27243, et XE991 à la même dose (10µM). Tous les groupes ont été traités à DIV1 et arrêtés à DIV4. Nos résultats de RT-qPCR confirment que les souris sont TSPO-KO dû à l'absence d'expression du gène *Tspo* dans tous les groupes.

Le GRT-X n'a aucun effet sur l'expression du *Nfh*, concordant avec nos observations microscopiques. De plus, le GRT-X perd également son effet sur l'expression des gènes impliqués dans la différenciation Schwannienne (*Krox20*) et la structure neuronale (*périphérine*). Cette perte d'effet du traitement confirme l'importance du double mode d'action. Cependant, il maintient un effet positif sur l'expression des *Kv7.2/3* témoignant ainsi que les canaux potassiques constituent la deuxième cible du GRT-X. De plus, nos résultats montrent une augmentation de l'expression de gènes impliqués dans la myélinisation (*Mpz*, *Mbp*, *Plp*, *Dhh*, *CNPase*) et dans la structure neuronale (*Tfap2α*, et *Cad19*) suite au traitement par le GRT-X. La persistance de la stimulation de l'expression de ces gènes par le GRT-X dans les DRG C57BL/6 et TSPO-KO pourrait s'expliquer par l'éventuelle présence d'une troisième cible de la molécule. Cette hypothèse devrait être confirmée par des études moléculaires poussées.

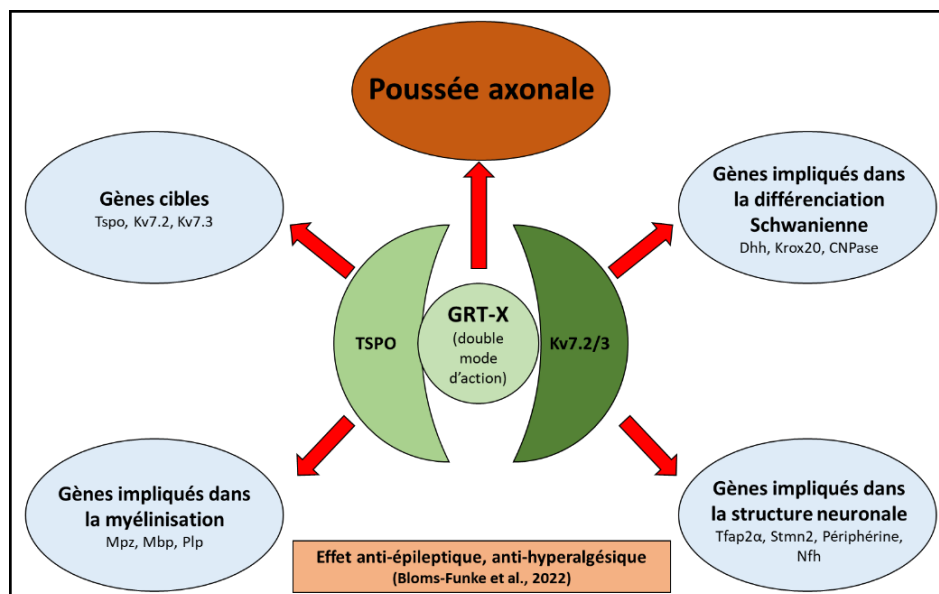
En ce qui concerne le traitement des cultures cellulaires des DRG embryonnaires traitées par le XBD173 à 10 µM, nos résultats de RT-qPCR ne montrent aucun effet sur l'expression du *Nfh*. Ces résultats coïncident avec nos observations microscopiques. De plus, le traitement par le XBD173 n'affecte pas l'expression de gènes impliqués dans la myélinisation (*Mbp*, *Plp*) et dans la structure axonale (*Cad19*, *Stmn2*). Contrairement aux cultures dissociées de DRG C57BL/6, l'absence d'effet stimulateur du XBD173 sur l'expression de ces gènes dans les cultures de DRG TSPO-KO confirme l'importance de TSPO.

Les effets des composés XE991 et ICA-27243 sur l'expression des gènes observés dans les DRG TSPO-KO coïncident avec les DRG C57BL/6, avec quelques exceptions (voir **Tableau 8** pour la comparaison). Nos résultats confirment ainsi que les effets des composés XE991 et ICA-27243 sont en effet médiés pas les Kv7.2/3. Les différences d'expression des gènes observées entre les DRG C57BL/6 et TSPO-KO pourraient s'expliquer par la différence du contexte génétique entre les deux espèces de souris, qui pourrait engendrer une différence d'expression des gènes.

Il est important de noter que tous les résultats de microscopie confocale et de RT-qPCR ne montrent aucune différence significative causée par l'EtOH. Nous pouvons donc confirmer que tous les effets observés sont dus aux molécules administrées et non pas au véhicule.

## Conclusion et perspectives

En conclusion, nous montrons que GRT-X se lie à la fois à TSPO et aux Kv7.2/3. Grâce à ce double mode d'action, le GRT-X stimule non seulement la poussée axonale, mais également l'expression de gènes impliqués dans la myélinisation (Mpz, Mbp, Plp), la différenciation Schwannienne (Dhh, Krox20, CNPase), et dans la structure neuronale (Tfap2 $\alpha$ , Stmn2, péricérine, Cad19, Nfh). L'activation de ces gènes serait donc à l'origine des effets décrits par Bloms et al (Bloms-Funke, Bankstahl et al. 2022, Bloms-Funke, Schumacher et al. 2022) qui a montré un effet antiépileptique, anti-hyperalgésique (**Figure 21**). Par ailleurs, l'augmentation de l'expression de la majorité des gènes étudiés dans les souris *Tspo*<sup>-/-</sup> pourrait s'expliquer par l'éventuelle présence d'une troisième cible moléculaire du GRT-X qui serait à déterminer. Le composé XBD173, un ligand spécifique de TSPO, stimule également la poussée axonale et l'expression des gènes préalablement cités. Cependant, l'effet du double mode d'action du GRT-X reste plus important. En revanche, l'activation des canaux potassiques voltage-dépendants par le composé ICA27243 inhibe la poussée axonale ainsi que l'expression des gènes. Ainsi, l'activation simultanée de TSPO et des Kv7.2/3 rendent le GRT-X une molécule fort intéressante en tant que cible potentielle pour le traitement des lésions nerveuses, ainsi que des douleurs neuropathiques qui en résultent. Les études futures devraient porter sur des lésions nerveuses effectuées in vivo en présence ou en absence de GRT-X pour montrer ces effets sur la poussée axonale.



**Figure 21.** Les effets antiépileptique, anti-hyperalgésique du GRT-X décrits par Bloms-Funke et al sont probablement médiés par la stimulation de la poussée axonale et la modulation des gènes impliqués dans la myélinisation, la différenciation Schwannienne et la structure neuronale.

## Bibliographie

- Adameyko, I., F. Lallemand, A. Furlan, N. Zinin, S. Aranda, S. S. Kitambi, A. Blanchart, R. Favaro, S. Nicolis and M. Lübke (2012). "Sox2 and Mitf cross-regulatory interactions consolidate progenitor and melanocyte lineages in the cranial neural crest." *Development* **139**(2): 397-410.
- Attal, N., M. Lanteri-Minet, B. Laurent, J. Fermanian and D. Bouhassira (2011). "The specific disease burden of neuropathic pain: results of a French nationwide survey." *Pain* **152**(12): 2836-2843.
- Baba, H. (2022). "[Introduction to Myelin Research]." *Yakugaku Zasshi* **142**(8): 837-853.
- Bader, S., L. Wolf, V. M. Milenkovic, M. Gruber, C. Nothdurfter, R. Rupprecht and C. H. Wetzel (2019). "Differential effects of TSPO ligands on mitochondrial function in mouse microglia cells." *Psychoneuroendocrinology* **106**: 65-76.
- Balakrishnan, A., L. Belfiore, T.-H. Chu, T. Fleming, R. Midha, J. Biernaskie and C. Schuurmans (2021). "Insights into the role and potential of schwann cells for peripheral nerve repair from studies of development and injury." *Frontiers in Molecular Neuroscience* **13**: 608442.
- Balakrishnan, A., M. G. Stykel, Y. Touahri, J. A. Stratton, J. Biernaskie and C. Schuurmans (2016). "Temporal analysis of gene expression in the murine Schwann cell lineage and the acutely injured postnatal nerve." *PLoS One* **11**(4): e0153256.
- Banati, R. B., R. J. Middleton, R. Chan, C. R. Hatty, W. Wai-Ying Kam, C. Quin, M. B. Graeber, A. Parmar, D. Zahra, P. Callaghan, S. Fok, N. R. Howell, M. Gregoire, A. Szabo, T. Pham, E. Davis and G.-J. Liu (2014). "Positron emission tomography and functional characterization of a complete PBR/TSPO knockout." *Nature Communications* **5**(1): 5452.
- Barron, A. M., L. M. Garcia-Segura, D. Caruso, A. Jayaraman, J.-W. Lee, R. C. Melcangi and C. J. Pike (2013). "Ligand for translocator protein reverses pathology in a mouse model of Alzheimer's disease." *Journal of Neuroscience* **33**(20): 8891-8897.
- Beghi, E. (2020). "The epidemiology of epilepsy." *Neuroepidemiology* **54**(2): 185-191.
- Ben-Ari, Y. (2002). "Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture." *Nat Rev Neurosci* **3**(9): 728-739.
- Bernatoniene, J., A. Sciupokas, D. M. Kopustinskiene and K. Petrikonis (2023). "Novel Drug Targets and Emerging Pharmacotherapies in Neuropathic Pain." *Pharmaceutics* **15**(7): 1799.
- Bethea, J. R. and R. Fischer (2021). "Role of Peripheral Immune Cells for Development and Recovery of Chronic Pain." *Front Immunol* **12**: 641588.
- Bhatheja, K. and J. Field (2006). "Schwann cells: origins and role in axonal maintenance and regeneration." *Int J Biochem Cell Biol* **38**(12): 1995-1999.
- Bi, W., W. Huang, D. J. Whitworth, J. M. Deng, Z. Zhang, R. R. Behringer and B. De Crombrughe (2001). "Haploinsufficiency of Sox9 results in defective cartilage primordia and premature skeletal mineralization." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**(12): 6698-6703.
- Blake, J. A. and M. R. Ziman (2013). "The characterisation of Pax3 expressant cells in adult peripheral nerve." *PLoS One* **8**(3): e59184.
- Bloms-Funke, P., M. Bankstahl, J. Bankstahl, C. Kneip, W. Schröder and W. Löscher (2022). "The novel dual-mechanism Kv7 potassium channel/TSPO receptor activator GRT-X is more effective than the Kv7 channel opener retigabine in the 6-Hz refractory seizure mouse model." *Neuropharmacology* **203**: 108884.
- Bloms-Funke, P., M. Schumacher, S. Liu, D. Su, J. Li, P. Liere, R. Rupprecht, C. Nothdurfter, G. Bahrenberg, T. Christoph, C. Habermann, C. Kneip, W. Schröder, T. M. Tzschentke and D. Saunders (2022). "A novel dual mode-of-action anti-hyperalgesic compound in rats which is neuroprotective and promotes neuroregeneration." *Eur J Pharmacol* **923**: 174935.

Bonsack, F. and S. Sukumari-Ramesh (2018). "TSPO: An Evolutionarily Conserved Protein with Elusive Functions." Int J Mol Sci **19**(6).

Bouhassira, D., M. Lantéri-Minet, N. Attal, B. Laurent and C. Touboul (2008). "Prevalence of chronic pain with neuropathic characteristics in the general population." Pain **136**(3): 380-387.

Brown, A. M. (1990). "Regulation of heartbeat by G protein-coupled ion channels." Am J Physiol **259**(6 Pt 2): H1621-1628.

Brown, M. T., P. Henny, J. P. Bolam and P. J. Magill (2009). "Activity of neurochemically heterogeneous dopaminergic neurons in the substantia nigra during spontaneous and driven changes in brain state." J Neurosci **29**(9): 2915-2925.

Buchstaller, J., L. Sommer, M. Bodmer, R. Hoffmann, U. Suter and N. Mantei (2004). "Efficient isolation and gene expression profiling of small numbers of neural crest stem cells and developing Schwann cells." J Neurosci **24**(10): 2357-2365.

Cafferty, W. B., N. J. Gardiner, I. Gavazzi, J. Powell, S. B. McMahon, J. K. Heath, J. Munson, J. Cohen and S. W. Thompson (2001). "Leukemia inhibitory factor determines the growth status of injured adult sensory neurons." J Neurosci **21**(18): 7161-7170.

Carraro, U., H. Kern, P. Gava, C. Hofer, S. Loeffler, P. Gargiulo, S. Mosole, S. Zampieri, V. Gobbo, B. Ravara, F. Piccione, A. Marcante, A. Baba, S. Schils, A. Pond and F. Gava (2015). "Biology of Muscle Atrophy and of its Recovery by FES in Aging and Mobility Impairments: Roots and By-Products." Eur J Transl Myol **25**(4): 221-230.

Chen, Z. L., W. M. Yu and S. Strickland (2007). "Peripheral regeneration." Annu Rev Neurosci **30**: 209-233.

Christensen, A. and C. J. Pike (2018). "TSPO ligand PK11195 improves Alzheimer-related outcomes in aged female 3xTg-AD mice." Neurosci Lett **683**: 7-12.

Colloca, L., T. Ludman, D. Bouhassira, R. Baron, A. H. Dickenson, D. Yarnitsky, R. Freeman, A. Truini, N. Attal, N. B. Finnerup, C. Eccleston, E. Kalso, D. L. Bennett, R. H. Dworkin and S. N. Raja (2017). "Neuropathic pain." Nat Rev Dis Primers **3**: 17002.

D'Antonio, M., D. Michalovich, M. Paterson, A. Droggiti, A. Woodhoo, R. Mirsky and K. R. Jessen (2006). "Gene profiling and bioinformatic analysis of Schwann cell embryonic development and myelination." Glia **53**(5): 501-515.

Deng, Y., B. Kim, X. He, S. Kim, C. Lu, H. Wang, S. G. Cho, Y. Hou, J. Li, X. Zhao and Q. R. Lu (2014). "Direct visualization of membrane architecture of myelinating cells in transgenic mice expressing membrane-anchored EGFP." Genesis **52**(4): 341-349.

Doddrell, R. D., X. P. Dun, R. M. Moate, K. R. Jessen, R. Mirsky and D. B. Parkinson (2012). "Regulation of Schwann cell differentiation and proliferation by the Pax-3 transcription factor." Glia **60**(9): 1269-1278.

El Chemali, L., Y. Akwa and L. Massaad-Massade (2022). "The mitochondrial translocator protein (TSPO): a key multifunctional molecule in the nervous system." Biochem J **479**(13): 1455-1466.

Elkamhawy, A., J. E. Park, A. H. E. Hassan, A. N. Pae, J. Lee, B. G. Park, S. Paik, J. Do, J. H. Park, K. D. Park, B. Moon, W. K. Park, H. Cho, D. Y. Jeong and E. J. Roh (2017). "Design, synthesis, biological evaluation and molecular modelling of 2-(2-aryloxyphenyl)-1,4-dihydroisoquinolin-3(2H)-ones: A novel class of TSPO ligands modulating amyloid- $\beta$ -induced mPTP opening." Eur J Pharm Sci **104**: 366-381.

Fasick, V., R. N. Spengler, S. Samankan, N. D. Nader and T. A. Ignatowski (2015). "The hippocampus and TNF: Common links between chronic pain and depression." Neurosci Biobehav Rev **53**: 139-159.

Finnerup, N. B., N. Attal, S. Haroutounian, E. McNicol, R. Baron, R. H. Dworkin, I. Gilron, M. Haanpää, P. Hansson, T. S. Jensen, P. R. Kamerman, K. Lund, A. Moore, S. N. Raja, A. S. Rice, M. Rowbotham, E. Sena, P. Siddall, B. H. Smith and M. Wallace (2015). "Pharmacotherapy for neuropathic pain in adults: a systematic review and meta-analysis." Lancet Neurol **14**(2): 162-173.

Finnerup, N. B., S. Haroutounian, P. Kamerman, R. Baron, D. L. H. Bennett, D. Bouhassira, G. Cruccu, R. Freeman, P. Hansson, T. Nurmikko, S. N. Raja, A. S. C. Rice, J. Serra, B. H. Smith, R. D. Treede and T. S. Jensen (2016). "Neuropathic pain: an updated grading system for research and clinical practice." Pain **157**(8): 1599-1606.

Finnerup, N. B., R. Kuner and T. S. Jensen (2021). "Neuropathic Pain: From Mechanisms to Treatment." Physiol Rev **101**(1): 259-301.

Finnerup, N. B., S. H. Sindrup and T. S. Jensen (2007). "Chronic neuropathic pain: mechanisms, drug targets and measurement." Fundam Clin Pharmacol **21**(2): 129-136.

Finzsch, M., S. Schreiner, T. Kichko, P. Reeh, E. R. Tamm, M. R. Bösl, D. Meijer and M. Wegner (2010). "Sox10 is required for Schwann cell identity and progression beyond the immature Schwann cell stage." Journal of Cell Biology **189**(4): 701-712.

Gao, Y. J. and R. R. Ji (2010). "Targeting astrocyte signaling for chronic pain." Neurotherapeutics **7**(4): 482-493.

Garbay, B., A. M. Heape, F. Sargueil and C. Cassagne (2000). "Myelin synthesis in the peripheral nervous system." Prog Neurobiol **61**(3): 267-304.

Gavish, M. and L. Veenman (2018). "Regulation of mitochondrial, cellular, and organismal functions by TSPO." Advances in pharmacology **82**: 103-136.

Ghislain, J. and P. Charnay (2006). "Control of myelination in Schwann cells: a Krox20 cis-regulatory element integrates Oct6, Brn2 and Sox10 activities." EMBO reports **7**(1): 52-58.

Girard, C., S. Liu, F. Cadepond, D. Adams, C. Lacroix, M. Verleye, J. M. Gillardin, E. E. Baulieu, M. Schumacher and G. Schweizer-Groyer (2008). "Etifoxine improves peripheral nerve regeneration and functional recovery." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(51): 20505-20510.

Gomez-Sanchez, J. A., K. S. Pilch, M. van der Lans, S. V. Fazal, C. Benito, L. J. Wagstaff, R. Mirsky and K. R. Jessen (2017). "After Nerve Injury, Lineage Tracing Shows That Myelin and Remak Schwann Cells Elongate Extensively and Branch to Form Repair Schwann Cells, Which Shorten Radically on Remyelination." J Neurosci **37**(37): 9086-9099.

Gong, J., É. M. Szego, A. Leonov, E. Benito, S. Becker, A. Fischer, M. Zweckstetter, T. Outeiro and A. Schneider (2019). "Translocator protein ligand protects against neurodegeneration in the MPTP mouse model of Parkinsonism." Journal of Neuroscience **39**(19): 3752-3769.

Gordon, T. (2015). "The biology, limits, and promotion of peripheral nerve regeneration in rats and humans." Nerves and nerve injuries: 993-1019.

Gordon, T. (2016). "Nerve Regeneration: Understanding Biology and Its Influence on Return of Function After Nerve Transfers." Hand Clin **32**(2): 103-117.

Gordon, T., N. Tyreman and M. A. Raji (2011). "The basis for diminished functional recovery after delayed peripheral nerve repair." J Neurosci **31**(14): 5325-5334.

Gordon, T., P. Wood and O. A. R. Sulaiman (2018). "Long-Term Denervated Rat Schwann Cells Retain Their Capacity to Proliferate and to Myelinate Axons in vitro." Front Cell Neurosci **12**: 511.

Gravel, M., A. Di Polo, P. B. Valera and P. E. Braun (1998). "Four-kilobase sequence of the mouse CNP gene directs spatial and temporal expression of lacZ in transgenic mice." J Neurosci Res **53**(4): 393-404.

Greene, D. L. and N. Hoshi (2017). "Modulation of Kv7 channels and excitability in the brain." Cellular and Molecular Life Sciences **74**: 495-508.

Gunthorpe, M. J., C. H. Large and R. Sankar (2012). "The mechanism of action of retigabine (ezogabine), a first-in-class K<sup>+</sup> channel opener for the treatment of epilepsy." Epilepsia **53**(3): 412-424.

He, Y., J. Y. Kim, J. Dupree, A. Tewari, C. Melendez-Vasquez, J. Svaren and P. Casaccia (2010). "Yy1 as a molecular link between neuregulin and transcriptional modulation of peripheral myelination." Nature neuroscience **13**(12): 1472-1480.

Hefting, L. L., E. D'Este, E. Arvedsen, T. Benned-Jensen and H. B. Rasmussen (2020). "Multiple Domains in the Kv7.3 C-Terminus Can Regulate Localization to the Axon Initial Segment." Front Cell Neurosci **14**: 10.

Jacob, C. (2015). "Transcriptional control of neural crest specification into peripheral glia." Glia **63**(11): 1883-1896.

Jessen, K. R. and R. Mirsky (2005). "The origin and development of glial cells in peripheral nerves." Nature Reviews Neuroscience **6**(9): 671-682.

Jessen, K. R. and R. Mirsky (2019). "Schwann cell precursors; multipotent glial cells in embryonic nerves." Frontiers in molecular neuroscience **12**: 69.

Kim, J. and H. A. Kim (2018). "Isolation and Expansion of Schwann Cells from Transgenic Mouse Models." Methods Mol Biol **1739**: 39-48.

Kioussi, C., M. K. Gross and P. Gruss (1995). "Pax3: a paired domain gene as a regulator in PNS myelination." Neuron **15**(3): 553-562.

Lacapère, J.-J., L. Duma, S. Finet, M. Kassiou and V. Papadopoulos (2020). "Insight into the structural features of TSPO: implications for drug development." Trends in pharmacological sciences **41**(2): 110-122.

Leaver, K. R., A. Reynolds, S. Bodard, D. Guilloteau, S. Chalou and M. Kassiou (2012). "Effects of translocator protein (18 kDa) ligands on microglial activation and neuronal death in the quinolinic-acid-injected rat striatum." ACS Chem Neurosci **3**(2): 114-119.

Levitz, S. M. and R. D. Diamond (1985). "A rapid colorimetric assay of fungal viability with the tetrazolium salt MTT." Journal of Infectious Diseases **152**(5): 938-945.

Li, H. D., M. Li, E. Shi, W. N. Jin, K. Wood, R. Gonzales and Q. Liu (2017). "A translocator protein 18 kDa agonist protects against cerebral ischemia/reperfusion injury." J Neuroinflammation **14**(1): 151.

Liere, P., G. J. Liu, A. Pianos, R. J. Middleton, R. B. Banati and Y. Akwa (2023). "The Comprehensive Steroidome in Complete TSPO/PBR Knockout Mice under Basal Conditions." Int J Mol Sci **24**(3).

Liu, S., L. Xu, T. Zhang, G. Ren and Z. Yang (2010). "Oxidative stress and apoptosis induced by nanosized titanium dioxide in PC12 cells." Toxicology **267**(1-3): 172-177.

Löscher, W. and P. Klein (2021). "The Pharmacology and Clinical Efficacy of Antiseizure Medications: From Bromide Salts to Cenobamate and Beyond." CNS Drugs **35**(9): 935-963.

Maddox, F. N., A. Y. Valeyev, K. Poth, A. M. Holohean, P. M. Wood, R. A. Davidoff, J. C. Hackman and C. W. Luetje (2004). "GABAA receptor subunit mRNA expression in cultured embryonic and adult human dorsal root ganglion neurons." Brain Res Dev Brain Res **149**(2): 143-151.

Martini, R., S. Fischer, R. López-Vales and S. David (2008). "Interactions between Schwann cells and macrophages in injury and inherited demyelinating disease." Glia **56**(14): 1566-1577.

McCallum, L. A., I. A. Greenwood and R. M. Tribe (2009). "Expression and function of K(v)7 channels in murine myometrium throughout oestrous cycle." Pflugers Arch **457**(5): 1111-1120.

Melli, G. and A. Höke (2009). "Dorsal Root Ganglia Sensory Neuronal Cultures: a tool for drug discovery for peripheral neuropathies." Expert Opin Drug Discov **4**(10): 1035-1045.

Mills, C., M. Makwana, A. Wallace, S. Benn, H. Schmidt, I. Tegeder, M. Costigan, R. H. Brown Jr, G. Raivich and C. J. Woolf (2008). "Ro5-4864 promotes neonatal motor neuron survival and nerve regeneration in adult rats." European Journal of Neuroscience **27**(4): 937-946.

Monga, S., R. Nagler, R. Amara, A. Weizman and M. Gavish (2019). "Inhibitory effects of the two novel TSPO ligands 2-Cl-MGV-1 and MGV-1 on LPS-induced microglial activation." Cells **8**(5): 486.

Murphy, K. L., J. R. Bethea and R. Fischer (2017). *Neuropathic Pain in Multiple Sclerosis—Current Therapeutic Intervention and Future Treatment Perspectives. Multiple Sclerosis: Perspectives in Treatment and Pathogenesis.* I. S. Zagon and P. J. McLaughlin. Brisbane (AU), Codon Publications

Copyright: The Authors.

Nakazaki, H., Y. W. Shen, B. Yun, A. Reddy, V. Khanna, B. Mania-Farnell, S. Ichi, D. G. McLone, T. Tomita and C. S. Mayanil (2009). "Transcriptional regulation by Pax3 and TGFbeta2 signaling: a potential gene regulatory network in neural crest development." Int J Dev Biol **53**(1): 69-79.

Nocera, G. and C. Jacob (2020). "Mechanisms of Schwann cell plasticity involved in peripheral nerve repair after injury." Cell Mol Life Sci **77**(20): 3977-3989.

Nutma, E., K. Ceyzeriat, S. Amor, S. Tsartsalis, P. Millet, D. R. Owen, V. Papadopoulos and B. B. Tournier (2021). "Cellular sources of TSPO expression in healthy and diseased brain." European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging: 1-18.

Padilla, K., A. D. Wickenden, A. C. Gerlach and K. McCormack (2009). "The KCNQ2/3 selective channel opener ICA-27243 binds to a novel voltage-sensor domain site." Neurosci Lett **465**(2): 138-142.

Papadopoulos, V., J. Fan and B. Zirkin (2018). "Translocator protein (18 kDa): an update on its function in steroidogenesis." J Neuroendocrinol **30**(2).

Paratore, C., D. E. Goerich, U. Suter, M. Wegner and L. Sommer (2001). "Survival and glial fate acquisition of neural crest cells are regulated by an interplay between the transcription factor Sox10 and extrinsic combinatorial signaling."

Parkinson, D. B., A. Bhaskaran, P. Arthur-Farraj, L. A. Noon, A. Woodhoo, A. C. Lloyd, M. L. Feltri, L. Wrabetz, A. Behrens and R. Mirsky (2008). "c-Jun is a negative regulator of myelination." The Journal of cell biology **181**(4): 625-637.

Parkinson, D. B., A. Bhaskaran, A. Droggiti, S. Dickinson, M. D'Antonio, R. Mirsky and K. R. Jessen (2004). "Krox-20 inhibits Jun-NH2-terminal kinase/c-Jun to control Schwann cell proliferation and death." The Journal of cell biology **164**(3): 385-394.

Perucca, P. and F. G. Gilliam (2012). "Adverse effects of antiepileptic drugs." The lancet neurology **11**(9): 792-802.

Petzold, A. (2005). "Neurofilament phosphoforms: surrogate markers for axonal injury, degeneration and loss." J Neurol Sci **233**(1-2): 183-198.

Reddy, D. S. (2011). "Role of anticonvulsant and antiepileptogenic neurosteroids in the pathophysiology and treatment of epilepsy." Frontiers in endocrinology **2**: 38.

Ryu, E. J., J. Y. Wang, N. Le, R. H. Baloh, J. A. Gustin, R. E. Schmidt and J. Milbrandt (2007). "Misexpression of Pou3f1 results in peripheral nerve hypomyelination and axonal loss." Journal of Neuroscience **27**(43): 11552-11559.

Sacerdote, P., S. Franchi, S. Moretti, M. Castelli, P. Procacci, V. Magnaghi and A. E. Panerai (2013). "Cytokine modulation is necessary for efficacious treatment of experimental neuropathic pain." J Neuroimmune Pharmacol **8**(1): 202-211.

Salzer, J. L. and B. Zalc (2016). "Myelination." Curr Biol **26**(20): R971-r975.

Scheib, J. and A. Höke (2013). "Advances in peripheral nerve regeneration." Nat Rev Neurol **9**(12): 668-676.

Stewart, H. J., A. Brennan, M. Rahman, G. Zoidl, P. J. Mitchell, K. R. Jessen and R. Mirsky (2001). "Developmental regulation and overexpression of the transcription factor AP-2, a potential regulator of the timing of Schwann cell generation." European Journal of Neuroscience **14**(2): 363-372.

Stone, V., H. Johnston and R. P. Schins (2009). "Development of in vitro systems for nanotoxicology: methodological considerations." Critical reviews in toxicology **39**(7): 613-626.

Sundaram, V. K., T. El Jalkh, R. Barakat, C. J. I. Fernandez, C. Massaad and J. Grenier (2021). "Retracing Schwann Cell Developmental Transitions in Embryonic Dissociated DRG/Schwann Cell Cocultures in Mice." Front Cell Neurosci **15**: 590537.

Szewczyk, A. K., A. Jamroz-Wiśniewska, N. Haratym and K. Rejdak (2022). "Neuropathic pain and chronic pain as an underestimated interdisciplinary problem." Int J Occup Med Environ Health **35**(3): 249-264.

Taveggia, C. and A. Bolino (2018). "DRG Neuron/Schwann Cells Myelinating Cocultures." Methods Mol Biol **1791**: 115-129.

Thomas, C. K., R. B. Stein, T. Gordon, R. G. Lee and M. G. Elleker (1987). "Patterns of reinnervation and motor unit recruitment in human hand muscles after complete ulnar and median nerve section and resuture." J Neurol Neurosurg Psychiatry **50**(3): 259-268.

Torres-Espín, A., D. Santos, F. González-Pérez, J. del Valle and X. Navarro (2014). "Neurite-J: an image-J plug-in for axonal growth analysis in organotypic cultures." J Neurosci Methods **236**: 26-39.

Veenman, L., Y. Shandalov and M. Gavish (2008). "VDAC activation by the 18 kDa translocator protein (TSPO), implications for apoptosis." J Bioenerg Biomembr **40**(3): 199-205.

Wang, J., Z.-J. Lin, L. Liu, H.-Q. Xu, Y.-W. Shi, Y.-H. Yi, N. He and W.-P. Liao (2017). "Epilepsy-associated genes." Seizure **44**: 11-20.

Wickenden, A. D., J. L. Krajewski, B. London, P. K. Wagoner, W. A. Wilson, S. Clark, R. Roeloffs, G. McNaughton-Smith and G. C. Rigdon (2008). "N-(6-chloro-pyridin-3-yl)-3,4-difluorobenzamide (ICA-27243): a novel, selective KCNQ2/Q3 potassium channel activator." Mol Pharmacol **73**(3): 977-986.

Woodhoo, A. and L. Sommer (2008). "Development of the Schwann cell lineage: from the neural crest to the myelinated nerve." Glia **56**(14): 1481-1490.

Yeung, S. Y. M. and I. A. Greenwood (2005). "Electrophysiological and functional effects of the KCNQ channel blocker XE991 on murine portal vein smooth muscle cells." British journal of pharmacology **146**(4): 585-595.

**Titre :** Effets neuroprotecteurs et neurorégénérateurs d'un nouveau ligand de TSPO et des canaux potassiques Kv7.2/3 dans le système nerveux périphérique

**Mots clés :** TSPO, Kv7.2/3, poussée axonale

**Résumé :** Bien que les nerfs périphériques adultes conservent la capacité de se régénérer, la restauration fonctionnelle reste souvent décevante en cas de lésions traumatiques ou de neuropathies périphériques. De plus, une mauvaise récupération est souvent associée au développement de douleurs neuropathiques chroniques. La protéine translocatrice mitochondriale (protéine de translocation, TSPO, 18 kDa) et les canaux potassiques Kv7.2/3 (KCQN2/3) voltage-dépendants sont deux cibles prometteuses pour favoriser la régénération des nerfs périphériques et la récupération fonctionnelle, et pour prévenir la chronicisation des douleurs neuropathiques. Récemment, une nouvelle classe de molécules, GRT-X, ciblant à la fois la TSPO et les Kv7.2/3, a été développée par la compagnie pharmaceutique Grünenthal. Le but de cette thèse est d'étudier le rôle du GRT-X dans la poussée axonale. Cette preuve de concept a été effectuée sur des cultures d'explants et des cultures dissociées de ganglions spinaux embryonnaires (ou Dorsal Root Ganglia, DRG) à E13.5 provenant soit de souris C57BL6/J, soit de souris TSPO-KO. Des études microscopiques, moléculaires et cinétiques ont été réalisées, et les effets du GRT-X ont été comparés à ceux d'autres molécules : étifoxine (agoniste de la TSPO), XBD173 (agoniste de la TSPO), ICA-27243 (agoniste des Kv7.2/3) et XE991 (antagoniste des Kv7.2/3) dans les deux modèles expérimentaux. Les résultats montrent que le GRT-X a un effet positif sur la poussée axonale. Cet effet est plus important que celui des autres groupes et est maintenu aux différents moments et aux différentes doses testées. De plus, le GRT-X induit une augmentation de l'expression des gènes impliqués dans le développement, la myélinisation et la poussée axonale par rapport aux autres groupes. Les mêmes expériences réalisées sur les DRG embryonnaires TSPO-KO montrent une diminution de l'efficacité du GRT-X. Ces résultats montrent l'implication du GRT-X dans la poussée axonale qui est liée à son double mode d'action (TSPO et Kv7.2/3). Ainsi, le GRT-X serait une cible prometteuse pour le traitement de lésions du système nerveux périphérique en favorisant la poussée axonale par liaison à la TSPO, mais aussi en diminuant la douleur en se liant aux Kv7.2/3 qui régulent l'hyperexcitabilité neuronale.

**Title :** Neuroprotective and Neuroregenerative effects of a novel TSPO and voltage-gated potassium channels Kv7.2/ 3 ligand in the peripheral nervous system

**Keywords :** TSPO, Kv7.2/3, axonal growth

**Abstract :** While adult peripheral nerves retain the ability to regenerate, functional restoration is often unsatisfactory in cases of traumatic injury or peripheral neuropathy. Furthermore, poor recovery is frequently associated with the development of chronic neuropathic pain. The mitochondrial translocator protein (TSPO, 18 kDa) and the voltage-dependent Kv7.2/3 potassium channels (KCQN2/3) represent two promising targets for enhancing peripheral nerve regeneration, promoting functional recovery, and preventing the chronicization of neuropathic pain. Recently, a novel class of molecules, GRT-X, that targets both TSPO and Kv7.2/3 has been developed by the pharmaceutical company Grünenthal. The objective of this thesis is to investigate the role of GRT-X in axonal growth. This proof-of-concept study was conducted using explant and dissociated cultures of embryonic dorsal root ganglia (DRG) at E13.5 from either C57BL6/J or TSPO-KO mice. Microscopic, molecular, and kinetic studies were performed, and the effects of GRT-X were compared with those of other molecules: etifoxine (a TSPO agonist), XBD173 (a TSPO agonist), ICA-27243 (a Kv7.2/3 agonist), and XE991 (a Kv7.2/3 antagonist) in both experimental models. Our data demonstrates that GRT-X exerts a positive influence on axonal growth. This effect surpasses that of the other molecules and is sustained at various tested time points and doses. Furthermore, GRT-X elevates the expression levels of genes involved in development, myelination, and axonal growth in comparison to the other groups. In parallel, the same experiments conducted on TSPO-KO embryonic DRGs reveal a reduced efficacy of GRT-X. These findings highlight the involvement of GRT-X in axonal growth, attributed to its dual mode of action (TSPO and Kv7.2/3). Therefore, GRT-X holds promise as a potential target for the treatment of lesions affecting the peripheral nervous system by promoting axonal growth via TSPO binding and concurrently reducing pain through its interaction with Kv7.2/3, which regulate neuronal hyperexcitability.