



HAL
open science

Etude de la voie de signalisation Sonic Hedgehog et du contrôle de la prolifération cellulaire dans le cerveau mature de rongeurs

Karine Loulier

► **To cite this version:**

Karine Loulier. Etude de la voie de signalisation Sonic Hedgehog et du contrôle de la prolifération cellulaire dans le cerveau mature de rongeurs. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Paris Sud - Paris XI, 2005. Français. NNT: . tel-00429497

HAL Id: tel-00429497

<https://theses.hal.science/tel-00429497>

Submitted on 3 Nov 2009

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.

**UNIVERSITE PARIS XI
FACULTE DE MEDECINE PARIS-SUD**

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS XI

Spécialité : Signalisation Cellulaire, Neurosciences,
Endocrinologie et Reproduction

Présentée et soutenue publiquement

Par

Karine LOULIER

Le 22 décembre 2005

**ETUDE DE LA VOIE DE SIGNALISATION SONIC HEDGEHOG
ET DU CONTROLE DE LA PROLIFERATION CELLULAIRE
DANS LE CERVEAU MATURE DE RONGEURS**

Directeur de thèse : Mr le Dr Martial RUAT

JURY

Mr le Dr Hervé DANIEL
Mme le Dr Muriel PERRON
Mme le Dr Cathy SOULA
Mr le Dr Philippe GORRY
Mme le Dr Elisabeth TRAIFFORT

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Co-Directeur de Recherche

ARTICLES SCIENTIFIQUES LIES A LA THESE :

Coulombe J., Traiffort E., **Loulier K.**, Faure H., Ruat M. (2004). Hedgehog interacting protein in the mature brain : Membrane-associated and soluble forms. Molecular and Cellular Neuroscience 25: 323-333.

Loulier K., Ruat M., Traiffort E. (2005) Analysis of hedgehog interacting protein in the brain and its expression in nitric oxide synthase-positive cells. Neuroreport 16: 1959-62.

Loulier K., Ruat M., Traiffort E. Increase of proliferating oligodendroglial progenitors in the adult mouse brain upon Sonic Hedgehog delivery in the lateral ventricle (article en révision).

REMERCIEMENTS

Je remercie le Dr Martial Ruat de m'avoir offert la possibilité de travailler sur un sujet aussi passionnant que la voie de signalisation Hedgehog qui m'a permis à la fois d'allier ma modeste expérience et mon grand intérêt pour le Développement à l'étude des mécanismes moléculaires et fonctionnels des protéines encore présentes dans le système nerveux central adulte. Je lui suis aussi reconnaissante de m'avoir fait découvrir le monde de la recherche sous un jour plus pragmatique et de m'avoir permis de participer à un grand nombre de congrès internationaux, ce qui m'a ouvert les yeux sur la richesse du monde scientifique international actuel.

Merci aux Dr Cathy Soula et Dr Muriel Perron d'avoir accepté avec enthousiasme de s'atteler au fastidieux travail de rapporteurs. Leurs expertises de la voie Hedgehog au cours du développement respectivement chez le poulet et chez le xénope en font des guides et critiques d'autant plus précieuses. Je remercie aussi le Dr Hervé Daniel d'avoir accepté d'être Président de mon jury de thèse, avant même que ma soutenance puisse être envisagée à la date prévue. J'exprime aussi ma plus vive gratitude au Dr Philippe Gorry de bien vouloir me faire part de son expertise clinique en participant à mon jury en tant qu'examineur.

Mes quatre années passées au Laboratoire de Neurobiologie Cellulaire et Moléculaire m'ont permis de rencontrer beaucoup de personnalités aussi riches que diverses, qui m'ont aidées à plusieurs reprises... du soutien quotidien associé aux discussions passionnantes avec notre voisin d'en face Jean-Pierre Mothet à l'appui inestimable de notre fabuleux (quoique trop modeste !) directeur de laboratoire Gérard Baux, en passant par la joie de vivre communicative de Seana O'Reagan et ses précieux conseils lors de ma recherche de postdocs outre-Atlantique, sans oublier l'aide logistique de Martine, Nadine, Michèle, Brigitte, Dominique, Patricia, Rose et Bernadette, toujours amicales et souriantes. Je souhaite aussi remercier tous les étudiants du laboratoire (Estelle, Vincent, Julien, Gilles, Emmanuelle, Nicolas, Alexis, Stéphanie, Patricia, François, Magalie, Pierre, Emmanuel) tout d'abord de m'avoir subie en tant que représentante étudiante toujours avec bonne humeur et ensuite pour tous les conseils, discussions et moments plus légers que j'ai pu partager avec chacun d'entre eux. Merci à tous.

Je souhaite aussi remercier les chercheurs, étudiants et techniciens qui depuis le début de mes stages en laboratoire de recherche m'ont soutenue et surtout ont partagé avec moi leur passion de ce boulot qui finalement n'en est pas un. Je n'ai pas de mots assez forts pour leur exprimer ma reconnaissance et ma joie de les avoir côtoyés, en espérant avoir de nouveau le plaisir de travailler quotidiennement auprès et avec eux : Grand Merci à tous et en particulier à Patrick Carroll, Chris Henderson, Serge Alonso, Jean Livet.

Christelle, Elodie, Camille. Je ne vous ferais pas l'affront d'écrire noir sur blanc vos charmants petits surnoms, et pourtant ils ne pourraient que refléter l'ambiance chaleureuse et amicale qui nous a permis de former un petit groupe soudé, malgré parfois quelques rivalités et mauvaises journées dont je prends largement ma part de responsabilité. Sachez toutefois que je vous apprécie toutes les trois énormément et que je suis pleinement consciente de la chance que j'ai eu de

vous rencontrer et de vous avoir auprès de moi dans les bons comme dans les mauvais moments. Je vous souhaite toutes les meilleures choses au monde, professionnellement et personnellement. Merci à toutes les 3 d'avoir été là jour après jour.

A mon arrivée au sein de l'équipe du Dr Ruat, j'ai été merveilleusement accueillie, et depuis lors encouragée et soutenue par quatre personnes particulièrement chères à mon cœur : Christophe « mon collaborateur de paillasse/collègue de thèse » mais surtout mon ami et brillant chercheur actuellement en exil...mais pour le bien de la Recherche, j'en suis convaincue pour 2 !; Hélène, brillante ingénier de recherche, notre « maman » à tous, qui sait guider, aider, écouter et supporter chaque étudiant qui passe dans l'équipe (pour plus ou moins longtemps), Josée, que je n'ai pas eu la joie de côtoyer longtemps car elle est repartie pour son Canada natal quelques mois après mon arrivée en thèse mais dont les conseils et l'amitié ont rendu mes débuts de thèse plus légers, et enfin le Dr Elisabeth Traiffort. Elisabeth, je n'aurais pas assez de toutes les pages de cette thèse pour t'exprimer ma gratitude et l'infini respect que tu m'inspires personnellement et professionnellement. Travailler avec et auprès de toi a été l'une des plus riches expériences que j'ai eu la chance de vivre : ta rigueur scientifique, ton sérieux professionnel, ta passion communicative, ton soutien et ta compréhension quotidienne sont autant de modèles à suivre, c'est dire le chemin qu'il me reste encore à parcourir. Tu as su me guider et corriger mes erreurs. Merci de m'avoir dirigée et de t'être autant impliquée pour la réussite de cette thèse. Un immense merci à tous les 4.

Pour finir, je voudrais remercier mes amis et ma famille pour m'avoir aidée et soutenue, en particulier mes parents pour avoir toujours accepté mes choix aussi difficiles et peu compréhensibles pour des personnes non habituées aux us et coutumes du monde passionnant et international de la Recherche. Merci à chacun d'entre vous, papa, Danielle, Jean-François, et surtout toi maman, d'avoir été et d'être toujours là pour moi.

Pann, cette thèse, je te la dois et je te la dédie. Sans toi, j'aurais sans nul doute abandonnée devant les vicissitudes petites ou grandes liées notre passion commune. Ton soutien et ta foi en moi sont mes biens les plus précieux. Merci à toi d'exister et de continuer à croire à un avenir scientifique possible pour nous 2. *Trugarez. Me gar te.*

LISTE DES ABREVIATIONS

AEP	Anterior Entopeduncular area
Ara-C	cytosine- β -D-arabinofuranoside
BDNF	Brain Derived Neurotrophic Factor ou facteur neurotrophique dérivé du cerveau
BMP	Bone Morphogenetic Protein ou protéine morphogène de l'os
BrdU	5-Bromo-2'-deoxyuridine
CBC	Carcinome Basocellulaire
CCN	Cellules de la crête neurale
cGMP	cyclic guanylate monophosphate
CGR	cellules ganglionnaires rétinienne
CNTF	Ciliary Neurotrophic Factor ou facteur neurotrophique ciliaire
CSN	Cellule Souche Neurale
Ci	Cubitus interruptus (chez la drosophile)
Cos2	Costal-2
Dhh	Desert hedgehog
Disp	Dispatched
DTM	Domaine transmembranaire
E	jour embryonnaire
EGF	Epidermal Growth Factor ou facteur de croissance de l'épiderme
FGF	Fibroblast Growth Factor ou facteur de croissance des fibroblastes
Fu	Fused
GDNF	Glia Derived Neurotrophic Factor ou facteur neurotrophique dérivé des cellules gliales
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein ou protéine fibrillaire acide de la glie
Gli	facteur de transcription du glioblastome
Hh	Hedgehog
Hip	Hedgehog interacting protein
HPE	Holoprosencéphalie
IGF-1	Insulin-like Growth Factor ou facteur de croissance similaire à l'insuline
Ihh	Indian hedgehog
LDA	ligand-dependant antagonism ou antagonisme dépendant du ligand
LGE	Lateral ganglionic eminence ou éminence ganglionnaire latérale
LIA	ligand-independant antagonism ou antagonisme indépendant du ligand
LIF	Leukemia Inhibitory Factor ou facteur inhibiteur de leucémie

MGE	Medial ganglionic eminence ou éminence ganglionnaire médiane
myrShhN	forme myristoylée de ShhN
NO	Nitric oxide
nNOS	neuronal nitric oxide synthase
P	jour post-natal
PA	Phosphatase Alcaline
PKA	Protein kinase A
Ptc	Patched
RMS	Rostral Migratory Stream ou trajet rostral de migration
Shh	Sonic hedgehog
SLOS	Smith-Lemli-Opitz syndrome
Smo	Smoothened
SNC	système nerveux central
SNP	système nerveux périphérique
Su(Fu)	Suppresseur de Fused
TAP	Transient Amplifying progenitor
TGF β	Transforming Growth Factor β ou facteur de croissance transformant β
VL	ventricule latéral
Wnt-1	protéine homologue à wingless chez les vertébrés
ZSG	Zone sous granulaire
ZSV	Zone sous ventriculaire

TABLE DES ILLUSTRATIONS

INTRODUCTION

Figure 1 :	Schéma de la synthèse et de la maturation de Shh	3
Figure 2 :	Modèle simplifié de la voie de signalisation Shh chez les vertébrés	6
Figure 3 :	La structure protéique et schématique de Hip	9
Figure 4 :	Interactions entre les molécules de signalisation sécrétées et les activités répressives ou activatrices des facteurs de transcription Gli	13
Figure 5 :	Les inhibiteurs pharmacologiques de la voie Shh	17
Figure 6 :	Etapas de formation du tube neural	19
Figure 7 :	L'identité phénotypique des cellules du tube neural définit des domaines uniques pour les progéniteurs neuraux	21
Figure 8 :	Expression de Shh dans les régions dorsales du cerveau post-natal	23
Figure 9 :	Origine des précurseurs oligodendrocytaires dans le tube neural ventral	26
Figure 10 :	Guidage des axones commissuraux par Shh	32
Figure 11 :	Voie de signalisation Hedgehog et cancer	47
Figure 12 :	Modèle de différenciation des CSN dans la ZSV	52
Figure 13 :	Des interactions complexes régulent la transition neurone-glie dans le domaine pMN	59
Figure 14 :	La neurogenèse adulte dans la zone sous ventriculaire (ZSV)	63
Figure 15 :	La neurogenèse adulte dans la zone sous granulaire (ZSG) du gyrus denté de l'hippocampe	67
Tableau 1 :	Tableau récapitulatif des facteurs impliqués dans la régulation des cellules progénitrices de la ZSV et de la ZSG	71

DISCUSSION

Figure 16 :	Les distributions des transcrits de Shh, Ptc et Hip dans la moelle épinière embryonnaire de souris révèlent une expression de Hip à distance des sources de Shh et de Ptc	93
Figure 17 :	Modèle de régulation de la signalisation des morphogènes par le LDA	96
Figure 18 :	Le développement du lignage oligodendrocytaire	102

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION

I. <u>LA VOIE DE SIGNALISATION HEDGEHOG CHEZ LES MAMMIFERES</u>	
1. MECANISMES MOLECULAIRES DE LA VOIE HEDGEHOG	2
1.1. STRUCTURE ET SYNTHÈSE DES PROTÉINES HH	2
1.2. LES PROTÉINES RESPONSABLES DE LA SÉCRETION ET DU TRANSPORT DES PROTÉINES HH.....	4
1.3. LES PROTÉINES RECEPTRICES DU SIGNAL HH	5
1.3.1. <i>Patched</i>	5
1.3.2. <i>Smoothened</i>	7
1.3.3. <i>Hedgehog interacting protein</i>	8
1.4. TRANSDUCTION DU SIGNAL HH.....	10
1.4.1. <i>Interactions Ptc/Smo</i>	10
1.4.2. <i>Les protéines cytoplasmiques</i>	11
1.4.2.1. Les facteurs de transcription Ci et Gli	11
1.4.2.2. Les protéines kinases et kinésines.....	14
1.4.3. <i>Autres protéines régulatrices de la voie</i>	15
1.5. ANTAGONISTES PHYSIOLOGIQUES ET MODULATEURS PHARMACOLOGIQUES DE LA VOIE HH	15
1.5.1. <i>Les inhibiteurs physiologiques</i>	15
1.5.2. <i>Les modulateurs pharmacologiques de Smo</i>	16
2. LES ROLES BIOLOGIQUES DE LA VOIE SONIC HEDGEHOG	18
2.1.1. <i>Rôles physiologiques</i>	18
2.1.1.1. Le système nerveux central.....	18
2.1.1.2. La crête neurale et le système nerveux périphérique	34
2.1.1.3. Le système visuel	35
2.1.1.4. Les autres organes.....	35
2.1.2. <i>Implications pathologiques</i>	41
2.1.2.1. Malformations humaines congénitales.....	41
2.1.2.2. Cancers.....	44
II. <u>LES CELLULES SOUCHES NEURALES</u>	
1. AU COURS DU DEVELOPPEMENT	50
1.1. CSN : CELLULES SOUCHES OU PROGENITEURS NEURAUX ?	51
1.2. ORIGINE ET SPECIFICATION PRECOCE DES CELLULES SOUCHES NEURALES	53
1.2.1. <i>Origine des CSN</i>	53
1.2.2. <i>Spécification</i>	54
1.3. DEVENIR DES CELLULES SOUCHES.....	54
1.4. SPECIFICATION DU DESTIN CELLULAIRE	56
1.4.1. <i>Différenciation neuronale</i>	56
1.4.2. <i>Différenciation gliale</i>	57
1.4.3. <i>Différenciation oligodendrocytaire</i>	58
2. AU STADE ADULTE.....	61
2.1. CARACTERISATION DES ZONES DE NEUROGENESE ADULTE	62
2.1.1. <i>La zone sous ventriculaire du ventricule latéral</i>	62

2.1.1.1.	Caractérisation morphologique de la ZSV	64
2.1.1.2.	Identification des cellules souches de la ZSV	64
2.1.1.3.	Devenir des cellules souches nouvellement générées	66
2.1.2.	<i>La zone sous granulaire de l'hippocampe</i>	68
2.1.2.1.	Caractérisation morphologique de la ZSG	68
2.1.2.2.	Identification et devenir des cellules souches de la ZSG	68
2.2.	REGULATION DE LA NEUROGENESE ADULTE	69
2.2.1.	<i>Les facteurs de croissance</i>	69
2.2.1.1.	EGF et FGF-2	69
2.2.1.2.	CNTF et LIF	72
2.2.1.3.	TGF- α et BDNF	72
2.2.1.4.	IGF-1 et GDNF	73
2.2.2.	<i>Les morphogènes</i>	73
2.2.2.1.	BMP	73
2.2.2.2.	SHH	73

RESULTATS EXPERIMENTAUX

1.	ARTICLE 1	77
2.	ARTICLE 2	81
3.	ARTICLE 3	84

DISCUSSION

1.	CARACTERISATION <i>IN VITRO</i> ET <i>IN VIVO</i> DE HIP	90
1.1.	DISTRIBUTION DE HIP DANS LE TELENCEPHALE	90
1.1.1.	<i>Hip et le maintien des progéniteurs des interneurons corticaux</i>	91
1.1.2.	<i>Hip et l'oligodendrogenèse</i>	92
1.2.	EXPRESSION DE HIP DANS LA MOELLE EPINIÈRE	92
1.3.	MECANISMES D'INHIBITION DE LA VOIE SHH PAR HIP	95
1.4.	HIP ET NO	97
2.	LA VOIE SHH DANS LE CONTROLE DE LA REGULATION DES PROGENITEURS CEREBRAUX DE SOURIS ADULTES	98
2.1.	SHH EXOGENE ET PROLIFERATION CELLULAIRE DANS LE CERVEAU MATURE	99
2.1.1.	<i>Prolifération cellulaire et considérations techniques</i>	99
2.1.2.	<i>Rôle prolifératif différentiel selon les régions cérébrales</i>	100
2.2.	LES CELLULES CIBLES DE SHH	101
2.2.1.	<i>Les cellules NG2</i>	101
2.2.2.	<i>Les cellules plp/dm-20</i>	104
2.2.3.	<i>Shh et le lignage oligodendrocytaire</i>	105
2.2.4.	<i>Origine des progéniteurs oligodendrocytaires</i>	106
2.3.	SHH ET PROCESSUS DE DEMYELINISATION/REMYELINISATION	108

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

INTRODUCTION

INTRODUCTION

De tous les gènes découverts à partir de criblages génétiques réalisés chez la drosophile, probablement aucun n'a été montré impliqué dans autant de processus fondamentaux que l'homologue chez les vertébrés du gène de polarité segmentaire : *Hedgehog* (Hh). Hh a été identifié pour la première fois lors d'un criblage de mutations interrompant le patron des larves de drosophiles (Nusslein-Volhard et al., 1980). De nombreux arguments génétiques ont fortement suggéré que la protéine Hh pouvait agir comme un signal intercellulaire (Ingham et al., 1991 ; Mohler, 1988), ce qui fut confirmé par la suite lors du clonage du gène (Lee et al., 1992 ; Mohler et al., 1992 ; Takata et al., 1992 ; Tashiro et al., 1993). Rapidement, les orthologues de Hh ont été isolés chez le poulet, la souris, la grenouille, le poisson-zèbre et l'Homme (Chang et al., 1994 ; Echelard et al., 1993 ; Ekker et al., 1995a ; Ekker et al., 1995b ; Krauss et al., 1993 ; Marigo et al., 1995 ; Riddle et al., 1993 ; Roelink et al., 1994), puis plus récemment chez le criquet (Inoue et al., 2002) et l'amphioxus (Shimeld, 1999).

Depuis sa découverte, de nombreuses études ont établi l'importance de la signalisation Hh, et plus particulièrement de la voie Sonic Hedgehog (Shh), l'un des orthologues de Hh chez les mammifères, au sein d'une très large variété de fonctions régulatrices au cours du développement embryonnaire, mais aussi dans des pathologies humaines telles que des malformations congénitales et des tumeurs (pour revue, McMahon et al., 2003). Par ailleurs, avant que ne débute mon travail de thèse, plusieurs publications issues de notre groupe avaient décrit l'expression de la voie de signalisation Hh dans le cerveau mature (Traiffort et al., 1998 ; Traiffort et al., 1999), démontré le transport axonal de la protéine Shh (Traiffort et al., 2001) et mis en évidence l'activation de cette voie après administration intrastriatale de la protéine Shh recombinante, notamment dans une aire de neurogenèse persistant chez l'adulte : la zone sous ventriculaire (ZSV) des ventricules latéraux (Charytoniuk et al., 2002b). Mon projet de thèse avait donc comme objectif principal de déterminer si et comment la voie Shh pourrait être impliquée dans le fonctionnement et le devenir d'un type

cellulaire retrouvé à la fois chez l'embryon et chez l'adulte : les cellules souches neurales. Le second objectif de ce projet était d'approfondir la caractérisation de Hip, une protéine réceptrice des protéines Hh récemment caractérisée comme un antagoniste physiologique de ces dernières chez l'embryon (Chuang et al., 1999).

L'introduction de ce manuscrit sera donc divisée en deux parties. La première s'attachera à faire le point sur l'état des connaissances concernant la voie de signalisation Hh chez les mammifères, depuis la caractérisation de ses mécanismes moléculaires jusqu'à la description de ses principaux rôles biologiques. La seconde partie décrira les principales données actuelles sur les cellules souches neurales et leurs mécanismes de régulation.

I. LA VOIE DE SIGNALISATION HEDGEHOG CHEZ LES MAMMIFERES

1. Mécanismes moléculaires de la voie Hedgehog

1.1. Structure et synthèse des protéines Hh

Contrairement à la drosophile chez laquelle un seul gène Hh a été isolé, trois gènes distincts ont été isolés chez les mammifères : Shh, Indian Hedgehog (Ihh) et Desert Hedgehog (Dhh). Les protéines de la famille Hh sont synthétisées sous la forme d'un précurseur d'environ 45 kDa qui subit un clivage intramoléculaire catalysé par la partie carboxy-terminale du précurseur (Lee et al., 1994 ; Porter et al., 1995). Cette réaction libère deux polypeptides : l'un carboxy-terminal (Hh-C) de 25 kDa et l'autre amino-terminal d'environ 20 kDa (Hh-N) (Figure 1) (Porter et al., 1996). L'autoprotéolyse du précurseur passe par la formation d'un intermédiaire thioester qui va subir une attaque nucléophile de la part d'une molécule de cholestérol, ce qui engendre la formation d'une liaison covalente entre cette molécule et la partie carboxy-terminale du peptide Hh-N. La protéine Hh-N ainsi modifiée est alors soumise à une seconde modification lipidique : l'introduction d'un acide gras sur la cystéine amino-terminale (Figure 1) (Pepinsky et al., 1998). Cette dernière

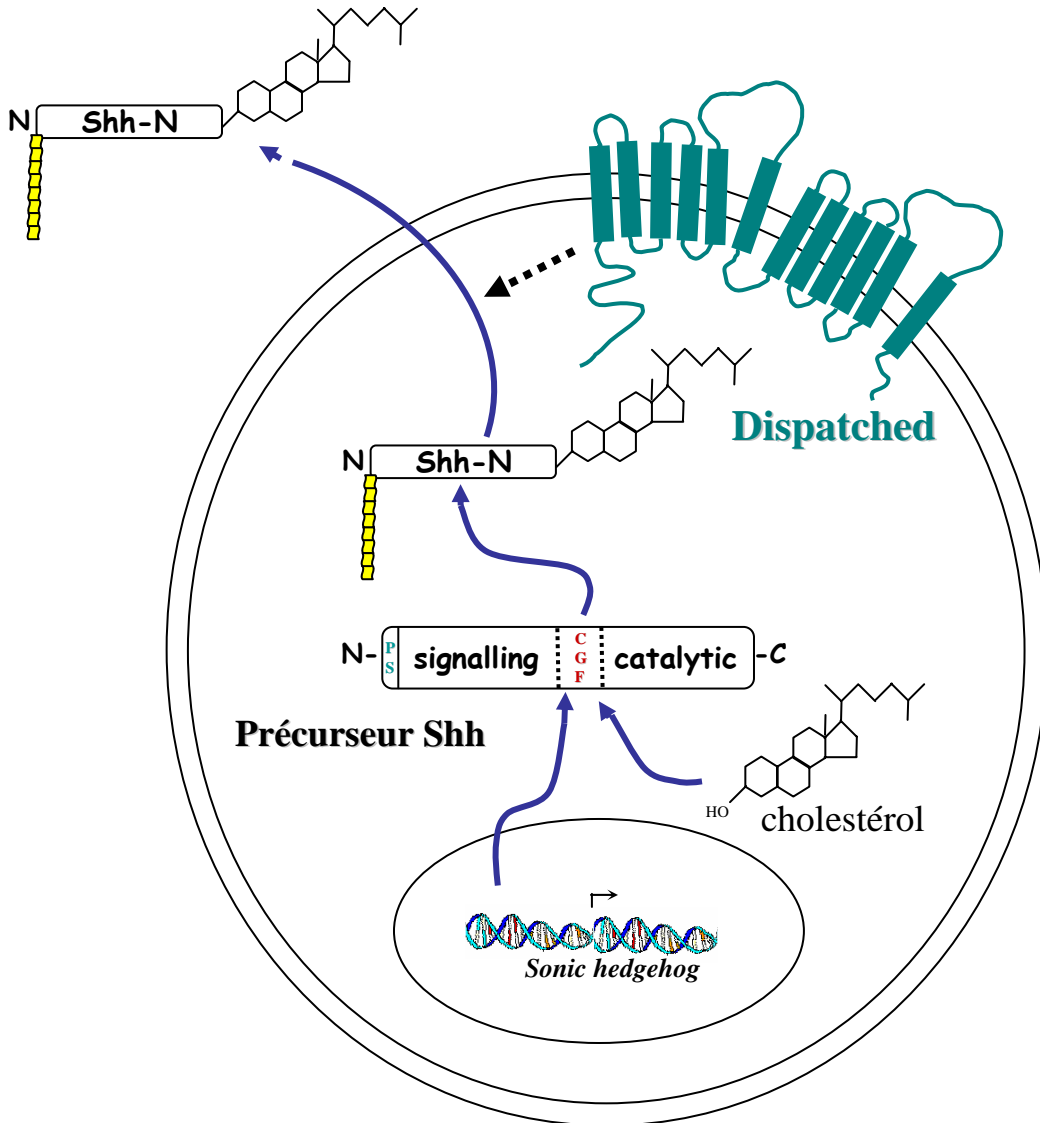


Figure 1 : Schéma de la synthèse et de la maturation de Shh. Outre le clivage du peptide signal (PS), la protéine Shh subit un clivage autoprotéolytique au niveau d'un motif Gly/Cys/Phe (GSF), qui génère le peptide amino-terminal (Shh-N). Le clivage de Shh passe par la formation d'un thioester consécutif au réarrangement interne de la liaison peptidique unissant les résidus Gly et Cys. Ce thioester est ensuite clivé via une substitution nucléophile mettant en jeu une molécule de cholestérol, qui reste attachée à l'extrémité C-terminale du peptide Shh-N. Le peptide Shh-N est palmitoylé sur l'extrémité N-terminale. La libération du peptide Shh-N à l'extérieur des cellules qui le produisent dépend de l'activité de Dispatched qui présente une homologie de séquence avec Patched, le principal récepteur de Shh sur les cellules cibles de la voie.

modification met en jeu une acyltransférase, *skinny hedgehog*, mise en évidence par Chamoun et collaborateurs à partir des études génétiques et biochimiques du mutant *ski(-/-)* qui ont révélé l'incapacité de ce mutant à ajouter un groupement palmitate amino-terminal (Chamoun et al., 2001). Alors que la molécule de cholestérol permet l'ancrage de Hh-N à la surface de la cellule, l'acide gras augmente son activité biologique. Hh-N ainsi modifiée est responsable de la totalité des activités signalisatrices identifiées pour les protéines Hh (pour revue, Ingham et al., 2001).

1.2. Les protéines responsables de la sécrétion et du transport des protéines Hh

La libération des protéines Hh par les cellules qui les produisent dépend de l'activité de Dispatched (Disp), qui a été identifiée initialement chez la drosophile et possède une homologie de séquence avec Patched, le principal récepteur des protéines Hh, notamment au niveau de leurs 12 domaines transmembranaires et de leur domaine dit « sensible aux stérols » (SSD ou Sterol Sensing Domain) (Burke et al., 1999). Deux orthologues, Disp1 et Disp2, ont été isolés chez la souris, mais seul Disp1 semble être impliqué (comme Disp chez la drosophile) dans la signalisation des protéines Hh-N modifiées par le cholestérol, selon un mécanisme encore méconnu (Tian et al., 2005).

Le mouvement des protéines Hh-N d'une cellule à l'autre dépend également de l'activité de *tout velu*, un orthologue chez la drosophile des gènes EXT impliqués dans l'apparition d'exostoses multiples chez l'Homme (Bellaïche et al., 1998). *Tout-velu* code pour une glycosaminoglycane transférase nécessaire pour la biosynthèse des héparanes sulfates protéoglycanes. Le mécanisme reliant la synthèse de ces molécules capables de lier et de moduler l'activité des composés de la matrice extracellulaire et le mouvement des protéines Hh-N reste là encore à être élucidé (Bellaïche et al., 1998 ; The et al., 1999 ; Gallet et al., 2003). Par ailleurs, Glise et collaborateurs ont caractérisé un modulateur extracellulaire de la voie Hh, Shifted, une protéine sécrétée orthologue chez la drosophile du facteur-1 inhibiteur des Wnt (WIF-1) des vertébrés. Shifted agit à longue

distance et est requise pour l'accumulation des protéines Hh et leurs mouvements dans l'aile, vraisemblablement en stabilisant les interactions entre les protéines Hh et les héparanes sulfates (Glise et al., 2005).

Enfin, récemment, la diffusion du morphogène actif à partir de la cellule productrice a été associée à la mise en évidence *in vitro* d'une forme multimérique soluble de Shh-N permettant de masquer les groupements lipidiques de chaque unité monomérique et d'accroître la solubilité de l'ensemble (Zeng et al., 2001).

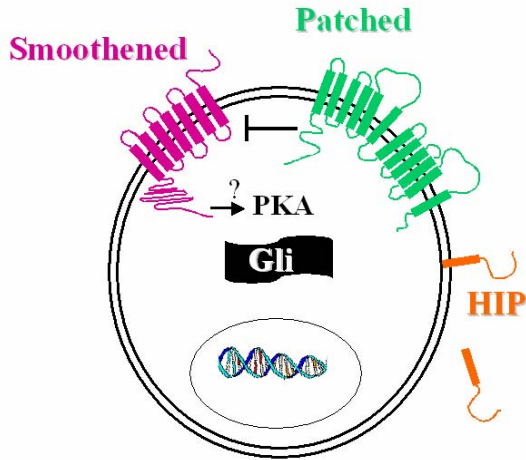
1.3. Les protéines réceptrices du signal Hh

1.3.1. Patched

Le récepteur des protéines Hh, Patched (Ptc), initialement identifié chez la drosophile (Ingham et al., 1991), est une protéine d'environ 145 kDa qui comprendrait douze segments transmembranaires (DTM), des extrémités amino- et carboxy- terminales intracellulaires et deux larges boucles hydrophiles extracellulaires reliant les DTM 1 et 2 d'une part, 7 et 8 d'autre part (Figure 2). Ptc comprend aussi un domaine SSD, comme Disp, correspondant aux DTM 2 à 6. Toutefois, la mutation de ce domaine SSD ne semble affecter ni la liaison, ni l'internalisation des protéines Hh (Martin et al., 2001 ; Strutt et al., 2001). Le domaine de liaison de Ptc aux protéines Hh se situe au niveau de la seconde boucle extracellulaire (Briscoe et al., 2001a). Des mutations ponctuelles réalisées sur Shh ont permis de mettre en évidence que de nombreux acides aminés sont impliqués dans la liaison Shh-Ptc, suggérant une large surface d'interaction entre les deux protéines (Fuse et al., 1999 ; Pepinsky et al., 2000). Ptc est l'une des principales cibles transcriptionnelles de la signalisation Hh, puisque son expression est induite lors de l'activation de la voie.

Il existe deux homologues chez les vertébrés, Ptc1 et Ptc2. Ptc2 présente 40 à 50% d'homologie avec Ptc1. Chez l'Homme, la protéine PTCH orthologue de celle de drosophile a été identifiée (Hahn et al., 1996a ; Hahn et al., 1996b ; Johnson et al., 1996) et les gènes *PTCH1* et

A *En absence de Shh*



B *En présence de Shh*

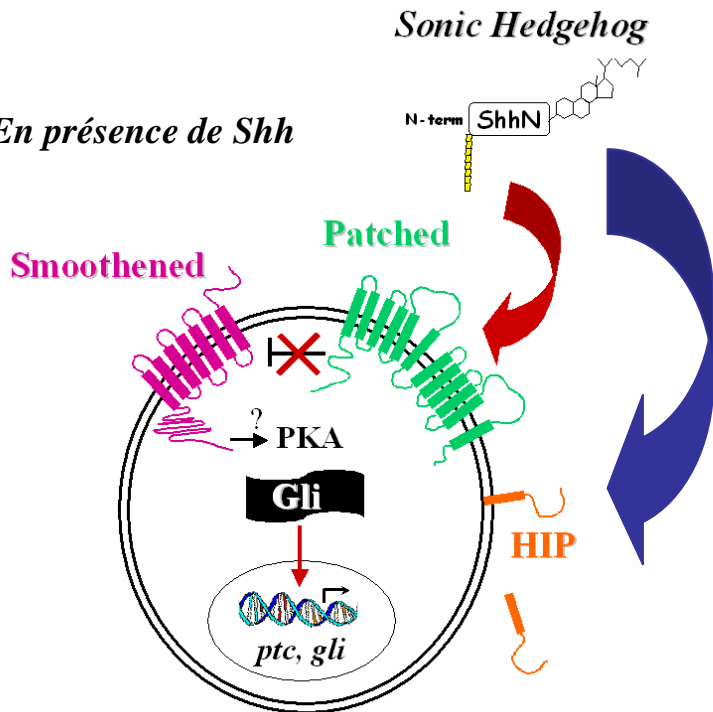


Figure 2 : Modèle simplifié de la voie de signalisation Shh chez les vertébrés.

(A) En absence de Shh, Patched (Ptc), une protéine présentant 12 domaines transmembranaires (DTM) réprime l'activité de Smoothened (Smo), un récepteur à 7 DTM. Une forme répressive de Gli est ainsi libérée après la phosphorylation de la protéine kinase A (PKA), et déplacée vers le noyau, où elle inhibe les gènes cibles. (B) La réception du signal Shh (flèche rouge) par Ptc lève l'effet inhibiteur exercé par Ptc sur Smo. L'activation d'un complexe macromoléculaire (détaillé dans le texte) conduit à la production de la forme activatrice de Gli qui induit les gènes cibles parmi lesquels Ptc et Gli1. Le signal Shh sur la cellule cible est inhibé lorsque Shh se lie à Hip (flèche bleue).

PTCH2 sont localisés sur les chromosomes 9 (9q22-3) et 1 (1p32.1-32.3). *Ptc1* joue un rôle équivalent à celui de la protéine *Ptc* de drosophile alors que la fonction exacte *Ptc2*, qui est aussi un récepteur de *Shh* mais avec une localisation limitée, reste encore à être précisée. Les souris mutantes *Ptc(-/-)* meurent entre le neuvième et le dixième jour embryonnaire à cause de nombreuses malformations touchant le tube neural, le cœur et d'autres tissus (Goodrich et al., 1997). Les souris hétérozygotes *Ptc(+/-)* quant à elles sont viables mais de taille légèrement supérieure à celle des souris sauvages. Ces souris hétérozygotes développent des tumeurs du cervelet de type médulloblastomes dans 10 à 20% des cas, ainsi qu'une hypersensibilité aux ultraviolets (UV) et aux radiations ionisantes. L'analyse de ces mutants a permis une meilleure compréhension de la voie *Hh* et de son implication dans de nombreuses malformations congénitales, telles que le syndrome de Gorlin (voir paragraphe I.2.1.2.1 « malformations congénitales »).

1.3.2. Smoothened

Smoothened (*Smo*) est une protéine à 7 DTM, appartenant vraisemblablement à la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) (Akiyama et al., 1997 ; Stone et al., 1996 ; van den Heuvel et al., 1996), dont il n'existe qu'un homologue chez les vertébrés. La protéine *Smo* ne lie pas directement les protéines *Hh* (Stone et al., 1996), mais est responsable de la transmission du signal *Hh* à l'intérieur de la cellule réceptrice (Figure 2). Comme nous le verrons par la suite plus en détails, *Smo* est constitutivement inhibé par *Ptc* en l'absence de protéines *Hh* et lorsque *Hh* se lie à *Ptc*, l'inhibition est levée. Cette activité nécessite pour *Smo* l'intégrité de sa troisième boucle intracellulaire et du DTM 7, qui sont des régions généralement impliquées dans le couplage des GPCR aux protéines G (Bockaert et al., 1999 ; Murone et al., 1999). Aucun ligand naturel n'a été identifié jusqu'à présent pour *Smo*, mais deux mutations activatrices situées dans le DTM 7 de la protéine ont été identifiées au sein d'une forme sporadique de carcinome basocellulaire (Xie et al., 1998) mais aussi de médulloblastomes (Reifenberger et al., 1998). Bien que capable d'interagir avec *Ptc*, la protéine mutée n'est pas sensible à son action inhibitrice,

probablement en raison du blocage de Smo dans une conformation active (Murone et al., 1999). Les souris mutantes *Smo*(-/-) meurent aux alentours du neuvième jour, à la suite de multiples malformations semblables aux souris mutantes *Shh*(-/-), qui comprennent notamment un arrêt de leur développement au stade des somites ainsi qu'un intestin ouvert et une cyclopie embryonnaire (Zhang et al., 2001a).

1.3.3. Hedgehog interacting protein

La protéine Hip (Hedgehog Interacting Protein) a été isolée à partir d'un criblage biochimique de banque d'ADN complémentaire de souris réalisé à l'aide d'une protéine de fusion couplant ShhN à la phosphatase alcaline afin d'isoler les protéines capables de lier ShhN (Chuang et al., 1999). Hip a été caractérisé chez l'embryon de souris comme une glycoprotéine membranaire de type I, comprenant une longue partie extracytoplasmique et deux domaines de type EGF (Epidermal Growth Factor) proches de l'extrémité carboxy-terminale. Les quinze premiers acides aminés de la protéine constituent un domaine hydrophobe, rappelant un peptide signal et les vingt-deux derniers acides aminés sont considérés former un DTM (Figure 3). Hip est capable de lier Shh avec une affinité comparable à celle décrite entre Shh et son principal récepteur Ptc, et constitue donc un second récepteur de Shh (Chuang et al., 1999). Le gène *HIP* humain est constitué de treize exons localisés sur le chromosome 4 (q31.21--> q31.3), codant pour une protéine HHIP de 700 acides aminés, homologue à 94% avec la protéine Hip de souris (Bak et al., 2001). Aucun orthologue Hip n'a été identifié chez la drosophile.

Comme Ptc, Hip a été proposé comme gène cible de la signalisation Hh, puisque sa transcription est induite par l'activation de la voie. Les études de surexpression et de perte de fonction chez la souris ont révélé que Hip est un antagoniste direct des protéines Hh car en se liant à ces protéines, Hip empêche leur interaction avec Ptc et par conséquent la transmission du signal à l'intérieur de la cellule cible (Chuang et al., 1999 ; Treier et al., 2001 ; Chuang et al., 2003). Les

A

MLKMLSFKLL	LLAVALGFFE	GDAKFGERSE	GSGARRRRCL	NGNPPKRLKR	50
RDRRVMSQLE	LLSGGEILCG	GFYPRVSCCL	QSDSPGLGRL	ENKIFSATNN	100
SECSRLLEEI	QCAPCSPHSQ	SLFYTPERDV	LDGDALPLL	CKDYCKEFFFY	150
TCRGHIPGLL	QTTADEFCFY	YARKDAGLCF	PDFPRKQVRG	PASNYLGQME	200
DYEKVGGISR	KHKHNCLCVQ	EVMSGLRQPV	SAVHSGDGSH	RLFILEKEGY	250
VKILTPEGEL	FKEPYLDIHK	LVQSGIKGGD	BRGLLSLAFH	PNYKKNKLY	300
VSYTTNQERW	AIGPHDHILR	VVEYTVSRKN	PHQVDVRTAR	VFLEVAELHR	350
KHLGGQLLFG	PDGFLYIILG	DGMITLDDME	BMDGLSDFTG	SVLRLDVDTD	400
MCNVPYSIPR	SNPHFNSTNQ	PPEVFAHGLH	DPGRCAVDRH	PTDINI \overline{N} LT \overline{I}	450
LCSDSNGK \overline{NR}	SSARILQIIK	GRDYESEPSL	LEFKPFSNGP	LVGGFVYRGC	500
QSERLYGSYV	FGDRNGNFLT	LQOSPVTQW	QEKPLCLGAS	SSCRGYFSGH	550
ILGFGEDELG	EVYILSSSKS	MTQTHNGKLY	KIVDPKRPLM	PEECRVTVQP	600
AQPLTSD	CSR	LCRNGYYTPT	GKCCCSPGWE	GDFCRIAKCE	650
RPNKCLCKKG	YLGPQCB	QVD	RNVRRVTRAG	ILDQIIDMTS	700
				YLLDLTSYIV	

B

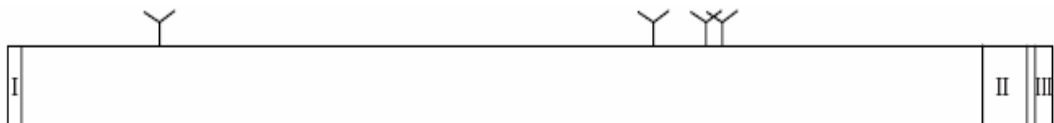


Figure 3 : La structure protéique et schématique de Hip. (A) séquence protéique de la protéine Hip de souris. Les boucles hydrophobes aux parties N- et C-terminales sont soulignées, les deux domaines de type EGF sont encadrés et les quatre sites potentiels de glycosylation sont surlignés. (B) Schéma représentant la structure de la protéine Hip. I, boucle hydrophobe N-terminale; II, domaines de type EGF; III, boucle hydrophobe à l'extrémité C-terminale. Les quatre sites potentiels de glycosylation sont représentés par des « Y » (d'après Chuang et McMahon, 1999).

embryons de souris Hip(-/-) meurent très tôt après la naissance, suite à une défaillance pulmonaire résultant d'une signalisation Hh hyperactive (Chuang et al., 1999; Chuang et al., 2003). Cependant, l'absence d'anomalies des membres, de la tête ou de la moelle épinière chez les souris mutantes Hip(-/-), suggère que le défaut d'activité de la protéine Hip est compensé par un autre mécanisme vraisemblablement lié à l'activité de Ptc. Très récemment, l'analyse des embryons de souris invalidées à la fois pour Ptc et Hip a permis de mettre en évidence de très sévères défauts morphogénétiques et de montrer que le rétrocontrôle de l'action des morphogènes Hh est exercé conjointement par Ptc et Hip dans plusieurs tissus (Jeong et al., 2005). Cette double activité apparaît cruciale pour générer le nombre et le type de cellules ventrales et intermédiaires dès les étapes les plus précoces du développement du tube neural (Jeong et al., 2005).

1.4. Transduction du signal Hh

1.4.1. Interactions Ptc/Smo

Bien que de nombreuses études, en particulier génétiques chez la drosophile, aient démontré l'importance des deux protéines transmembranaires Ptc et Smo pour la transmission du signal Hh, le mécanisme moléculaire par lequel Ptc inhibe Smo en l'absence de Hh est encore loin d'être parfaitement élucidé (Kalderon, 2000). Il existe deux principales hypothèses concernant la nature de l'interaction Ptc/Smo. La première met en jeu une interaction physique entre les deux protéines, où une molécule de Ptc lierait physiquement une molécule de Smo, c'est le « modèle du récepteur hétérodimérique ». La seconde hypothèse, ou « modèle catalytique » suggère que Ptc agit catalytiquement sur Smo, de manière directe ou indirecte. De nombreux travaux ont apporté des éléments en faveur de ces deux hypothèses sans toutefois permettre de valider l'un des deux modèles (pour revues, Kalderon, 2000 ; Ingham et al., 2001). Ce sont les travaux de Taipale et collaborateurs qui ont permis, en 2002, de mieux comprendre la nature du récepteur Ptc et son action sur Smo à l'aide de mutations ponctuelles dans les différents domaines de la protéine Ptc et

d'études stoechiométriques entre Ptc et Smo. Ces dernières données montrent que Ptc ne s'associe pas physiquement à Smo et que des quantités sous-stoechiométriques de Ptc sont suffisantes pour réguler Smo par un mécanisme faisant vraisemblablement intervenir l'activité de transporteur membranaire de Ptc (Taipale et al., 2002). En effet, la structure protéique de Ptc présente de nombreuses similitudes avec les transporteurs membranaires bactériens de la famille RND (Resistance Nodulation Division) notamment une séquence en acides aminés GxxxD située à la moitié du DTM 4, conservée dans cette famille et nécessaire à l'activité de transport (Taipale et al., 2002). S'il est à présent admis que Ptc agirait de manière catalytique pour inhiber l'activité de Smo, il reste encore à identifier les molécules mises en jeu lors de l'activité de Ptc en tant que transporteur membranaire (Lum et al., 2004).

1.4.2. Les protéines cytoplasmiques

1.4.2.1. Les facteurs de transcription Ci et Gli

La liaison du ligand Hh sur son récepteur Ptc engendre l'activation de Smo qui à son tour va activer les facteurs de transcription à doigts de zinc cubitus interruptus (Ci) chez la drosophile et leurs orthologues chez les mammifères, les facteurs Gli.

Des études génétiques ont identifié très tôt l'implication de la protéine Ci dans la transmission de l'activité transcriptionnelle de la signalisation Hh (Forbes et al., 1993), mais les mécanismes moléculaires mis en jeu, du fait de leur complexité, ne sont pas encore totalement décryptés. Ci sous sa forme complète de 155 kDa (Ci155) constitue l'activateur transcriptionnel direct des gènes cibles de la voie Hh, tels que *decapentaplegic (dpp)* et *ptc*. A l'inverse, son clivage protéolytique résultant d'une suite de phosphorylations complexes aboutit à la libération d'une forme répressive de 75 kDa (Ci75) (Aza-Blanc et al., 1997 ; Aza-Blanc et al., 1999). Ainsi, chez la drosophile, les effets des protéines Hh sur l'expression des gènes dans la cellule cible requièrent l'inhibition de production de la forme Ci75, et la translocation nucléaire de Ci155 (Methot et al., 2001).

Chez les mammifères, ce sont les trois gènes Gli1, Gli2 et Gli3 qui se partagent les rôles des formes active et répressive de Ci chez la drosophile. Le premier membre de la famille Gli a été isolé à partir d'un gliome (Kinzler et al., 1987) et identifié comme oncogène (Dahmane et al., 1997 ; Ruppert et al., 1991). Cette famille de gènes a été décrite dans plusieurs espèces de vertébrés (Hui et al., 1994 ; Marigo et al., 1996a). Il s'agit de protéines de plus de 1500 acides aminés se fixant sur des séquences spécifiques de l'ADN par l'intermédiaire de leur domaine à doigts de zinc et qui interviennent dans le développement de nombreux organes (pour revue, Ruiz i Altaba, 1999). Les protéines Gli se révèlent être des régulateurs transcriptionnels bipotentiels, exerçant un contrôle à la fois positif et négatif sur l'expression des gènes cibles de la voie Shh. De plus, Gli1 et Gli3 se trouvent être eux-mêmes des cibles transcriptionnelles de la signalisation Hh : Gli1 est activé et Gli3 réprimé en réponse aux signaux Hh (Marigo et al., 1996a ; Lee et al., 1997) (Figure 4). Chez la souris plusieurs équipes ont montré que l'interaction des trois protéines Gli entre elles est fonction du contexte tissulaire où elles s'expriment : Gli1 et Gli2 dans le diencéphale (Park et al., 2000), Gli2 et Gli3 dans le squelette (Mo et al., 1997), Gli1, Gli2 et Gli3 dans le poumon (Motoyama et al., 1998 ; Park et al., 2000), Gli2 et Gli3 dans la dent (Hardcastle et al., 1998). Afin de caractériser les mécanismes de régulation des protéines Gli et leur contribution relative à la transmission des signaux Hh, chaque protéine Gli a été exprimée chez la drosophile (von Mering et al., 1999 ; Aza-Blanc et al., 2000). L'intérêt de ce système, pourtant hétérologue, est de pouvoir contrôler rigoureusement (à un degré impossible chez les vertébrés) les activités de chaque protéine, ce qui a permis de proposer que (i) Gli1 et Gli2 sont des activateurs dépendant de Hh, (ii) Gli2 est aussi un répresseur indépendant de Hh, (iii) Gli3 est un répresseur dépendant de Hh, et (iv) comme dans le cas de Ci, le clivage protéolytique de Gli2 et Gli3 génère des formes répressives pour chaque protéine. Un avantage de l'élaboration de ces patrons d'activités complexes serait une régulation plus fine du signal transmis par les protéines Hh, en fonction non seulement de la concentration du ligand mais aussi du répertoire spécifique des gènes Gli exprimés par chaque tissu (pour revues, Ingham et al., 2001 ; Briscoe et al., 2005).

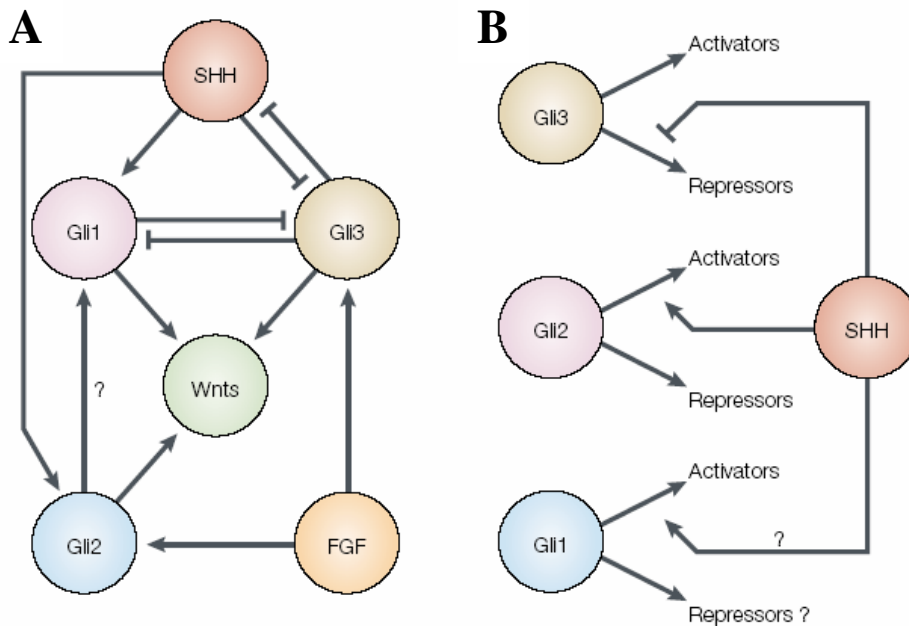


Figure 4 : Interactions entre les molécules de signalisation sécrétées et les activités répressives ou activatrices des facteurs de transcription Gli. (A) SHH peut induire la transcription de *Gli1* et *Gli2*, alors qu'il réprime *Gli3*. Gli2 pourrait transmettre l'induction de Gli1 par Shh. La signalisation du fibroblast growth factor (FGF) peut induire la transcription de *Gli2* et *Gli3*, et les trois protéines Gli peuvent induire la transcription de Wnt. Gli1/SHH et Gli3 s'antagonisent les uns les autres. (B) SHH affecte le choix de la fonction Gli répressive ou activatrice. La signalisation SHH peut réprimer la formation des répresseurs Gli3, et influence la formation des activateurs Gli2 et Gli1 (d'après Ruiz i Altaba et al, 2002).

1.4.2.2. Les protéines kinases et kinésines

L'apparition de la forme répressive Ci75 nécessite la phosphorylation des résidus sérine et thréonine de la protéine Ci par la protéine kinase dépendante de l'adénosine mono-phosphate cyclique (PKA) (Chen et al., 1998 ; Chen et al., 1999). Ci est ensuite phosphorylée par la « glycogen synthase kinase 3 β » (GSK 3 β , Price et al., 2002 ; Jia et al., 2002) et un membre de la famille des kinases CK1 (Price et al., 2002 ; Lum et al., 2003a). La forme phosphorylée de Ci ainsi obtenue subit ensuite une protéolyse par le protéasome et par Slimb, une boîte F contenant l'ubiquitine E3 ligase (Theodosiou et al., 1998 ; Jiang et al., 1998). L'activation de la voie Hh bloque la formation de Ci75, en particulier en inhibant la PKA, et engendre une stabilisation de la forme activatrice Ci155 associée à une augmentation de sa translocation dans le noyau (Aza-Blanc et al., 1997 ; Chen et al., 1999), ce qui permet d'activer la transcription des gènes cibles de la voie, comme *ptc* (Lum et al., 2004).

Aucune de ces kinases (PKA, GSK 3 β et CK1), ni le protéasome, ni Slimb ne sont strictement spécifiques de la voie de signalisation Hh. Leur participation à la transformation de Ci résulte de l'implication de la protéine Costal-2 (Cos2), homologue des kinésines (Robbins et al., 1997 ; Sisson et al., 1997 ; Lum et al., 2003b). Quand la cellule cible reçoit le signal Hh, Cos2 est recrutée par l'extrémité carboxy-terminale de Smo, ce qui empêche Cos2 d'intervenir dans la formation de la forme Ci75, mais lui permet d'induire l'ancrage de Ci155 aux microtubules et de favoriser sa translocation nucléaire (Hooper, 2003 ; Jia et al., 2003). Les orthologues de Cos2 chez les mammifères sont les membres de la famille KIF, en particulier Kif27, qui comme Cos2 contiennent un domaine de kinésine moteur moléculaire dépendant des microtubules (Kinesin motor domain ou KIS) (Katoh et al., 2004). Cos2 est aussi requise pour la stabilité de la sérine-thréonine kinase Fused (Fu) nécessaire à l'inactivation, vraisemblablement par phosphorylation directe, de Suppresseur de Fused (Su(Fu)) qui exerce un effet inhibiteur sur la forme active de Ci (Lum et al., 2003b ; Methot et al., 2000).

Chez les mammifères, les protéines Fu et Su(Fu) semblent exercer des rôles semblables à ceux identifiés chez la drosophile. Ainsi l'orthologue de Su(Fu) chez les vertébrés est capable d'interagir avec les protéines Gli, notamment en inhibant leur importation nucléaire et/ou en recrutant des corépresseurs de ces protéines (Dunaeva et al., 2003). Alors que Cos2 est un médiateur cytoplasmique essentiel chez la drosophile, Fu et Su(Fu) sont des intervenants majeurs de la signalisation Hh chez les vertébrés (pour revue, Briscoe et al., 2005).

1.4.3. Autres protéines régulatrices de la voie

D'autres protéines ont été impliquées depuis peu dans la régulation du transport intracellulaire des protéines Hh à l'intérieur des cellules cibles. Ainsi la mégaline (gp330/LRP-2), qui est un membre de la famille des récepteurs aux lipoprotéines de faible densité (low-density lipoprotein ou LDL) impliqué dans l'endocytose de plusieurs ligands (Barth et al., 2001), est capable de lier le fragment amino-terminal de Shh (ShhN) et de favoriser son endocytose *in vitro* (McCarthy et al., 2002). Par ailleurs, le gène *open-brain* chez la souris (Gunther et al., 1994) code pour RAB23, une protéine de transport vésiculaire appartenant à la superfamille des petites GTPases Rab. RAB23 serait impliquée dans l'inhibition intracellulaire de la protéine Shh (Eggenschwiler et al., 2001).

1.5. Antagonistes physiologiques et modulateurs pharmacologiques de la voie Hh

1.5.1. Les inhibiteurs physiologiques

A côté de la protéine Hip (voir paragraphe I.1.3.3), plusieurs autres antagonistes de la voie Hh ont été identifiés chez les mammifères, en particulier grâce à la technique d'électroporation chez le poulet et aux souris invalidées génétiquement. Ainsi, la protéine codée par le gène *growth arrest specific-1* (Gas1), appartient à la famille des glycoprotéines liées à la membrane par une ancre

glycosylphosphatidylinositol (ou GPI). Exprimée dans le somite dorsal et induite par les protéines Wnt, GAS1 peut lier Shh et inhiber sa réponse sur les cellules présomitiques (Lee et al., 2001). Depuis, la protéine GAS1 a été montrée exprimée par les mésenchymes palatin (Rice et al., 2005) et de l'arc mandibulaire (Cobourne et al., 2004) suggérant une intervention de GAS1 dans la régulation de la voie Shh sur le développement du palais et des dents.

L'étude de la fonction *in vivo* de la protéine codée par le gène FKBP8 à l'aide d'une souris invalidée pour ce gène a révélé que la perte de fonction de FKBP8 engendrait une activation inappropriée de la voie de signalisation Shh dans le tube neural caudal où la ventralisation s'étend de manière dramatique dorsalement. Le rôle direct de FKBP8 dans la régulation de la voie Shh a été ensuite confirmé par l'étude de la souris double-mutant *Shh(-)/FKBP8(-)* qui voit son phénotype neural restauré (Bulgakov et al., 2004). Toutefois, les mécanismes biochimiques permettant de préciser l'action moléculaire de la protéine FKBP8 parmi les autres protagonistes de la voie Shh, n'ont pas été encore élucidés.

1.5.2. Les modulateurs pharmacologiques de Smo

Comme de nombreuses études le démontrent, Smo est essentiel pour la transmission du signal Hh aux cellules cibles que ce soit au cours du développement physiologique de multiples organes, ou dans les processus pathologiques tels que les tumeurs (pour revues, Ingham et al., 2001 ; McMahon et al., 2003 ; Lum et al., 2004). La mise en évidence de l'action nocive de substances alcaloïdes dérivées de plantes, telles que la cyclopamine et la jervine, engendrant une cyclopie chez des veaux, ont amené plusieurs équipes à s'intéresser à l'effet de ces substances tératogènes sur la voie de signalisation Shh dont l'inactivation engendre aussi des phénomènes de cyclopie (Cooper et al., 1998 ; Incardona et al., 1998 ; Taipale et al., 2000). Chen et collaborateurs ont montré que l'effet inhibiteur de la cyclopamine sur la voie Hh résulte de son interaction directe avec l'heptahélice de Smo (Chen et al., 2002a). L'étude des effets tératogènes de la cyclopamine a

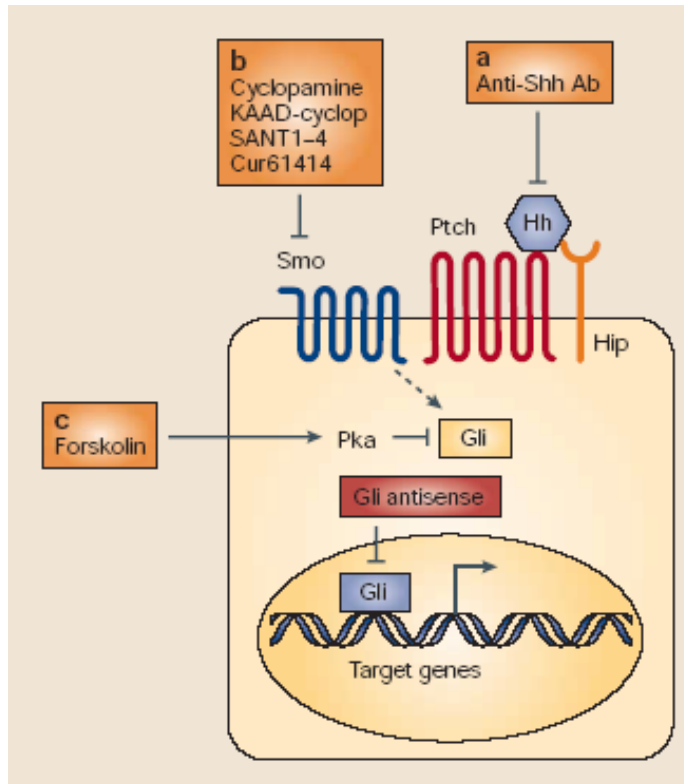


Figure 5 : Les inhibiteurs pharmacologiques de la voie Shh. (a) l'anticorps bloquant anti-Shh (Ab5E1) empêche la fixation du ligand Shh sur son récepteur Ptc. (b) les agents pharmacologiques sont des inhibiteurs agissant directement sur Smo. (c) la forskoline est un activateur de la PKA et donc un inhibiteur de la voie Shh (d'après Di Magliano et Hebrok, 2003).

ouvert la voie à l'élaboration de petites molécules capables d'agir sur Smo et donc de moduler la voie Hh pharmacologiquement dans un but thérapeutique. Ainsi Chen et collaborateurs ont identifié quatre petites molécules, les SANT, structurellement différentes de la cyclopamine (Chen et al., 2002b). Un autre antagoniste synthétique, le Cur61414 est aussi capable de lier directement Smo et d'inhiber la voie (Frank-Kamenetsky et al., 2002). Parallèlement au développement de ces antagonistes synthétiques, les équipes ont développé des agonistes de la voie Shh, tels que le SAG (Chen et al., 2002b), qui lie Smo sur son heptahélice et est capable d'antagoniser l'action de la cyclopamine sur ce récepteur. SAG peut aussi mimer les effets de Shh sur la prolifération et la différenciation *in vitro*, et s'opposer aux anomalies observées *in utero* chez les souris Shh(-/-) (Frank-Kamenetsky et al., 2002) (Figure 5).

2. Les rôles biologiques de la voie Sonic Hedgehog

Bien que Ihh et Dhh jouent des rôles importants au cours du développement de plusieurs organes (en particulier l'os pour Ihh et le système nerveux périphérique pour Dhh), c'est plus particulièrement sur les rôles biologiques de Shh que sera focalisée notre attention, notamment ceux identifiés dans le système nerveux et plus succinctement ceux caractérisés dans les tissus et organes périphériques.

2.1.1. Rôles physiologiques

2.1.1.1. Le système nerveux central

i. Spécification neuronale

Les différents types neuronaux sont formés dans des régions bien particulières le long de l'axe antéro-postérieur et dorso-ventral du tube neural en réponse à des signaux locaux de positionnement. Ainsi dans les régions les plus antérieures du tube neural, le mésendoderme de la plaque préchordale, situé ventralement par rapport au cerveau antérieur présomptif, est responsable

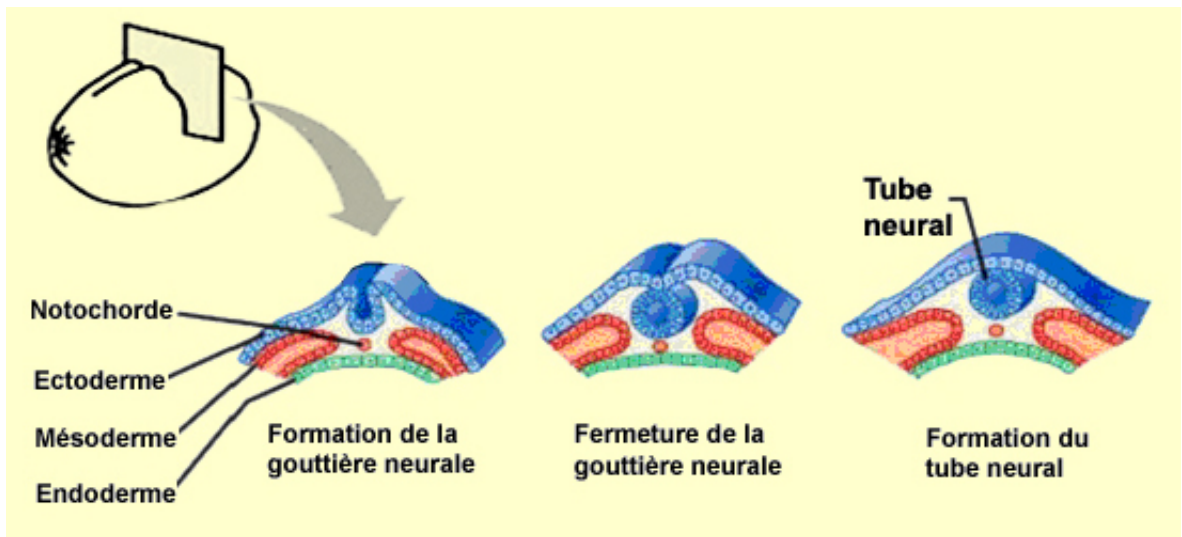


Figure 6 : Etapes de formation du tube neural (extrait du site internet <http://www.lecerveau.mcgill.ca>)

du profil de distribution cellulaire ventral, tandis que dans les régions les plus postérieures, la notochorde joue un rôle équivalent pour le cerveau moyen, le tronc cérébral et la moelle épinière (Figure 6).

✓ **La moelle épinière**

Shh est exprimé dans la plaque préchordale, la notochorde et la plaque du plancher de l'embryon de vertébré et joue un rôle central dans la spécification du destin cellulaire ventral sur toute la longueur du tube neural (Figure 7) (pour revues, Briscoe et al., 2001b ; Jessell, 2000). Aux temps les plus précoces du développement embryonnaire, de nombreuses données indiquent que Shh agit directement de manière concentration-dépendante sur la spécification de la plupart, si ce n'est de tous les progéniteurs neuraux du tube neural ventral (Figure 7). Plus tardivement, les combinaisons spécifiques de plusieurs facteurs à homéodomains déterminent la différenciation des sous-types neuraux spécifiques (Figure 7) grâce à des processus largement indépendants de la signalisation Hh.

Bien que Shh soit transcrit seulement dans la plaque du plancher et dans la notochorde, la protéine Shh est détectée dans l'ensemble de la moitié ventrale du tube neural, suggérant un rôle à distance de son lieu de production (Gritli-Linde et al., 2001), en accord avec l'induction transcriptionnelle de Ptc1 et de Gli1 dans ces mêmes régions voire dans des régions plus dorsales du tube neural (Goodrich et al., 1996 ; Hui et al., 1994 ; Lee et al., 1997; Marigo et al., 1996b). Il existe aussi une excellente corrélation entre la position des progéniteurs et la concentration de Shh requise pour leur induction. Bien que l'induction des progéniteurs de la plaque du plancher, des interneurons V3 et des motoneurons requière Shh, les interneurons V2, V1 et V0 sont présents dans les embryons murins mutants dépourvus de Shh (Chiang et al., 1996; Litingtung et al., 2000), indiquant ainsi que Shh n'est pas essentiel pour l'induction des populations les plus dorsales des interneurons ventraux. Afin d'expliquer comment chaque domaine de progéniteurs est spécifié en réponse à la signalisation Hh, Briscoe et collaborateurs ont proposé un modèle comprenant 2 classes de gènes. Les gènes de la classe I (Dbx1, Dbx2, Pax6, Pax3 et Irx3) sont réprimés et les gènes de la

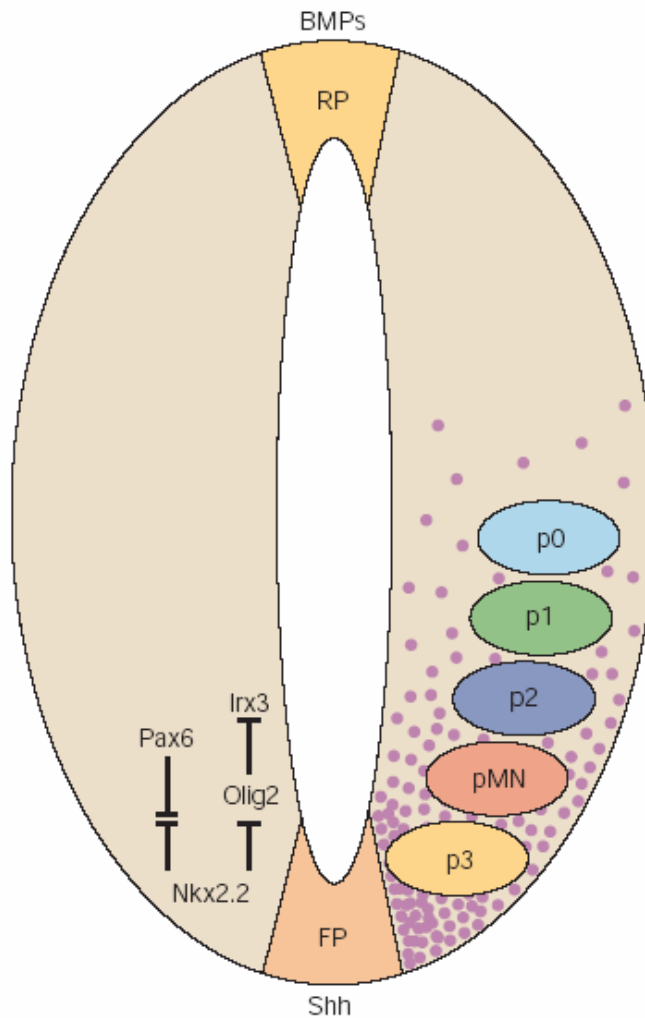


Figure 7 : L'identité phénotypique des cellules du tube neural définit des domaines uniques pour les progéniteurs neuraux.

Les progéniteurs des motoneurones et des interneurones sont formés à l'intérieur de domaines distincts restreints régionalement à l'intérieur du tube neural ventral. Les domaines p0-p3 donnent naissance à plusieurs sous-types d'interneurones, alors que le domaine pMN est une source de motoneurones et d'oligodendrocytes. Les domaines progéniteurs sont identifiés par l'expression segmentaire d'un jeu de facteurs de transcription qui sont activés ou réprimés en fonction des différentes concentrations de Shh. Le gradient Shh est schématisé par les points violets. La signalisation Shh est proposée réguler l'expression initiale des facteurs de transcription dans le tube neural ventral (par exemple Nkx2.2, Olig2, Pax6 et Irx3), lesquels à leur tour génèrent des interactions régulatrices afin de maintenir les frontières entre les domaines. Enfin, les interactions combinatoires entre les facteurs de transcription exprimés dans chaque domaine régulent les gènes en aval qui déterminent l'identité des progéniteurs. FP, floor plate ou plaque du plancher ; RP, roof plate ou plaque du plafond ; BMP, bone morphogenetic protein (d'après Rowitch, 2004).

classe II (Nkx2.2 et Nkx6.1) sont activés en réponse à différentes concentrations de Shh (Briscoe et al., 2000). Ainsi les frontières ventrales de l'expression des gènes de classe I et les frontières dorsales de l'expression des gènes de classe II permettent la démarcation des domaines des progéniteurs. Cependant il reste à définir si ces gènes sont des cibles directes de la signalisation Shh ou non.

✓ **Le cerveau**

Dans le cerveau en devenir, Shh est exprimé ventralement au cours des stades embryonnaires précoces et impliqué dans le développement des parties ventrales du tronc cérébral, du cerveau moyen et du cerveau antérieur (pour revues, Ruiz I. Altaba et al., 2002 ; McMahon et al., 2003). Au cours de l'embryogenèse tardive et des périodes post-natales précoces, l'expression de Shh est aussi détectée dorsalement, notamment dans le cortex cérébelleux, le néocortex et le tectum, où la protéine agit comme un puissant mitogène (Figure 8) (Wechsler-Reya et al., 1999 ; Traiffort et al., 1999 ; Charytoniuk et al., 2002a ; Dahmane et al., 2001).

La voie de signalisation Hh induit différentes classes de neurones dans le cerveau ventral et contrôle le développement des ganglions de la base (Hynes et al., 1995 ; Chiang et al., 1996 ; Ericson et al., 1995 ; Miao et al., 1997 ; Kohtz et al., 1998 ; Ye et al., 1998). En effet, des expériences ont montré que l'addition d'anticorps 5E1 (anti-Shh) à des explants de cerveau moyen et antérieur de rats au stade E9 empêche l'apparition de neurones dopaminergiques en inhibant la protéine Shh endogène (Ye et al., 1998). La concentration minimale de Shh nécessaire à l'induction des neurones dopaminergiques est de 12 nM, c'est-à-dire 10-20 fois plus élevée que celle nécessaire à l'induction des motoneurones (Hynes et al., 1995). Contrairement au cas des neurones dopaminergiques, la protéine Shh, bien que nécessaire, n'est pas suffisante pour induire les neurones sérotoninergiques. Leur spécification dépend de l'action combinée de Shh, FGF-8 et FGF-4 (Ye et al., 1998).

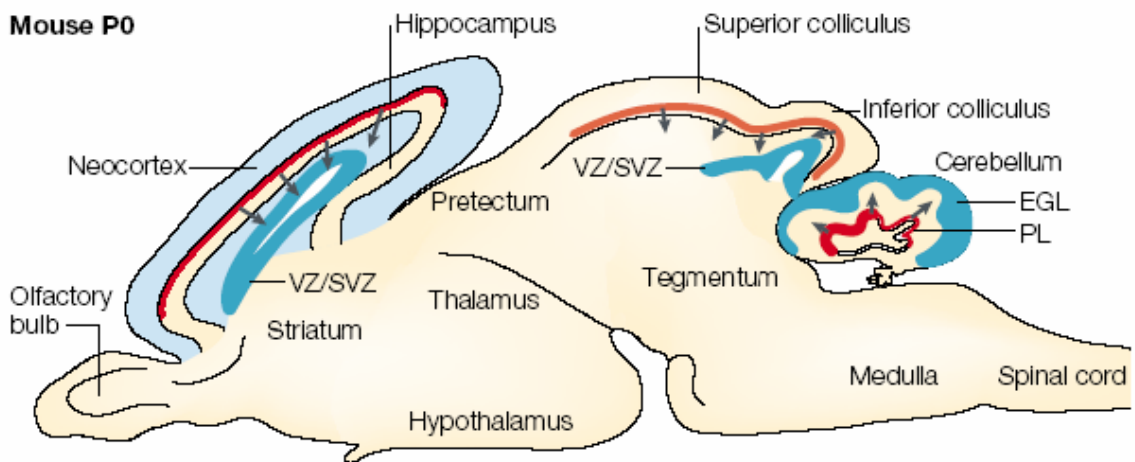


Figure 8 : Expression de Shh dans les régions dorsales du cerveau post-natal.

Schéma d'une coupe sagittale de cerveau de souris au jour post-natal 0 (P0). Les flèches représentent l'action supposée de Shh à distance de ses sources de production. Les cellules produisant Shh (en rouge) sont localisées dans les plaques néocorticale et tectale, et dans la couche de Purkinje (Purkinje Layer ou PL). Les cellules cibles de Shh (en bleu) sont localisées dans les zones ventriculaire/sous-ventriculaire (VZ/SVZ) du néocortex et du tectum, et dans la couche granulaire externe (external granular layer ou EGL) dans le cervelet. Les sources et les actions ventrales de Shh ne sont pas représentées ici (d'après Ruiz i Altaba et al, 2002).

ii. Les oligodendrocytes

Les oligodendrocytes sont les cellules myélinisantes de la macroglie et sont retrouvés dans toutes les régions du SNC. En dépit de leur large distribution, l'analyse de l'expression *in situ* des précurseurs oligodendrocytaires (OLP) en utilisant des marqueurs tels que Olig2, PDGFR α et Sox10 indique que ces cellules proviennent d'aires très restreintes du tube neural aux cours des stades précoces de développement (Figure 9) (pour revues, Richardson et al., 2000 ; Spassky et al., 2000). Les OLP débutent ensuite leur migration jusqu'à leurs localisations finales. Leur prolifération intervient durant la migration et persiste après la fin de ce processus. Au cours des premières semaines post-natales, le processus de maturation inclut l'expression séquentielle de marqueurs spécifiques qui aboutira au processus de myélinisation. La voie de signalisation Shh joue un rôle critique dans l'induction des progéniteurs oligodendrocytaires dans la moelle épinière et dans le télencéphale (pour revues, Richardson et al., 2000 ; Rowitch, 2004).

✓ **Oligodendrogenèse et moelle épinière**

Dans la moelle épinière en cours de formation, le développement des OLP est initié dans la région pMN ventrale qui engendre aussi les motoneurones. Les précurseurs pMN engendrent dans un premier temps le lignage motoneuronal (stades E9-E10.5 chez la souris) puis le lignage oligodendrocytaire (stade E12.5). La signalisation Shh participe à la séquence complexe d'évènements, allant de l'établissement de l'identité des précurseurs pMN à la spécification des motoneurones et des OLP, qui se déroulent à l'intérieur d'une fenêtre temporelle très précise au cours du développement (E8.25-12.5 chez la souris, E4-6 chez le poulet). L'expression de Shh pendant une période de temps prolongée est notamment nécessaire pour assurer l'acquisition d'un phénotype cellulaire normal à partir des progéniteurs oligodendrocytaires dérivant du domaine pMN, aux alentours du stade E12.5 chez la souris (stade 24 chez le poulet).

Aux stades précoces, Shh induit l'expression de *Olig1* et *Olig2* qui codent pour des protéines de type bHLH (basic Helix-Loop-Helix) et sont initialement détectés dans le domaine pMN (Zhou et al., 2002 ; Lu et al., 2002). Des études fonctionnelles chez la souris ont montré que *Olig1* et *Olig2*

sont requis pour l'établissement du domaine pMN (Zhou et al., 2002) et qu'une inactivation du gène *Olig2* seul induit un défaut de développement du lignage issu de ce domaine (Lu et al., 2002; Takebayashi et al., 2002). A l'inverse, les stades plus tardifs de la maturation des OLP semblent être indépendants de Shh (Orentas et al., 1999 ; Soula et al., 2001), ce qui est cohérent avec une migration des OLP loin de ses sources de production (notochorde et plaque du plancher) (Rowitch, 2004) (Figure 9a). Par ailleurs, les sources dorsales d'oligodendrogenèse un peu plus tardives et récemment identifiées apparaissent également indépendantes de Shh (Vallstedt et al., 2005 ; Cai et al., 2005).

✓ **Spécification des oligodendrocytes dans le télencéphale**

Les oligodendrocytes du télencéphale proviennent d'une région spécifique du télencéphale ventral chez les rongeurs (Tekki-Kessarlis et al., 2001). Chez le rat, l'expression du PDGFR α apparaît au stade E13.5 dans l'aire antérieure entopédunculaire (anterior entopeduncular area ou AEP) qui s'étend ventralement juste en dessous de l'éminence ganglionnaire médiane (medial ganglionic eminence ou MGE) (Puelles et al., 2000). Trois des gènes spécifiques du lignage oligodendrocytaire, *Olig1*, *Olig2* et *Sox10* sont exprimés dans la zone ventriculaire de l'AEP. A partir du stade E14.5, les OLP PDGFR α + s'étendent progressivement en direction des régions plus dorsales du télencéphale : la MGE, puis l'éminence ganglionnaire latérale (LGE) et pour finir le cortex cérébral (Figure 9b).

Shh est directement responsable de l'oligodendrogenèse dans le télencéphale. En effet, premièrement, son expression spatiale et temporelle est corrélée au déroulement de l'oligodendrogenèse. En particulier, Shh est exprimée dans les zones ventriculaire et sous ventriculaire de l'AEP, aussi bien que dans la MGE adjacente et l'aire préoptique antérieure (Tekki-Kessarlis et al., 2001 ; Nery et al., 2001 ; Sussel et al., 1999). Deuxièmement, la perte d'expression de Shh dans le télencéphale ventral chez les souris mutantes *Nkx2.1(-/-)* (Sussel et al., 1999) est associée à une absence de l'expression précoce du PDGFR α dans la totalité du télencéphale (Tekki-Kessarlis et al., 2001 ; Nery et al., 2001). De plus, la production d'oligodendrocytes au sein de

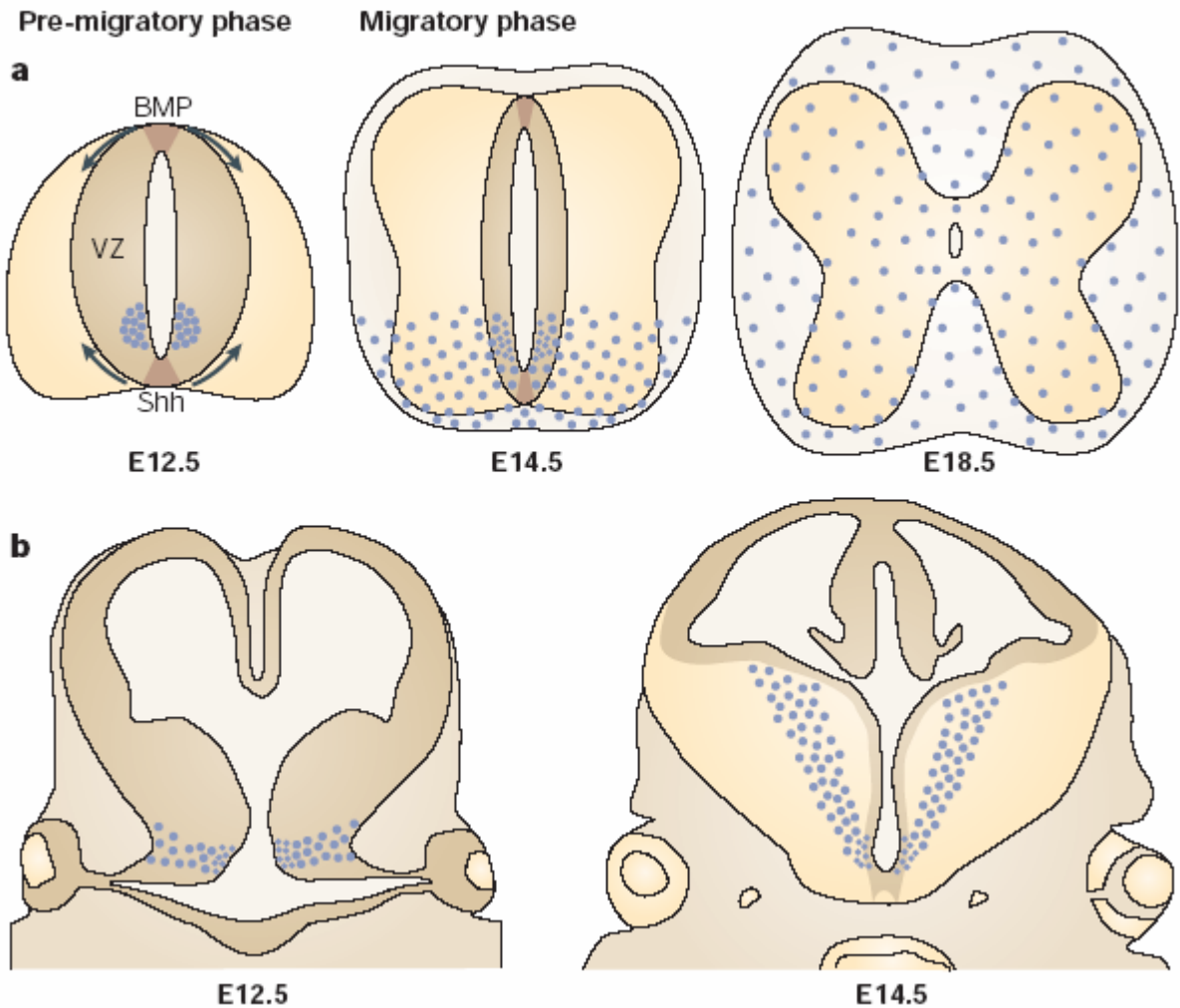


Figure 9 : Origine des précurseurs oligodendrocytaires dans le tube neural ventral.

La spécification des motoneurones a lieu au niveau des précurseurs de la zone ventriculaire (ventricular zone ou VZ) du tube neural, juste avant de sortir du cycle cellulaire. Au cours de l'embryogenèse, les précurseurs oligodendrocytaires (Oligodendrocyte precursor ou OLP) sont spécifiés avant leur migration à partir de la VZ (phase pré-migratoire) et continuent à proliférer après leur migration. Les OLP qui émergent de la VZ aux environs de E12.5 dans la moelle épinière de souris (E9 chez le poulet) peuvent être identifiés par l'expression de *Olig2*, *PDGFRα* et *Sox10*. (a) Profil d'expression du PDGFRα dans les OLP de la moelle épinière de souris. Par la suite, les OLP migrent latéralement et dorsalement pour se disperser dans tout le SNC en réponse aux signaux attractifs et répulsifs. (b) Origines ventrales des OLP PDGFRα dans le cerveau antérieur de souris embryonnaire. C'est l'une des quelques sources d'OLP du SNC rostral (d'après Rowitch, 2004).

cultures de cellules isolées du télencéphale basal peut être bloquée par la cyclopamine (Tekki-Kessarlis et al., 2001). Enfin, la surexpression de Shh induite par un système d'expression rétroviral, peut induire des oligodendrocytes de manière ectopique *in vivo* et partiellement restaurer le développement oligodendrocytaire chez les mutants *Nkx2.1(-/-)* (Nery et al., 2001). En accord avec ces données, la surexpression de Shh et de Ihh dans des cultures corticales est directement responsable de la production des oligodendrocytes *in vitro* (Tekki-Kessarlis et al., 2001). En conclusion, comme dans la moelle épinière, les étapes les plus précoces de l'oligodendrogenèse dans le télencéphale sont dépendantes de la voie de signalisation Shh.

iii. Prolifération et survie

✓ **Le cervelet**

En plus de son rôle dans la spécification du destin cellulaire, Shh se révèle être un puissant mitogène au sein des structures dorsales du cerveau au cours des étapes plus tardives du développement. Cette fonction proliférative est susceptible de faire intervenir les acteurs moléculaires de la voie de signalisation Hh dans la genèse des tumeurs du SNC. Le cervelet illustre parfaitement cette fonction. *In vitro*, une augmentation ou une diminution de prolifération cellulaire est observée dans des cultures primaires de précurseurs de cellules granulaires traitées respectivement par la protéine ShhN recombinante ou un antagoniste de la voie Shh (Dahmane et al., 1999 ; Charytoniuk et al., 2002a). *In vivo*, *Ptc*, *Smo* et *Gli1* sont exprimés dans la couche granulaire externe (external granular layer ou EGL) où sont situés les précurseurs des neurones granulaires du cervelet au moment de la genèse des cellules granulaires (Charytoniuk et al., 2002a) et l'inhibition de la voie Shh à l'aide de l'anticorps monoclonal 5E1 induit une nette diminution de la prolifération de l'EGL (Dahmane et al., 1999 ; Wechsler-Reya et al., 1999). De plus, la couche des cellules de Purkinje (Purkinje layer ou PL) est désorganisée dans le cerveau de poulet injecté avec des cellules sécrétant des anticorps bloquant Shh (Dahmane et al., 1999). Ainsi, Shh, sécrétée

par les cellules de Purkinje, est un facteur crucial pour la croissance du cortex cérébelleux (Wallace, 1999 ; Wechsler-Reya et al., 1999).

✓ **Le néocortex**

Des études récentes ont montré que Shh est exprimé dans le néocortex et le tectum (colliculi supérieur et inférieur) au cours des stades périnataux (Dahmane et al., 2001). L'ARNm de Shh a été identifié dans la couche V du néocortex chez le rat adulte (Traiffort et al., 1998) et celui de Gli1 est exprimé dans la zone ventriculaire à partir du stade embryonnaire E14 chez la souris (Dahmane et al., 2001). Des expériences réalisées sur des explants et des cellules issues de néocortex murin au stade post-natal P3 ont permis de montrer que Shh augmente la prolifération des précurseurs néocorticaux exprimant la nestine, alors que l'inhibition de la voie engendre une diminution de leur prolifération (Dahmane et al., 2001). Il est intéressant de noter que la perte d'expression de la protéine Gli3 induit des défauts corticaux (Theil et al., 1999 ; Tole et al., 2000), suggérant une participation des protéines Gli dans le développement cortical (Ruiz I. Altaba et al., 2002).

Plus récemment, la voie Shh-Gli s'est révélée réguler de manière endogène le nombre de cellules souches néocorticales chez les souris embryonnaires et postnatales, et contrôler la prolifération des précurseurs néocorticaux en coopération avec l'EGF (Palma et al., 2004). La protéine Shh continue d'être exprimée dans la zone sous ventriculaire du cerveau de rongeur adulte, où les cellules souches neurales prolifèrent (Charytoniuk et al., 2002b). Actuellement, l'implication de Shh dans l'expansion et la différenciation des précurseurs neuraux dans le cerveau adulte a fait l'objet de plusieurs études (Charytoniuk et al., 2002b ; Lai et al., 2003 ; Machold et al., 2003 ; Palma et al., 2005) dont les résultats seront discutés dans le chapitre « Discussion » de ce manuscrit.

✓ **Shh et cycle cellulaire**

Deux hypothèses sont envisageables pour expliquer l'effet de la voie Shh sur la prolifération cellulaire : le raccourcissement de la durée du cycle cellulaire ou la ré-entrée dans le cycle cellulaire des précurseurs latents. Dans des cultures primaires de cervelet de souris néonatale, Shh favorise la progression du cycle cellulaire en maintenant la phosphorylation de la protéine du rétinoblastome

(Rb) au sein des précurseurs des cellules granulaires, mais ne permet pas aux cellules quiescentes de ré-entrer dans le cycle (Kenney et al., 2000). La signalisation Hh affecte par ailleurs plusieurs autres composantes du cycle cellulaire (Dahmane et al., 2001 ; Rowitch et al., 1999 ; Ericson et al., 1996). Ainsi, Shh régule positivement la transcription des cyclines de phase G1, les cyclines D et E (Kenney et al., 2000). Elle peut s'opposer à l'arrêt de croissance des cellules épithéliales en intervenant sur la protéine p21, inhibiteur du cycle cellulaire (Fan et al., 1999), mais n'intervient pas sur p27 au sein des précurseurs des cellules granulaires du cervelet (Miyazawa et al., 2000). De plus, Shh lèverait l'inhibition exercée par Ptc1 sur la cycline B favorisant la progression de la phase G2 à la phase M (Barnes et al., 2001). Enfin, Shh pourrait intervenir dans la phase S tardive de certains précurseurs, notamment lors de l'induction de la spécification des motoneurones (Ericson et al., 1996).

✓ **Shh et survie**

Le rôle de Shh dans la survie cellulaire a été initialement décrit *in vitro* sur des cultures de neurones mésencéphaliques dopaminergiques et gabaergiques (Miao et al., 1997), puis *in vivo* sur un modèle d'embryon de poulet chez lequel la formation de la notochorde et de la plaque du plancher est inhibée. Dans ce modèle, la très forte apoptose induite dans le tube neural est antagonisée par la greffe de cellules produisant Shh (Charrier et al., 2001). D'autres études ont montré que l'application ectopique de Shh est aussi capable d'accroître l'apoptose à l'intérieur du tube neural ventral. Ce phénomène a été attribué à une spécification erronée des types cellulaires ventraux (Oppenheim et al., 1999). Récemment, Thibert et collaborateurs ont confirmé ce rôle de la voie Shh dans l'apoptose et la survie des cellules du tube neural. Par des expériences d'électroporation dans le tube neural de poulet, ils ont montré non seulement que Ptc pouvait générer en absence de son ligand Shh un signal intracellulaire menant à l'apoptose de la cellule qui l'exprime, mais aussi que cet effet pro-apoptotique de Ptc pouvait être aboli en présence de Shh (Thibert et al., 2003). Ptc peut donc délivrer deux messages : en présence de son ligand, il transmet

le signal positif classique, en absence de son ligand, il induit la mort de la cellule par apoptose. Ainsi Ptc fait partie de la famille des récepteurs à dépendance (Mehlen, 2003).

iv. Le guidage axonal

Des données très récentes ont révélé l'implication de la voie Shh dans la régulation du guidage axonal des axones commissuraux de la moelle épinière en développement. Les axones commissuraux projettent de la partie dorsale de la moelle épinière vers la plaque du plancher, à proximité de laquelle ils traversent en direction du côté contralatéral. La Netrine-1, exprimée par les cellules de la ligne médiane ventrale, a la capacité d'attirer les axones commissuraux vers la plaque du plancher (pour revue, Charron et al., 2005) (Figure 10). Une analyse approfondie des souris Netrine-1(-/-) a révélé que, bien qu'un grand nombre d'axones commissuraux aient été déroutés comme attendu en l'absence de Netrine-1, quelques uns approchent de leur cible sans l'atteindre, suggérant l'existence d'autres signaux de guidage. Les récents travaux menés en collaboration par Tessier-Lavigne, McMahon et collaborateurs ont permis de démontrer que Shh, exprimé par la plaque du plancher et la notochorde, fonctionne avec la Netrine-1 dans ce guidage axonal (Charron et al., 2003). En effet, dans des expériences d'explants, Shh induit le changement de direction des axones commissuraux sans stimuler leur croissance, alors que l'inhibition de Smo par la cyclopamine bloque la réponse des axones commissuraux à Shh ou à la Netrine-1.

En plus de son activité chémoattractive, Shh possède une activité chémoréulsive sur les axones post-commissuraux qui tournent en direction rostrale et croissent le long de l'axe longitudinal (Bourikas et al., 2005). Cet effet, démontré par une approche d'hybridation soustractive combinée à une inhibition de la protéine par électroporation d'acide ribonucléique interférant (ARNi) *in ovo*, n'est pas transmis par le complexe-récepteur Ptc/Smo, mais par Hip dont la fenêtre temporelle d'expression est cohérente avec cette hypothèse (Bourikas et al., 2005). La régulation du guidage axonal par Shh n'est pas restreinte à la moelle épinière. *In vitro*, Shh peut réguler la croissance des axones des cellules ganglionnaires rétiniennes (CGR) qui projettent en direction du chiasma optique où la plupart passent du côté contralatéral (Trousse et al., 2001).

v. Les neurones matures

Chez l'adulte, l'ARNm de Shh continue à être exprimé dans plusieurs populations neuronales. Après avoir suggéré l'existence d'une voie de signalisation Shh dans le cerveau adulte (Traiffort et al., 1998), Traiffort et collaborateurs ont établi une cartographie détaillée de la localisation des transcrits de Shh, Ptc et Smo dans le cerveau et la moelle épinière de rat adulte et dans le cervelet postnatal où est également détecté le facteur de transcription Gli1 (Traiffort et al., 1999). Chez l'adulte, les transcrits de Shh, Ptc et Smo sont co-exprimés dans le cortex cérébelleux et dans la partie ventrale du troisième ventricule au niveau de l'éminence médiane, située à la base de l'hypothalamus et intervenant dans les mécanismes de neurosécrétion. Toutefois dans la majorité des autres aires cérébrales, les transcrits de Shh, Ptc et Smo ne sont pas co-exprimés. L'analyse de la distribution des transcrits de Shh révèle une localisation dans des neurones GABAergiques de nombreuses régions telles que le globus pallidus, le pallidum ventral, le noyau de la bande diagonale de Broca. Des cellules exprimant l'ARNm de Shh sont aussi identifiées dans les neurones cholinergiques de plusieurs noyaux de nerfs crâniens (trijumeau, facial, vague, hypoglosse) ainsi que dans les motoneurones de la corne ventrale de la moelle épinière. Les transcrits de Ptc sont majoritairement observés dans des aires de projections des régions contenant des neurones exprimant Shh, en particulier dans les noyaux médian et basomédian de l'amygdale, les noyaux subthalamique et paraventriculaire du thalamus, les aires latérales antérieure et ventromédiane de l'hypothalamus, ainsi que dans les noyaux arcuate, supraoptique, vestibulaire et du tractus solitaire. Un signal plus faible est observé dans les cellules granulaires du gyrus denté de l'hippocampe et au sein de cellules du cortex piriforme, du pallidum ventral et du colliculus supérieur. Enfin, l'expression de Smo apparaît majoritaire au sein des structures épendymaires comme les plexus choroïdes, l'organe subcommissural et les épendymocytes du canal central de la moelle épinière. La plus forte densité de transcrits de Smo est retrouvée dans les cellules granulaires du gyrus denté, les

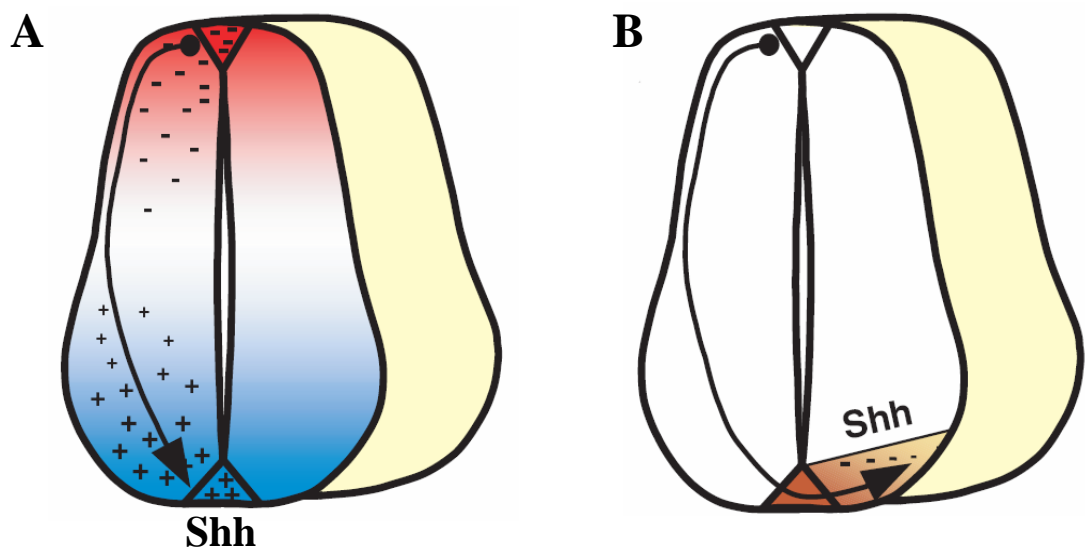


Figure 10 : Guidage des axones commissuraux par Shh. (A) Les axones commissuraux sont attirés en direction de la plaque du plancher par un effet chémoattracteur de Shh et de la nétrine 1. (B) Après avoir croisé la plaque du plancher, les axones post-commissuraux sont repoussés du pôle postérieur vers le pôle antérieur par un gradient de Shh (d'après Charron et Tessier-Lavigne, 2005).

tanycytes bordant le troisième ventricule et les cellules de l'area postrema. L'expression de Smo est plus modérée dans le noyau réticulaire thalamique et dans la couche des cellules de Purkinje. Bien qu'aucun ligand n'ait été identifié pour cette protéine membranaire, sa localisation est fréquemment observée en l'absence de Ptc, suggérant, chez l'adulte, l'existence d'un ligand potentiel pour ce récepteur, qui pourrait fonctionner indépendamment de la voie Hh (Traiffort et al., 1999).

Grâce au développement d'un anticorps polyclonal spécifique de ShhN de souris (Ab167), la protéine biologiquement active ShhN a été très fortement détectée dans la moelle épinière et dans de nombreuses aires cérébrales telles que l'hypothalamus, le thalamus, le colliculus supérieur et plus modérément dans le cervelet, le striatum, le bulbe olfactif, l'hippocampe et le cortex (Traiffort et al., 2001). ShhN est majoritairement trouvée associée à des microdomaines de la membrane cellulaire riches en cholestérol et sphingolipides, les « rafts » (Traiffort et al., 2001). Elle est également présente dans les cellules ganglionnaires de la rétine mature à partir desquelles elle est transportée par voie axonale antérograde comme montré dans des expériences d'incorporation de méthionine radioactive (Traiffort et al., 2001).

Les tentatives de visualisation de la protéine ShhN par immunohistochimie sont longtemps restées infructueuses vraisemblablement en raison de sa nature de protéine sécrétée, de sa conformation dans les tissus et/ou du manque de sensibilité de la détection immunohistochimique. Gritli-Linde et collaborateurs furent les premiers à visualiser ShhN dans de nombreux passages de fibres, mais aussi dans les dendrites et dans les projections axonales des cellules de Purkinje (Gritli-Linde et al., 2001) en accord avec l'expression de l'ARNm de Shh dans le corps cellulaire des cellules de Purkinje (Traiffort et al., 1999).

vi. Effets électrophysiologiques de Shh

Très récemment, Pascual et collaborateurs ont mis en évidence la complémentarité des patrons d'expression de Shh et de son récepteur Ptc, respectivement dans le noyau moteur dorsal du vague et la partie ventrolatérale du noyau du tractus solitaire (vNTS) impliqué dans la fonction cardiorespiratoire au cours de l'hypoxie (Pascual et al., 2005). Ils ont démontré que, chez l'adulte,

la signalisation Shh est impliquée dans le contrôle des propriétés électrophysiologiques des cellules du vNTS suggérant ainsi que la voie Shh pourrait intervenir au cours de fonctions physiologiques majeures (Pascual et al., 2005). La modulation de l'activité électrique des neurones par Shh a également été montrée dans le noyau subthalamique, qui exprime les transcrits de Ptc et reçoit les projections du globus pallidus dans lequel l'ARNm de Shh a été identifié (Bezard et al., 2003).

2.1.1.2. La crête neurale et le système nerveux périphérique

Chez l'embryon des vertébrés, la crête neurale est composée d'une population de cellules (cellules de la crête neurale ou CCN) à forte potentialité migratoire, qui vont générer un grand nombre de types cellulaires distincts, notamment impliqués dans la formation d'une partie importante du squelette de la tête, des nerfs crâniens, des cellules pigmentaires, des cellules de Schwann, des nerfs périphériques, du tissu conjonctif de la tête et des méninges, ainsi que de certaines parties du tractus cardiaque.

Des données expérimentales ont mis en évidence l'implication de la signalisation Shh dans la régulation des types cellulaires de la crête neurale. L'émigration des CCN à partir du tube neural dorsal *in vivo* et *in vitro* est inhibée par Shh (Testaz et al., 2001), via un mécanisme qui pourrait faire intervenir la capacité de la signalisation Shh à moduler les propriétés d'adhésion des CCN au substrat fibronectine (Testaz et al., 2001). A l'heure actuelle, il n'y a pas de preuve démontrant que les CCN crâniennes sont des cibles directes de la signalisation Shh. En particulier, l'induction transcriptionnelle de Ptc1 n'a jamais été rapportée (Ahlgren et al., 1999). L'effet de Shh sur la migration et la survie des CCN pourrait donc être indirect, ou bien Shh pourrait agir via une autre cascade moléculaire (Ahlgren et al., 1999 ; Testaz et al., 2001).

Concernant le rôle de la voie Hh au sein du SNP, Shh peut stimuler la prolifération des précurseurs neuraux sympathiques et promouvoir la production de tyrosine hydroxylase dans les neurones sympathiques matures (Williams et al., 2000).

2.1.1.3. Le système visuel

Le phénotype de cyclopie retrouvé chez les souris mutantes *Shh*(-/-), ainsi que chez les patients porteurs d'une mutation du gène *Shh* (Chiang et al., 1996 ; Ming et al., 1998), est attribuable au défaut de régulation par *Shh* de l'expression spatiale des gènes codant pour *Pax2* et *Pax6*, qui permettent la démarcation normale des primordia optiques. Par ailleurs, *Shh* et *Ptc*, exprimés de manière endogène par les cellules ganglionnaires de la rétine (CGR) participent à la stimulation de la prolifération des astrocytes au cours du développement du nerf optique chez les rongeurs (Wallace et al., 1999). De plus, Zhang et collaborateurs ont montré que la protéine *Shh* sécrétée par les CGR différenciées empêche la prolifération de RCG additionnelles, suggérant la dualité du rôle de *Shh* capable successivement de stimuler puis d'inhiber la prolifération de ces cellules (Zhang et al., 2001b). Récemment Perron et collaborateurs ont caractérisé le rôle de la voie *Shh* au cours de la rétinogenèse chez le Xénope soit par activation de la voie grâce à l'injection d'une forme dominante-négative de la PKA, soit par blocage de la voie en traitant les embryons avec de la cycloamine. Ils ont ainsi pu mettre en évidence qu'une perturbation précoce de la voie *Shh* engendre des défauts de l'axe promodistal de la rétine alors qu'une perturbation tardive empêche la différenciation correcte de l'épithélium pigmentaire rétinien (Perron et al., 2003). Donc, le signal *Shh* issu des CGR joue un rôle critique dans le développement oculaire, à la fois en régulant le développement des cellules précurseurs de la rétine neurale immature et en contrôlant la gliogenèse dans le nerf optique (pour revues, Dakubo et al., 2004 ; Amato et al., 2004).

2.1.1.4. Les autres organes

i. Tête

Les anomalies dramatiques de la tête observées chez les souris mutantes *Shh*(-/-) (Chiang et al., 1996) et chez les embryons murins exposés à la cycloamine et à la jervine (Cooper et al., 1998

; Incardona et al., 1998 ; Incardona et al., 2000a) suggèrent un rôle de la signalisation Shh dans la régulation de ce processus morphogénétique. Chez les souris dépourvues d'activité Shh, les processus fronto-nasaux fusionnent pour former une longue structure médiane de type proboscis et les mâchoires supérieures et inférieures sont absentes. A l'inverse, l'activation ectopique de la signalisation Hh, réalisée par l'implantation de billes recouvertes de ShhN dans les mésenchymes fronto-nasal et maxillaire (Hu et al., 1999) ou chez les mutants gain-de-fonction tels que le poulet *talpid* (Munoz-Sanjuan et al., 2001) et la souris *Gli3(-/-)*, engendre l'expansion des primordia fronto-nasal et maxillaire.

Ces anomalies ne sont vraisemblablement pas secondaires à la perte des structures cérébrales associée au défaut de signalisation Shh, mais plutôt au défaut de prolifération des précurseurs squelettiques, Shh jouant vraisemblablement un rôle spécifique dans la prolifération cellulaire à l'intérieur des primordia faciaux (Hu et al., 1999).

ii. Intestin

Chez la souris, Shh et Ihh sont exprimés dès le stade E8.5, en particulier au niveau de l'endoderme intestinal, alors que leurs cibles transcriptionnelles *Ptc1* et *BMP4* sont identifiées dans les régions mésodermiques adjacentes (pour revue, McMahon et al., 2003). Cependant, la signification fonctionnelle de l'expression précoce de ces transcrits reste à être déterminée puisque les souris *Ihh(-/-)* ou *Shh(-/-)* ne présentent pas de défauts précoces de l'intestin, suggérant une redondance entre ces signaux. Plus tardivement, Shh et Ihh participeraient à l'épaississement de la couche musculaire via la prolifération du mésoderme adjacent (Roberts et al., 1998 ; Smith et al., 2000). Au stade E18.5, Shh et Ihh sont exprimés dans l'épithélium de l'estomac glandulaire, le petit intestin et le colon. Les deux transcrits sont retrouvés à la base des villosités du petit intestin, une région où seraient localisées les cellules souches épithéliales (Ramalho-Santos et al., 2000). L'expression de Ihh apparaît particulièrement critique pour le maintien de la population des cellules souches intestinales, comme le montre la réduction de la prolifération des cellules souches

épithéliales chez la souris *Ihh(-/-)*. A l'inverse, *Shh* apparaît avoir un effet anti-prolifératif sur les cellules glandulaires épithéliales (van Den Brink et al., 2001). Par ailleurs, les deux souris mutantes *Shh(-/-)* et *Ihh(-/-)* présentent des défauts du système nerveux entérique (Ramalho-Santos et al., 2000).

En accord avec l'importance de la signalisation Hh tout au long des différents stades du développement intestinal, il existe un parallèle entre la perturbation de la signalisation Hh et diverses malformations congénitales humaines communes du tube digestif (pour revue, McMahon et al., 2003).

iii. Poumon

Bien que *Shh* soit exprimé tout le long de l'épithélium pulmonaire, son plus haut niveau d'expression est situé aux extrémités du réseau de ramifications (pour revue, McMahon et al., 2003). *Ptc1*, *Hip* et les trois membres de la famille *Gli* des mammifères sont exprimés dans le mésenchyme sous-jacent, qui constitue vraisemblablement la cible de la signalisation *Shh*, (Bellusci et al., 1997a ; Bellusci et al., 1997b ; Grindley et al., 1997 ; Chuang et al., 1999). L'expression ectopique de *Shh* dans l'épithélium pulmonaire conduit à une augmentation de la prolifération des cellules du mésenchyme et à une diminution des ramifications épithéliales. Ces deux phénotypes sont en accord avec un rôle de *Shh* dans la régulation de la prolifération mésenchymateuse (Bellusci et al., 1997a ; Bellusci et al., 1997b). L'analyse des mutants *Shh(-/-)* montre que la signalisation Hh joue un rôle important dans la régulation de la morphogenèse de l'arbre pulmonaire. L'initiation de la croissance des bourgeons pulmonaires y est normale, mais les bourgeons échouent par la suite à former leurs ramifications latérales.

iv. Muscle

La plus grande partie du muscle squelettique des vertébrés dérive des somites, des structures segmentaires symétriques de part et d'autre du tube neural, qui se compartimentalisent le long de l'axe dorsoventral très tôt après leur formation. Un modèle simple a été établi et propose que les

gradients opposés ventralisant (Shh) provenant de la notochorde et dorsalisant (Wnt) émanant du tube neural dorsal et de l'ectoderme, spécifient le destin des somites le long de l'axe dorsoventral (Fan et al., 1997).

Des études contradictoires ont suggéré que Shh jouerait aussi un rôle positif (Cann et al., 1999 ; Marcelle et al., 1999 ; Teillet et al., 1998 ; Pownall et al., 1996) ou non (Pourquie et al., 1993) dans le développement du muscle, en agissant sur la prolifération ou la survie des cellules épaxiales (à l'origine de la musculature du tronc) ou sur l'induction et la maintenance de l'expression des marqueurs de ces cellules. L'analyse du mutant Shh(-/-) a permis de confirmer que Shh n'est pas indispensable pour l'induction du lignage épaxial (Chiang et al., 1996) et qu'il n'agirait ni comme facteur de prolifération, ni comme facteur de survie pour ces cellules (Borycki et al., 1999).

A l'inverse, plusieurs études s'accordent à montrer que la spécification initiale du lignage hypaxial (à l'origine de la musculature des membres) a lieu indépendamment de l'activité Shh, qui est cependant impliquée dans la survie et la prolifération de ces cellules via la régulation de l'expression de BMP4 (Kruger et al., 2001).

v. Pancréas

Le pancréas se forme à partir de bourgeons qui émergent des côtés dorsaux et ventraux de l'endoderme intestinal duodéal et participent à la formation des cellules spécialisées endocrines et exocrines. Les bourgeons pancréatiques n'expriment aucun des gènes *Hh* (Apelqvist et al., 1997), mais Pdx1, un facteur de transcription critique pour le développement de ce tissu (Ahlgren et al., 1996 ; Offield et al., 1996). De nombreuses expériences d'activation et d'inhibition de la voie Hh ont montré que le développement normal du pancréas nécessite l'exclusion de l'activité Hh des tissus dont il dérive. Ainsi l'expression ectopique de Shh sous le promoteur de Pdx1 transforme le mésoderme en mésenchyme intestinal (Apelqvist et al., 1997). L'application de cyclopamine (antagonisant Smo) ou de l'anticorps monoclonal 5E1 (bloquant l'activité de Hh) sur l'intestin de

poulet en développement engendre la formation d'un pancréas ectopique (Kim et al., 1998). Les souris déficientes pour Shh ou pour Ihh développent un pancréas annulaire étendu (Ramalho-Santos et al., 2000 ; Hebrok et al., 2000), et présentent dans le cas du mutant Shh une élévation importante de la masse pancréatique et du nombre de cellules endocrines. Au contraire, la perte de Ptc1, qui engendre une augmentation de la signalisation Hh, induit une diminution concomitante de l'expression des gènes pancréatiques (Hebrok et al., 2000).

Le mécanisme permettant de limiter l'expansion des morphogènes Hh à l'intérieur du tissu pancréatique en développement met en jeu deux facteurs sécrétés par la notochorde : l'activine- β B et le facteur de croissance fibroblastique FGF-2 (Fibroblast Growth Factor). Appliqués sur l'intestin antérieur chez le poulet, ils répriment Shh dans l'endoderme et induisent l'expression ectopique des gènes pancréatiques (Hebrok et al., 1998).

vi. Glande pituitaire

La glande pituitaire (ou hypophyse) antérieure, issue de la poche de Rathke, une invagination de l'épithélium ectodermique oral, est responsable du contrôle hormonal d'un large spectre de fonctions physiologiques incluant la croissance et la reproduction. Shh est exprimé dans l'ectoderme oral adjacent à la marge ventrale de la poche de Rathke et dans le tissu neural situé au-dessus, suggérant un rôle possible de Shh dans le développement des types cellulaires de la glande pituitaire antérieure. Le blocage de la signalisation Hh via la surexpression de son inhibiteur physiologique Hip engendre une glande pituitaire hypoplasique. A l'inverse, la surexpression de Shh permet son expansion et une augmentation de la quantité d'hormones gonadotropes et thyrotropes, suggérant une spécificité régionale de l'action de la signalisation Shh. Bien que Shh semble réguler la prolifération des cellules précurseurs et la polarité dorso-ventrale à l'intérieur de l'hypophyse, il est peu vraisemblable qu'il agisse seul, mais en coopération avec FGF8 (Treier et al., 2001).

vii. Prostate

Les glandes prostatiques, symétriques, ramifiées, sont des structures sécrétrices qui bourgeonnent à partir du sinus urogénital (au stade E17.5 chez la souris) sous l'influence de la testostérone. Shh (et dans une moindre mesure Ihh (pour revue, McMahon et al., 2003)) est exprimé à l'intérieur de l'épithélium du sinus urogénital. Chez le mâle, l'expression de Shh est réduite en l'absence de testostérone et des anticorps bloquants dirigés contre Shh empêchent une croissance ductale normale (Podlasek et al., 1999). La signalisation Shh jouerait un rôle indirect après activation de ses cellules cibles dans le tissu mésenchymateux (Podlasek et al., 1999).

viii. Sclérotome

L'induction du sclérotome (issu des cellules somitiques ventrales) est due à l'activation de la transcription de Pax1, le marqueur le plus précoce du sclérotome, essentiel pour la formation du corps vertébral et du disque intervertébral (Wallin et al., 1994). Shh induit l'expression de Pax1 et réprime l'expression de Pax3, un facteur régulateur exprimé uniformément dans le somite indifférencié (pour revue, McMahon et al., 2003). L'analyse de l'expression de Pax1 et de Ptc1 chez les mutants Shh(-/-) a permis de suggérer que Shh et Ihh jouent des rôles semi-redondants dans l'induction du sclérotome (Chiang et al., 1996 ; Zhang et al., 2001a). En accord avec cette hypothèse, l'expression de Pax1 est complètement abolie chez les mutants Smo(-/-) indiquant que la signalisation Hh dans son ensemble est à la fois nécessaire et suffisante pour l'induction du sclérotome chez les vertébrés (Zhang et al., 2001a).

Après cette induction, Shh jouerait un rôle dans la survie et la prolifération des progéniteurs du sclérotome. Shh s'oppose à la mort cellulaire induite dans le sclérotome par l'élimination des sources normales de Shh, que sont la notochorde et la plaque du plancher (Teillet et al., 1998). Par ailleurs, Shh induit la prolifération des cellules du sclérotome à la fois *in vivo* et *in vitro* (pour revue, McMahon et al., 2003).

ix. Langue et goût

Shh est exprimé largement à l'intérieur de l'épithélium de la langue au stade E12.5, mais est limité aux précurseurs des papilles sensorielles dites circumvallates et fungiformes jusqu'au stade E14.5 (Bitgood et al., 1995 ; Hall et al., 1999). L'analyse de l'expression de Ptc1 et Gli1 dans la langue embryonnaire suggère que la signalisation Shh est présente non seulement à l'intérieur de l'épithélium des papilles, le site de production des cellules sensorielles, mais aussi dans le mésenchyme sous-jacent (Hall et al., 1999). Cette expression est observée avant la formation des cellules du goût et perdure dans les papilles tout au long de la vie (Miura et al., 2001), suggérant un rôle de Shh dans l'induction initiale et plus tard dans le renouvellement des récepteurs du goût. En utilisant des cultures de langue embryonnaire entière et des inhibiteurs chimiques de la voie Shh, Mistretta et collaborateurs ont démontré que Shh peut réguler l'induction des papilles du goût, de même que leur nombre et leur profil de distribution au cours de fenêtres temporelles précises (Mistretta et al., 2003). Selon le stade de développement où la signalisation Shh est bloquée, de nombreuses altérations du développement de la langue et des papilles apparaissent, suggérant une implication de la voie dans la formation de la langue, le développement des placodes papillaires, de même que dans l'induction, la morphogénèse, la distribution spatiale et la maintenance des papilles (Liu et al., 2004).

2.1.2. Implications pathologiques**2.1.2.1. Malformations humaines congénitales**

Etant donné l'importance de l'implication de la signalisation Hh dans la régulation de nombreux aspects du développement embryonnaire, de la croissance à la spécification des types cellulaires, en passant par la prolifération et la survie, il n'est pas surprenant que des mutations

affectant les gènes *HH* humains et les gènes impliqués dans la transmission ou la régulation de l'activité de la voie soient liées à un grand nombre de malformations humaines congénitales.

i. Malformations des membres

En accord avec le rôle important de Shh dans le développement des bourgeons de membre, des mutations du gène *Shh* ont été associées à des malformations des membres (Hill et al., 2003). Une expression ectopique induite expérimentalement dans la partie antérieure du bourgeon de membre engendre une polydactylie préaxiale. De plus, dans la plupart des modèles murins génétiques de polydactylie préaxiale (tels que extra toes (Xt), sasquatch (Ssq)), une expression ectopique de Shh est observée dans la partie antérieure du bourgeon de membre. Ainsi, des mutations affectant la voie Shh seraient impliquées dans de nombreux cas de polydactylie préaxiale humaine. Cette pathologie est la plus fréquente des malformations affectant les membres et l'une des plus communes de toutes les malformations développementales, affectant approximativement 15 naissances sur 10 000 (pour revues, McMahon et al., 2003 ; Hill et al., 2003).

ii. Malformations affectant de multiples tissus

Bien que *Gli3* soit le seul des gènes *Gli* directement impliqué dans des malformations humaines congénitales, les rôles des trois gènes *Gli1*, *Gli2* et *Gli3* ont été explorés par l'analyse des mutants simples et doubles homozygotes chez la souris. Le spectre des défauts observés chez ces différents mutants présente d'importantes ressemblances avec le syndrome VACTERL rencontré chez l'Homme et caractérisé par des malformations au niveau des membres, des os, du tube digestif, des reins et du coeur (pour revue, Kim et al., 2001), suggérant un lien entre ce syndrome et la voie Hh.

iii. Syndrome de Gorlin

Les individus porteurs d'un allèle défectueux du gène *PTCH1*, conduisant à une réduction d'activité de la protéine correspondante, présentent un ensemble de défauts morphologiques,

notamment au niveau des doigts, du faciès, des dents, des côtes, englobés sous le nom de syndrome de Gorlin (Gorlin, 1995 ; Hahn et al., 1996a ; Johnson et al., 1996). Récemment, Boutet et collaborateurs ont notamment mis en évidence 19 nouvelles mutations et 5 nouveaux polymorphismes dans un groupe de 65 français souffrant du syndrome de Gorlin (Boutet et al., 2003). Pour des raisons qui seront discutées dans le sous-chapitre intitulé « Cancers », les patients atteints du syndrome de Gorlin, aussi appelé « syndrome du carcinome basocellulaire névoïde » ou « syndrome du nevus baso-cellulaire », ont une prédisposition à certaines formes de cancers en plus des défauts congénitaux décrits ci-dessus.

iv. Holoprosencéphalie (HPE)

L'importance du rôle de Shh dans le phénotype des cellules situées le long de la ligne médiane est attestée par le fait que l'haploinsuffisance de Shh chez l'Homme est une cause d'HPE (pour revue, Incardona et al., 2000b), un défaut de développement de la ligne médiane caractérisé par la séparation incomplète du cerveau antérieur ventral en deux hémisphères cérébraux ainsi que par des anomalies crânio-faciales telles qu'une incisive médiane unique, une fente des lèvres ou du palais, une structure nasale ressemblant à un proboscis ou une cyclopie. Chacune de ces malformations peut être considérée comme la conséquence d'une signalisation défectueuse au niveau de la ligne médiane. L'HPE a une incidence de 1 conception sur 250 et à cause de la létalité fœtale sévère associée à ce défaut, elle atteint 1 naissance sur 16 000 (Roessler et al., 2003). La majorité des cas d'HPE est sporadique, mais il existe également des cas familiaux autosomiques dominants. Des études génétiques ont montré que l'HPE est une pathologie polygénique, puisque plus de 10 loci chromosomiques sont impliqués dans l'HPE. En plus de *SHH*, situé en 7q36, ont été mis en jeu, *ZIC2* (13q32), *SIX3* (2p21), *TGIF* (18p11.3), *PTC* (9q22), *TDGF1* (3p21.31) et *GLI2* (2q14) (pour revue, Roessler et al., 2003). Les mutations affectant *SHH* comprennent des mutations non-sens, faux-sens, des délétions et des insertions et constituent plus de 50 % des mutations connues pour l'HPE (pour revue, Roessler et al., 2003). Traiffort et collaborateurs ont démontré, à

l'aide d'un modèle tridimensionnel des protéines humaines SHH-N et SHH-C et d'expériences de mutagenèse dirigée, que la majorité des onze mutations de *SHH* étudiées associées à l'HPE, a des effets délétères sur la disponibilité et l'activité du polypeptide biologiquement actif SHH-N (Traiffort et al., 2004).

v. ***Syndrome de Smith-Lemli-Opitz***

Le syndrome de Smith-Lemli-Opitz (ou SLOS) comprend un nombre de défauts retrouvés chez la souris et chez l'Homme souffrant d'altérations de la signalisation Hh, parmi lesquels la polydactylie et l'HPE (pour revue, McMahon et al., 2003). Le SLOS est causé par des mutations dans le gène de l'enzyme 7-déshydrocholestérol réductase qui intervient dans l'étape finale de la biosynthèse du cholestérol. Le traitement expérimental d'animaux avec des inhibiteurs de la biosynthèse du cholestérol produit un ensemble de phénotypes qui non seulement rappellent le SLOS, mais sont aussi extrêmement similaires au phénotype des souris porteuses de mutations homozygotes pour *Shh* (Chiang et al., 1996 ; Correa-Cerro et al., 2005). Le cholestérol joue plusieurs rôles importants dans la synthèse, le transport et la réception du signal Hh (voir paragraphes I.1.1., I.1.2., I.1.3. de l'Introduction et pour revue Ingham et al., 2001), laissant supposer un impact majeur de ce déficit enzymatique sur la signalisation Hh.

2.1.2.2. Cancers

Les gènes *Hh* interviennent à de nombreuses reprises et au sein de tissus très variés au cours de l'embryogenèse. Du fait de la forte capacité des protéines Hh à promouvoir la prolifération cellulaire, il est attendu qu'une activation inappropriée de cette voie de signalisation au sein des tissus post-nataux puisse contribuer au développement d'une tumeur. Le processus de tumorigenèse peut être dû soit à des mutations qui engendrent la perte des régulateurs négatifs ou la stimulation des effecteurs positifs de la voie, soit à une réactivation aberrante de la voie *Shh* dans les cellules.

i. Mutations affectant les effecteurs de la voie Shh

✓ **Shh et Patched**

En absence de la protéine Hh, le récepteur Ptc réprime l'activité signalisatrice de l'effecteur Smo en aval. La liaison de la protéine Hh à Ptc lève cette répression, engendrant ainsi l'activation des gènes cibles par la famille des facteurs de transcription Gli. La perte de Ptc a le même effet que la liaison de la protéine Hh, parce qu'en son absence, il n'y a plus de répression et donc Smo est libre de transmettre la signalisation en aval. C'est ce mécanisme qui est mis en jeu lors de mutations inactivatrices de *PTCH1* chez l'Homme qui induisent le syndrome de Gorlin associant des défauts morphologiques à une prédisposition au développement de plusieurs variétés de cancers incluant carcinomes baso-cellulaires (CBC), médulloblastomes, fibromes ovariens et moins fréquemment rhabdomyosarcomes, méningiomes, fibrosarcomes et fibromes cardiaques (Beachy et al., 2004). Les tumeurs surviennent lorsqu'un évènement mutagène inactive l'allèle sauvage restant, induisant dans les cellules cibles une activation non contrôlée de la signalisation Hh. Ainsi, *PTCH1* fonctionne comme un supresseur de tumeurs.

Alors que tous les patients atteints du syndrome de Gorlin développent des CBC, les autres types de tumeurs associées à cette maladie surviennent beaucoup moins fréquemment. Par exemple, seulement 5% de ces patients développent des médulloblastomes. Chez les souris *Ptc1* hétérozygotes, plusieurs types de tumeurs sont également retrouvées, avec une fréquence un peu plus importante de médulloblastomes que dans le syndrome de Gorlin, mais une absence de CBC. Néanmoins, l'activation de la signalisation Hh chez des souris transgéniques surexprimant Shh ou une forme activée de Smo dans la peau, engendre la formation de lésions histologiquement indistingables des CBC (pour revue, McMahon et al., 2003). Les raisons de ces différences de prédisposition aux divers types de tumeurs chez l'Homme et le rongeur restent à éclaircir.

Alors que le syndrome de Gorlin est relativement rare, les CBC sporadiques sont la forme la plus commune de cancers humains, représentant un tiers de toutes les tumeurs diagnostiquées et

affectant un individu sur six au cours de sa vie (Landis et al., 1998). Les mutations affectant *PTCH1* ont été identifiées dans près de 40% des CBC (Aszterbaum et al., 1998 ; Gailani et al., 1996 ; Uden et al., 1997 ; Wolter et al., 1997). De plus, la recherche de perte d'hétérozygotie suggère que la fréquence de l'implication de *PTCH1* dans les CBC pourrait être finalement supérieure à 50% (Gailani et al., 1992). L'exposition au soleil est un facteur clef prédisposant aux CBC. En effet, des mutations du gène p53, qui surviennent dans la majorité des CBC, contiennent presque toujours des lésions moléculaires en accord avec des dommages dus aux UV de type B (UVB ; Ziegler et al., 1993). Cependant, moins de 50% des mutations de *PTCH1* dans les CBC portent la signature d'une transition nucléotidique C-à-A caractéristique d'un dommage aux UVB (Gailani et al., 1996). A l'inverse, les CBC survenant chez des patients atteints de xeroderma pigmentosum (XP CBC) ont des mutations du gène *PTCH1* qui portent presque toujours la signature des UVB (Bodak et al., 1999 ; D'Errico et al., 2000 ; Zhang et al., 2001a). Récemment, Couve-Privat et collaborateurs ont aussi mis en évidence l'existence de mutations dans le gène *SHH* trouvées exclusivement chez des patients atteints de XP CBC et pas chez les patients porteurs d'une autre sorte de tumeurs de la peau, les carcinomes cellulaires squameux (Couve-Privat et al., 2004).

Des mutations de *PTCH1* ont aussi été trouvées associées avec une large variété d'autres tumeurs sporadiques. Celles-ci incluent les médulloblastomes (Pietsch et al., 1997 ; Raffel et al., 1997 ; Vorechovsky et al., 1997 ; Wolter et al., 1997), des carcinomes des cellules squameuses de l'œsophage (Maesawa et al., 1998), des méningiomes (Xie et al., 1997), des carcinomes des cellules transitionnelles de la vessie (McGarvey et al., 1998), des trichoépithéliomes bénins de la peau (Vorechovsky et al., 1997) et divers kystes non inflammatoires (Levanat et al., 2000) (Figure 11).

✓ **Smoothened**

Des mutations activatrices dans le gène *SMOH* devraient à priori avoir les mêmes conséquences intracellulaires que l'inactivation de *PTCH1*. Ce type de mutations induisant une activité constitutive de *SMOH* a été identifié dans près de 10 % des cas de CBC sporadiques

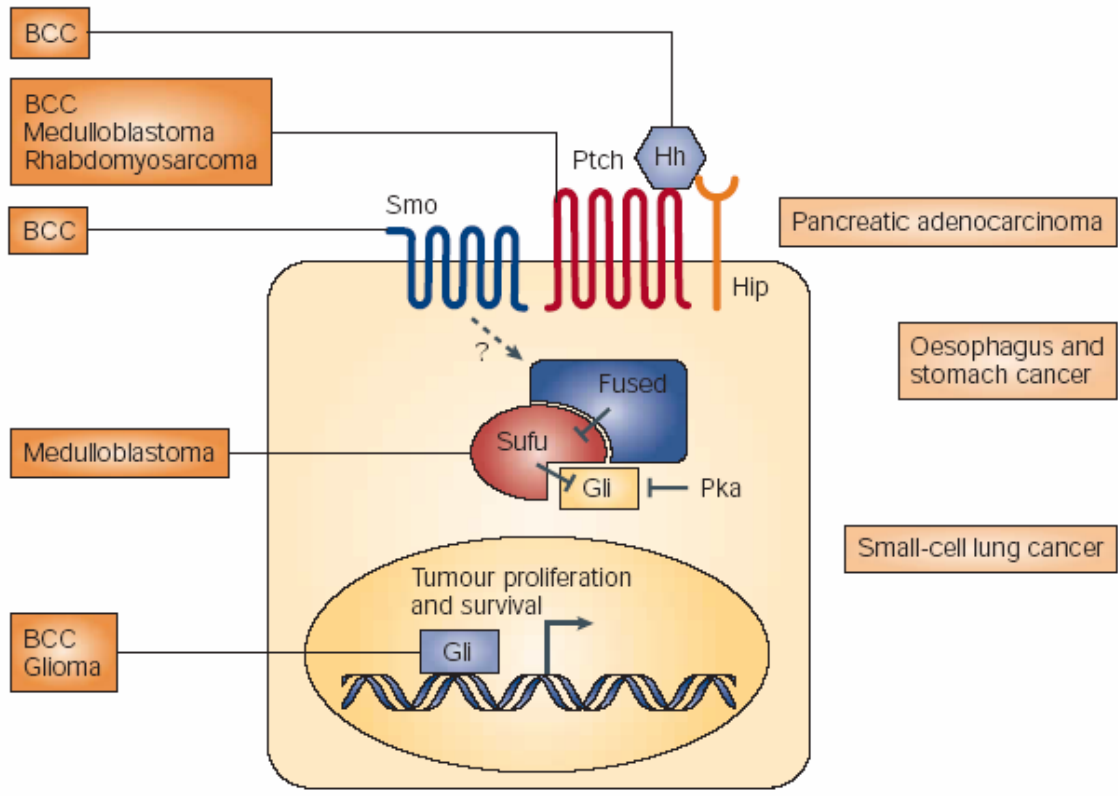


Figure 11 : Voie de signalisation Hedgehog et cancer. Une dérégulation de la signalisation Hedgehog (Hh) peut générer des cancers dans différents tissus. Les mutations *Ptch* sont associées avec des carcinomes basocellulaires (basal cell carcinoma ou BCC), des médulloblastomes et des rhabdomyosarcomes. Des mutations perte de fonction dans le gène Suppresseur de fused (SuFu) sont aussi identifiées dans des médulloblastomes. Des formes constitutivement actives de Smo sont oncogéniques et peuvent fonctionner indépendamment de la liaison du ligand à Ptch. Une forme oncogénique de Shh a été associée aux BCC alors que l'expression ectopique de Gli a été montrée générer des gliomes. Gli est inhibé par la PKA. Une mauvaise régulation de la signalisation Hh a aussi été associée à des adénocarcinomes pancréatiques, des cancers de l'œsophage et de l'estomac, et le cancer du poumon à petites cellules (d'après Di Magliano et Hebrok, 2003).

(Lam et al., 1999 ; Reifenberger et al., 1998 ; Xie et al., 1998) et a aussi été détecté dans des cas de médulloblastomes (Reifenberger et al., 1998).

✓ **Supresseur de Fused**

Des mutations perte de fonction affectant les régulateurs de la voie tels que *SUFU* ont été associées aux processus de tumorigenèse, indiquant ainsi que ces inhibiteurs de la voie HH agissent comme supresseurs de tumeurs. Des mutations dans le gène humain *SUFU* ont été associées à une augmentation de la prédisposition aux médulloblastomes (Taylor et al., 2002).

✓ **Gli**

Alors que les mutations touchant *PTCH1* et/ou *SMOH* sont détectées dans environ 60% des cas de CBC sporadiques, une forte activation transcriptionnelle de *GLII* est observée dans tous les cas de CBC sporadiques (Dahmane et al., 1997 ; Ghali et al., 1999), suggérant que l'activation de la voie de signalisation HH est une étape requise pour la formation de ces tumeurs. En accord avec cette hypothèse, la transcription de l'autre cible transcriptionnelle de la signalisation HH, *PTCH1*, est aussi régulée positivement dans des cas de CBC familiaux et sporadiques (Unden et al., 1997).

ii. Réactivation aberrante de la voie Shh

Au cours des dernières années, plusieurs équipes de recherche ont suggéré que l'activation inappropriée de la voie Hh pourrait résulter de la mise en jeu de mécanismes autres que des mutations touchant les différents effecteurs de la voie (pour revue, Beachy et al., 2004). Ainsi, plusieurs tumeurs pourraient résulter de la réactivation aberrante de la voie, consécutive à des agressions extérieures du tissu considéré, qui induirait alors une augmentation de la prolifération des cellules progénitrices persistant dans la plupart des tissus adultes (pour revues, Pasca di Magliano et al., 2003 et Beachy et al., 2004). Les tissus concernés sont ceux où la voie Hh joue un rôle lors de leur développement chez l'embryon. Les cancers du poumon à petites cellules (Watkins et al., 2003) et les carcinomes de l'appareil digestif (Berman et al., 2003), du pancréas (Thayer et

al., 2003) et de la prostate (Sanchez et al., 2004) pourraient être consécutifs à ce type de dérégulation. Contrairement à l'activation ligand-indépendante qui survient dans les tumeurs associées au syndrome de Gorlin, l'activation de la voie de signalisation dans ce type de tumeurs requiert la présence du ligand, comme le démontrent les expériences utilisant des anticorps bloquants anti-Hh. De plus, curieusement, le facteur limitant dans ce type de tumeurs est, non pas l'expression du ligand lui-même, mais la capacité des cellules à répondre au ligand. Ainsi, dans les tumeurs de la prostate, le facteur limitant est SMO qui n'est pas exprimé dans le tissu prostatique normal (Karhadkar et al., 2004).

iii. Mécanismes moléculaires impliqués dans les processus de tumorigenèse liés à la voie Shh

Le mécanisme de tumorigenèse associé à l'hyperactivation de la voie Hh n'est pas encore complètement élucidé, cependant plusieurs travaux ont rapporté l'activité de Shh au niveau du cycle cellulaire (pour revue, Pasca di Magliano et al., 2003). Dans un modèle de cellules épithéliales de CBC, l'expression de Shh empêche les cellules de sortir des phases S et G2/M du cycle cellulaire en réponse aux signaux de différenciation et bloque aussi l'arrêt de croissance induit par p21, ce qui provoque l'apparition d'une prolifération à long terme (Fan et al., 1999). Par ailleurs, il a été suggéré que PTCH1 pourrait, en absence de signal Hh, directement affecter la localisation subcellulaire de la cycline B1, et de ce fait, altérer le point de transition entre les phases G2 et M en changeant la localisation du facteur promoteur de la phase M (M-phase promoting factor ou MPF) (Barnes et al., 2001).

Une autre cible de la signalisation Hh est l'oncogène n-Myc dont l'expression apparaît régulée par la signalisation Hh dans des cultures de cellules granulaires du cervelet (Kenney et al., 2003). La voie pourrait réguler les facteurs de transcription Myc au sein d'autres tissus, où ces facteurs sont d'importants inducteurs de la prolifération.

II. LES CELLULES SOUCHES NEURALES

Les cellules souches neurales (CSN) sont les plus immatures des progéniteurs du système nerveux et sont définies par leur capacité à s'auto-renouveler par division symétrique aussi bien qu'à donner naissance à des progéniteurs plus matures de tous les lignages neuraux par division asymétrique (multipotentialité). Bien que de nombreuses études soutiennent l'hypothèse d'une plasticité des cellules souches qui permettrait à une cellule souche de donner n'importe quel type cellulaire, l'analyse des cellules souches embryonnaires est plutôt en faveur de cellules souches dont le devenir et les potentialités semblent prédéterminés régionalement et temporellement, notamment grâce aux facteurs et voies de signalisation qui interagissent avec elles. Ces signaux environnementaux pouvant influencer le destin des CSN et/ou augmenter leur plasticité, leur identification et leur caractérisation constituent un atout formidable pour l'élaboration de nouvelles thérapies pour combattre les maladies neurodégénératives.

1. Au cours du développement

La découverte des CSN a pris ses racines dans les études réalisées sur l'hématopoïèse et sur le développement neural des invertébrés (pour revue, Temple, 2001). Les premiers travaux ont permis d'isoler des cellules souches à partir du SNC (Temple, 1989 ; Cattaneo et al., 1990 ; Reynolds et al., 1992b ; Kilpatrick et al., 1993) et du SNP (Stemple et al., 1992) embryonnaires des mammifères. Dès lors, des cellules souches ont été isolées à partir de nombreuses régions du système nerveux embryonnaire de plusieurs mammifères, l'Homme y compris (Carpenter et al., 1999 ; Uchida et al., 2000 ; Villa et al., 2002 ; Nunes et al., 2003).

Les marqueurs permettant de caractériser les cellules souches du SNC n'étant pas encore parfaitement identifiés (Kawaguchi et al., 2001; Uchida et al., 2000), ces cellules sont identifiées sur la base de leur comportement en culture. Dans des cultures adhérentes, elles produisent de

larges clones contenant des neurones, de la glie et des cellules souches. Elles peuvent aussi être cultivées en suspension et donner des neurosphères multicellulaires (McKay, 1997 ; Rao, 1999 ; Gage, 2000). La formation des neurosphères nécessite de fortes concentrations de mitogènes tels que le facteur de croissance des fibroblastes (bFGF) et le facteur de croissance épidermique (EGF) (Reynolds et al., 1992a ; Davis et al., 1994). Après dissociation en cellules isolées, ces neurosphères donnent naissance à de nouvelles neurosphères (propriété d'auto-renouvellement) et après retrait des facteurs de croissance du milieu de culture, elles peuvent se différencier en neurones et en cellules gliales (propriété de multipotentialité) (Lois et al., 1993 ; Gage, 2000 ; Rietze et al., 2001).

1.1. CSN : cellules souches ou progéniteurs neuraux ?

Si l'on considère que les cellules souches sont des cellules douées de propriétés d'auto-renouvellement perpétuel et de totipotentialité, les CSN présentes chez l'embryon ne peuvent pas être considérées comme « cellules souches » à part entière, car leur nombre diminue de manière drastique à P0 (Temple, 2001), indiquant qu'une grande partie de ces cellules s'est différenciée ou est morte. Il semblerait donc que les CSN de part leur capacité d'auto-renouvellement limitée et leur multipotentialité qui leur permet de générer des astrocytes, des oligodendrocytes et des neurones au sein du système nerveux constitueraient une population de « progéniteurs » plutôt que de « cellules souches » à proprement parler. Le terme « précurseur » est quant à lui réservé aux cellules capables de se diviser mais déjà engagées dans un lignage défini (par exemple : « précurseur oligodendrocytaire »). La disponibilité d'un marqueur spécifique des CSN serait indispensable à leur identification *in vivo*. *In vitro*, il est aussi difficile d'extraire des informations concernant le comportement de la petite fraction de véritables CSN (Galli et al., 2003). En effet, la culture des CSN ne donne pas une population homogène de cellules souches car la plupart se divisent de manière asymétrique afin de générer des neurosphères dans lesquelles, la plus grande partie des

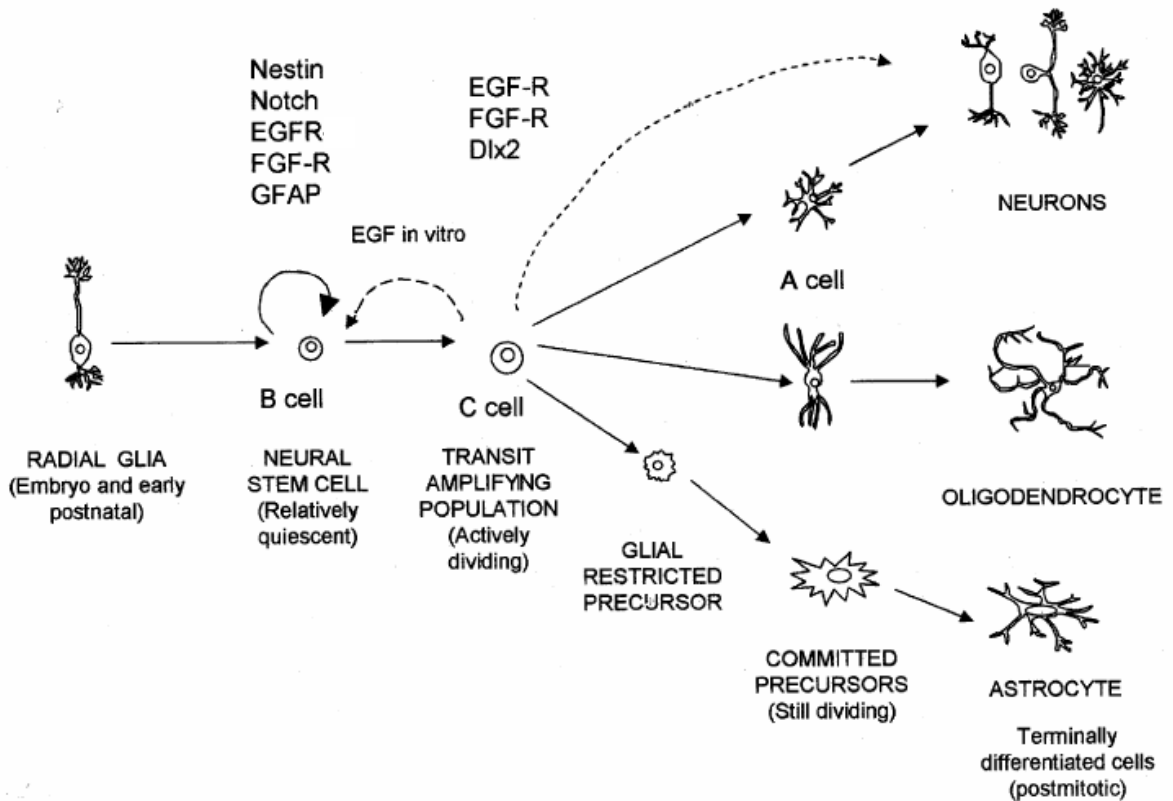


Figure 12 : Modèle de différenciation des CSN dans la ZSV. La persistance de la glie radiale a été confirmée jusqu'au stade post-natal précoce. Chaque type cellulaire a ses propriétés particulières. Les CSN sont multipotentes, capable d'un auto-renouvellement illimité *in vivo* et *in vitro*, et nestin+, Notch+, EGFR+, FGFR+ et GFAP+. Les cellules à amplification transitoire, souvent appelées progéniteurs, peuvent être multipotentes, capables d'un auto-renouvellement limité *in vivo*, peuvent revenir à un statut de CSN en présence d'EGF *in vitro*, et sont nestin+, EGFR+, FGFR+, GFAP- et Dlx2+. Chaque précurseur a une morphologie et des marqueurs spécifiques de son lignage et peut encore proliférer, est nestin- et unipotent. Les neuroblastes (cellules A) peuvent se différencier en différents types neuronaux (d'après Gangemi et al, 2004).

cellules sont des progéniteurs plus matures, souvent multipotents, mais seulement capables d'un auto-renouvellement limité.

Malgré les difficultés d'identification des CSN, il a été établi que, lors de son émergence, la plaque neurale est essentiellement constituée de véritables cellules souches, dont le nombre et les potentialités vont diminuer au fur et à mesure du développement du SNC (pour revue, Temple, 2001).

1.2. Origine et spécification précoce des cellules souches neurales

1.2.1. Origine des CSN

Plusieurs études ont suggéré que la glie radiale pourrait constituer les CSN au cours du développement embryonnaire. Ces cellules apparaissent au jour E13 chez la souris. Elles ont leur corps cellulaire dans la zone germinative et présentent une morphologie bipolaire avec un unique prolongement s'étendant jusqu'à la surface du cerveau en développement leur permettant de jouer un rôle majeur dans la migration des neurones nés dans la zone germinative jusqu'à leur destination finale (pour revue, Kriegstein et al., 2003). Les principales données suggérant pour ces cellules un rôle de cellules souches sont des études de lignage après infection rétrovirale (Noctor et al., 2001) ou marquage lipophile à l'aide de DiI (Miyata et al., 2001) montrant qu'une cellule de la glie radiale peut se diviser de façon asymétrique pour donner des neurones. Plus récemment, leur rôle de précurseurs à la fois neuronal et glial a aussi été suggéré (Malatesta et al., 2003). A l'encontre de cette hypothèse faisant des cellules de la glie radiale des cellules souches embryonnaires, Gregg et Weiss ont montré que les cellules de la glie radiale sont en réalité la progénie des CSN. En effet, des neurosphères issues d'embryons de souris E14 cultivées en présence de facteurs de croissance (FGF-2 et EGF), puis dissociées et rendues adhérentes génèrent de la glie radiale identifiée par le marqueur RC2 (Gregg et al., 2003).

1.2.2. Spécification

La position des cellules souches dans le temps et dans l'espace influence leur spécification, vraisemblablement parce qu'elles répondent à des gradients de molécules de signalisation spécifiques du stade développemental et de la région considérée (Wolpert, 1994). Les neurosphères générées à partir de différentes régions du SNC expriment des marqueurs différents et génèrent une progénie différente. Ainsi, le facteur de transcription Sox2 est exprimé dans les cellules souches du télencéphale et non dans celles de la moelle épinière (Zappone et al., 2000). Les neurosphères dérivant du cerveau antérieur basal produisent significativement plus de neurones GABAergiques, que celles issues des régions dorsales cultivées dans des conditions identiques (He et al., 2001).

Par ailleurs, des progéniteurs du tronc cérébral et du cerveau moyen voient leur potentialité à générer des phénotypes télencéphaliques décliner après le stade E13.5 chez la souris (Olsson et al., 1997). De même, les cellules de la ZSV ne peuvent plus donner de neurones de projection après la naissance (Lim et al., 1997 ; Alvarez-Buylla et al., 2000). Les cellules souches du SNC subissent des divisions cellulaires asymétriques répétées, produisant dans un premier temps essentiellement des neurones puis de la glie (Figure 12). Les cellules souches corticales des stades développementaux plus précoces produisent plus de neurones et ont une tendance plus faible à produire de la glie que celles des stades plus tardifs (pour revue, Gangemi et al., 2004).

1.3. Devenir des cellules souches

Par le biais des divisions symétrique et asymétrique, les CSN doivent conduire à la production du nombre correct de cellules différenciées à tout moment et au bon endroit, mais aussi contrôler l'expansion et la déplétion du réservoir de CSN. Le mécanisme de la division cellulaire asymétrique repose sur la ségrégation asymétrique d'une molécule au sein d'une des deux cellules filles afin que celle-ci adopte un destin cellulaire différent. Plusieurs protéines jouent un rôle important dans la décision d'auto-renouvellement ou de différenciation. La protéine Numb permet

de garder une des deux cellules filles en auto-renouvellement (Petersen et al., 2002). Les souris mutantes *Numb(-/-)* présentent une production massive de neurones précoces dans le cerveau antérieur (Zhong et al., 2000). A l'inverse, la surexpression de *Numb* dans le SNC de poulet augmente la prolifération des cellules précurseurs (Wakamatsu et al., 1999). *Numb* serait aussi impliqué dans les divisions asymétriques des progéniteurs plus matures, y compris les divisions terminales où le choix n'est pas entre un progéniteur et une cellule à un stade plus différencié, mais entre deux cellules avec un stade de différenciation différent (Shen et al., 2002).

La protéine Notch, spécifiquement exprimée par les cellules de la ZSV dans le SNC et dans des neurosphères en culture (Irvin et al., 2001 ; Chojnacki et al., 2003) joue un rôle majeur dans le maintien des cellules dans un statut de cellules souches (Hitoshi et al., 2002). La perte de fonction de Notch induit l'apparition prématurée de neurones, alors que l'expression d'une forme active de la protéine Notch dans un système « perte de fonction » de Notch, supprime la différenciation en neurone et en astroglie de la descendance post-natale des CSN (Hitoshi et al., 2002).

Récemment le facteur de transcription Pax6 a été impliqué dans le processus permettant la transition division symétrique/division asymétrique dans la zone ventriculaire au cours de la corticogenèse. Il jouerait un rôle dans le contrôle de la durée du cycle cellulaire et du taux de progression de la division symétrique vers la division asymétrique au sein des progéniteurs corticaux en développement (Estivill-Torrus et al., 2002). L'activité de Sox2, un autre facteur de transcription identifié dans des neurosphères en culture dérivées de la zone périventriculaire du télencéphale, est essentielle pour le maintien des CSN (Zappone et al., 2000). L'inhibition de Sox2 induit une différenciation prématurée des cellules précurseurs, qui arrêtent leur division et acquièrent des marqueurs neuronaux précoces, alors que son expression constitutive a l'effet inverse, à savoir une inhibition de la différenciation neuronale (Graham et al., 2003).

Le mode de division cellulaire symétrique ou asymétrique au cours de la corticogenèse semble être également influencé par l'orientation du fuseau mitotique des CSN par rapport au neuroépithélium. Ainsi, la division symétrique se déroule dans un plan perpendiculaire au

neuroépithélium, alors que la division asymétrique qui génère un grand nombre de neurones post-mitotiques, se déroule dans un plan parallèle (Chenn et al., 1995).

Enfin un rôle dans la régulation négative de la prolifération des CSN a été récemment attribué au suppresseur de tumeur Pten, une phosphatase lipidique (Groszer et al., 2001 ; Li et al., 2002 ; Morrison, 2002). La délétion de ce gène induit l'hyperphosphorylation des kinases Akt et S6, des effecteurs en aval de la phosphatidylinositol 3-kinase qui a été impliquée dans la survie neuronale et la régulation du cycle cellulaire. Les neurosphères dérivées des souris mutantes Pten (-/-) sont de taille significativement plus importante que celles dérivées des souris sauvages, indiquant que les animaux mutants génèrent plus de cellules souches. Cette prolifération plus importante est attribuée à un raccourcissement du cycle cellulaire (Groszer et al., 2001).

1.4. Spécification du destin cellulaire

La cellule progénitrice multipotente générée par la division asymétrique de la CSN est ensuite engagée sur la voie de la différenciation menant à la production de neurones, astrocytes ou oligodendrocytes. Bien que des gènes spécifiquement impliqués dans cette étape de différenciation aient été identifiés, la division asymétrique et le choix du destin cellulaire ne peuvent pas être entièrement séparés. Plusieurs mécanismes intervenant dans la décision entre division symétrique/division asymétrique jouent aussi un rôle important dans la détermination d'un destin cellulaire particulier.

1.4.1. Différenciation neuronale

Un groupe de gènes codant pour des facteurs de transcription de la famille bHLH considérés comme équivalents des gènes proneuraux de drosophile a été identifié comme capable de promouvoir un destin neuronal générique par différents mécanismes. Deux sous-groupes de gènes apparaissent particulièrement importants : *Mash1*, homologue des protéines proneurales du

complexe achaete-scute de drosophile, et les *Neurogénines* (*Ngns*) qui constituent une famille de trois gènes liés au gène *atonal* de drosophile et définissent des populations distinctes de progéniteurs dans le SNC et le SNP en développement. Mash et les Ngns activent directement l'expression de gènes neuronaux, du type bHLH, tels que NeuroD et Math3 (Cau et al., 1997 ; Cau et al., 2002 ; Fode et al., 1998 ; Ma et al., 1998) considérés comme des gènes de différenciation neuronale, mais aussi impliqués dans la sortie du cycle cellulaire et l'inhibition de la gliogenèse (Morrison, 2001 ; Panchision et al., 2002 ; Schuurmans et al., 2002 ; Ross et al., 2003).

Bien que les facteurs bHLH apparaissent nécessaires pour la détermination du destin neuronal, d'autres signaux sont aussi importants, comme le montre le rôle joué par la famille de protéines CAAT/enhancer-binding (C/EBP), composée de protéines basiques liant l'ADN en « fermeture éclair à leucine » (basic leucin zipper DNA-binding protein). Exprimées dans plusieurs tissus incluant le cerveau en développement et mature (Sterneck et al., 1998), ces protéines fonctionnent comme régulateurs de différenciation, en particulier des cellules engagées dans un destin neuronal par l'expression d'un répertoire de facteurs bHLH. Elles activent les gènes neuronaux précoces en réponse aux facteurs de croissance (par exemple le CNTF) présents dans leur environnement (Menard et al., 2002).

A l'inverse, la voie Notch, via l'activation des gènes *Hes1* et *Hes5* et l'inactivation de Mash1, s'oppose à la différenciation neuronale, favorisant par là même la production de cellules gliales.

1.4.2. Différenciation gliale

Au cours du développement, les astrocytes sont produits pendant une seconde vague de différenciation, après que la plupart des neurones se soient différenciés et aient migré vers leur destination finale. La formation des oligodendrocytes se déroule plus tard encore, lorsque les neurones sont entourés de cellules gliales de support et que les connections synaptiques ont été

établies. Cependant, l'apparition de ces deux types de cellules gliales résulte de progéniteurs communs. Ainsi, une population récemment identifiée, appelée précurseur tripotentiel restreint à la glie (« tripotential glial-restricted precursor », GRP), et issue des CSN totipotentes (Gregori et al., 2002) peut générer des oligodendrocytes et les astrocytes de type 1 et 2 (qui diffèrent par l'expression du marqueur A2B5) (Rao et al., 1998 ; Herrera et al., 2001). Cette population GRP à son tour se différencie en cellules progénitrices d'oligodendrocyte-astrocyte de type 2 (O-2A) qui peuvent générer des oligodendrocytes et les astrocytes de type 2 (Raff et al., 1983 ; Skoff et al., 1991).

Contrairement au processus de différenciation neuronale qui nécessite d'abord l'activation de gènes « proneuraux », la voie de différenciation gliale serait induite par des facteurs solubles de l'environnement capables d'activer directement des gènes gliaux, pendant que la différenciation neuronale est simultanément inhibée. Plusieurs facteurs solubles tels que le bFGF, le facteur de croissance de type insuline (Insulin-like Growth Factor, IGF)-1 (Jiang et al., 2001), l'hormone thyroïde (TH) (Billon et al., 2002), le facteur neurotrophique ciliaire (Ciliary NeuroTrophic Factor, CNTF) (Morrow et al., 2001) et Notch (Tanigaki et al., 2001) influencent le destin cellulaire glial dans le télencéphale en développement, dans les CSN et dans les progéniteurs plus matures *in vitro*.

Très récemment, *Olig2* a été montré intervenant dans le développement des astrocytes dans les cellules de la ZSV au stade post-natal (Marshall et al., 2005). De plus, la neurogénine 3 (Ngn3) transitoirement exprimée par les cellules progénitrices gliales bipotentiels dans la moelle épinière de souris, pourrait jouer un rôle dans la génération à la fois d'astrocytes et d'oligodendrocytes. Ainsi la souris mutante *Ngn3(-/-)* n'exprime plus *Nkx2.2*, un facteur de transcription requis pour l'oligodendrogenèse, et exprime faiblement le marqueur GFAP (Lee et al., 2003).

1.4.3. Différenciation oligodendrocytaire

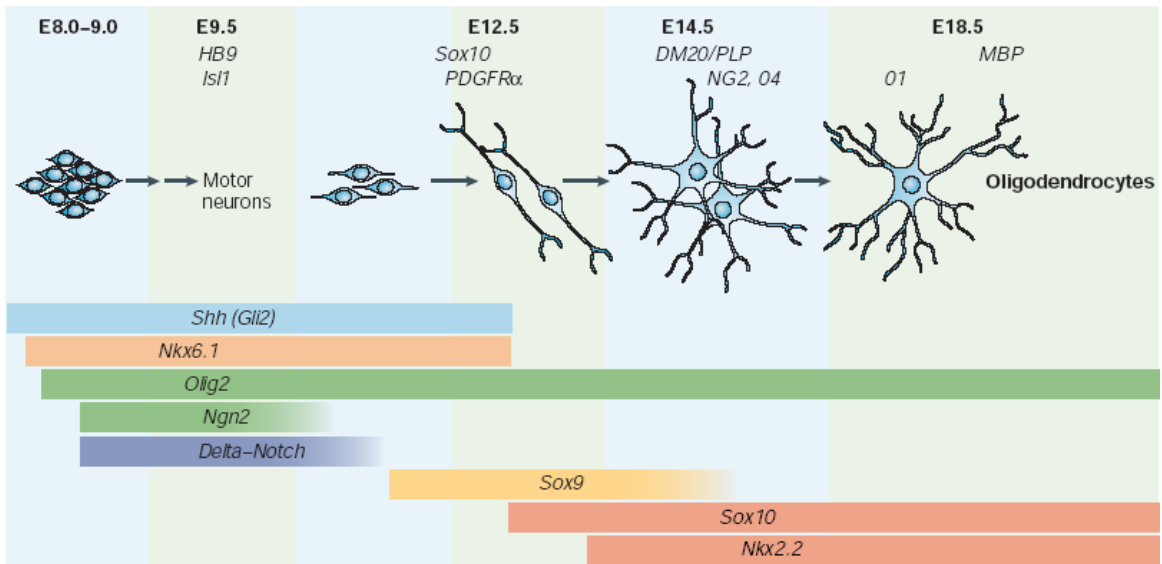


Figure 13 : Des interactions complexes régulent la transition neurone-glie dans le domaine pMN.

Ce schéma résume les interactions impliquées lors de la transition neurone-glie dans la production de la progénie qui a lieu dans le domaine pMN. Au cours de l'embryogenèse, une exposition à Shh est requise jusqu'au moment de la migration des OLP à partir de la zone ventriculaire, reflétant en partie le rôle essentiel de Gli2 dans le maintien de la plaque du plancher. Shh induit l'expression de Olig2 dans la moelle épinière, probablement via des effets transcriptionnels indirects de Nkx6.1 et Nkx6.2. Ces activités sont requises pour que le domaine pMN soit compétent pour produire des motoneuones et des oligodendrocytes. La transition neurone-glie semble impliquer une diminution de Ngn2 à la fin de la première vague de production neuronale, le maintien des précurseurs gliaux jusqu'à la seconde vague par la signalisation Delta-Notch, et l'activité progliale de Sox9. Les phases plus tardives de la maturation des OLP sont indépendantes de Shh et requièrent les fonctions de Sox10 et Nkx2.2 (d'après Rowitch, 2004).

Les oligodendrocytes sont parmi les dernières cellules du système nerveux à se différencier, alors que les précurseurs oligodendrocytaires (OLP) sont spécifiés très tôt au cours du développement (stade E13.5 chez le rat, E11 chez la souris) (Pringle et al., 1993 ; Thomas et al., 2000). Les OLP exprimant le récepteur α du PDGF (PDGFR α) sont issues de la région ventrale de l'éminence ganglionnaire médiane d'où elles migreront de manière tangentielle en direction du cortex cérébral (Tekki-Kessaris et al., 2001). Ces cellules sont d'ores et déjà prédestinées à devenir des oligodendrocytes, car mises en culture à partir de cerveau de rat embryonnaire, elles se différencient exclusivement en oligodendrocytes (Tekki-Kessaris et al., 2001).

Comme mentionné dans le paragraphe I.2.1.1.1. de ce manuscrit, le développement des OLP dans le télencéphale, comme dans la moelle épinière, nécessite la signalisation Shh qui induit les facteurs de transcription de type bHLH *Olig1* et *Olig2*. *In vitro*, la surexpression de *Olig1* dans les précurseurs corticaux induit la génération de cellules OLP (Lu et al., 2000). *In vivo*, l'injection d'un rétrovirus portant le gène *Olig1* stimule la différenciation oligodendrocytaire dans le télencéphale (Lu et al., 2001), alors que l'expression ectopique de *Olig2* dans la moelle épinière induit la différenciation oligodendrocytaire en conjonction avec le facteur de transcription Nkx2.2 (Zhou et al., 2001). Nkx2.2 est aussi sous le contrôle de Shh (Briscoe et al., 1999 ; Pabst et al., 2000). Ce facteur ne coopère avec *Olig2* que dans la maturation des OLPs (Fu et al., 2002), mais pas dans leur génération (Qi et al., 2001). L'expression de *Olig1* et *Olig2* dans le système nerveux en développement précédant l'émergence des OLP exprimant PDGFR α , il a été postulé que ces protéines pourraient induire l'expression de ce récepteur, permettant ainsi aux cellules de répondre aux signaux environnementaux privilégiant ce lignage (Lu et al., 2000 ; Zhou et al., 2000 ; Tekki-Kessaris et al., 2001). La surexpression de *Id2*, un régulateur négatif de l'activité bHLH, inhibe le développement oligodendrocytaire (Wang et al., 2001). Au début de la différenciation des oligodendrocytes, l'expression des *Ids* n'est pas éteinte, mais leur activité est inhibée du fait de leur translocation du noyau vers le cytoplasme vraisemblablement par inhibition de leur interaction avec

les protéines E nécessaires à la localisation nucléaire (Kondo et al., 2000 ; Toma et al., 2000 ; Nakashima et al., 2001 ; Wang et al., 2001).

D'autres facteurs de transcription ont été impliqués dans la différenciation oligodendrocytaire, en particulier *Sox8*, *Sox 9* et *Sox10*, exprimés dans les oligodendrocytes en cours de différenciation et matures. Dans le SNC, *Sox10* est exprimé exclusivement par les cellules du lignage oligodendrocytaire (Kuhlbrodt et al., 1998) et est essentiel pour la génération d'oligodendrocytes matures (Stolt et al., 2002). Le rôle de *Sox9* est plus complexe. Son expression est maintenue dans les progéniteurs oligodendrocytaires exprimant *Sox10*, mais disparaît quand ils commencent leur différenciation terminale (Stolt et al., 2003). De plus, l'ablation conditionnelle spécifique de *Sox9*, en utilisant le promoteur nestine pour conduire l'expression du transgène Cre, engendre une perte sévère d'astrocytes et d'oligodendrocytes (Stolt et al., 2003). Sur la base de ces résultats, Stolt et collaborateurs ont proposé un modèle dans lequel la combinaison *Sox9*-*Olig2* serait essentielle pour la spécification oligodendrocytaire, avec *Sox9* conférant l'identité gliale et *Olig2* le sous-type oligodendrogial. Une redondance fonctionnelle entre *Sox9* et *Sox10* expliquerait pourquoi *Sox10* est essentiel seulement pour la différenciation terminale des oligodendrocytes et non au niveau des OLPs où la protéine *Sox9* est abondante. En dépit de l'expression étendue de *Sox8* qui englobe celles de *Sox9* et de *Sox10*, la souris mutante *Sox8*(-/-) ne montre aucune altération dans la maturation des astrocytes et des oligodendrocytes (Sack et al., 2001), suggérant une redondance fonctionnelle entre *Sox8* et *Sox9/Sox10* (Figure 13).

2. Au stade adulte

Le concept de neurogenèse dans le cerveau mature a vu le jour en 1912, lorsque Allen suggère l'existence de cellules en division dans le cerveau post-natal. Une trentaine d'années plus tard, des études cytologiques révèlent que, dans le cerveau de rongeurs post-natal et adulte, la ZSV des ventricules latéraux est mitotiquement active (pour revues, voir Alvarez-Buylla et al., 2001 ; Rakic,

2002a). A la fin des années 1960, Altman et Dias utilisent la thymidine tritiée comme marqueur radioactif des cellules en phase S du cycle cellulaire et mettent ainsi en évidence des neurones nouvellement générés dans plusieurs régions du cerveau post-natal de rongeurs, telles que l'hippocampe, le cortex cérébral et le bulbe olfactif (Altman et al., 1965 ; Altman et al., 1966 ; Altman, 1969). La démonstration de la production de nouveaux neurones dans le bulbe olfactif et l'hippocampe de rats adultes (Kaplan et al., 1977 ; Kaplan et al., 1984), puis l'utilisation de l'analogue nucléotidique 5-bromo-2'-désoxyuridine (BrdU) comme marqueur immunohistochimique des cellules en phase S (Miller et al., 1988), contribueront ensuite largement à l'accroissement des études sur la prolifération cellulaire dans le cerveau adulte au cours des dix dernières années.

Les cellules souches multipotentes du SNC matures (ou CSN) ont été pour la première fois mises en culture à partir du striatum de souris adulte en présence d'EGF et montrées capables de proliférer et de donner naissance à la fois à des neurones et des astrocytes (Reynolds et al., 1992b). Il s'est avéré plus tard que ces cellules dérivait en réalité de la ZSV (Morshead et al., 1994). Des expériences similaires ont été ensuite réalisées à partir d'hippocampe (Palmer et al., 1997). Depuis, il est devenu clair que des cellules souches sont isolables à partir d'autres régions du SNC, telles que la substance noire (Lie et al., 2002), l'hypothalamus (Song et al., 2002), la moelle épinière (Horner et al., 2000) et les parois du quatrième ventricule (Martens et al., 2002). De plus, des précurseurs neuraux existent aussi dans le cerveau humain adulte (pour revues, Alvarez-Buylla et al., 2004 ; Picard-Riera et al., 2004).

2.1. Caractérisation des zones de neurogenèse adulte

2.1.1. La zone sous ventriculaire du ventricule latéral

La ZSV est localisée le long de la paroi latérale du ventricule latéral. Comme précédemment mentionné, la présence d'un nombre important de cellules en division dans la ZSV est connue

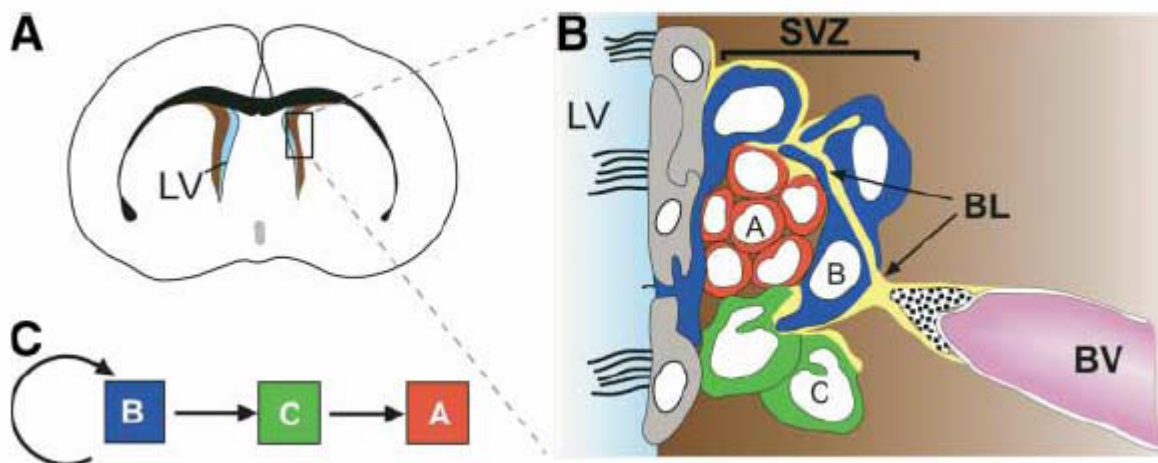


Figure 14 : La neurogenèse adulte dans la zone sous ventriculaire (ZSV). (A) section frontale du cerveau de souris adulte. En bleu clair est représenté le ventricule latéral (LV) contenant le liquide céphalorachidien. (B) Architecture de la ZSV. Les cellules B (en bleu foncé) sont les astrocytes qui constituent les cellules souches de la ZSV. Quelques cellules B sont en contact avec la lumière du ventricule et ont un cil unique. Les cellules C (en vert) se divisent rapidement et sont les cellules à amplification transitoire dérivées des cellules B. Les cellules C donnent naissance aux cellules A (en rouge), les neuroblastes qui migrent en direction du bulbe olfactif où ils deviendront des interneurons. Un vaisseau sanguin (BV, en rose) est représenté avec un macrophage périvasculaire. La lame basale (BL) s'étend à partir du vaisseau et s'intercale entre les cellules de la ZSV. Les cellules épendymaires ciliées (en gris) bordent le ventricule latéral et ont été montrées produire Noggin. Noggin, comme Shh, Notch, TGF α , Eph/ephrines, et VEGF jouent un rôle dans la régulation de cette niche neurogénique. (C) Le lignage de la ZSV (d'après Alvarez-Buylla et Lim, 2004).

depuis près d'un siècle (Allen, 1912) et ces cellules se retrouvent chez beaucoup de vertébrés (pour revue, Ming et al., 2005). Cependant, le destin des cellules nouvellement générées dans la ZSV a longtemps porté à controverses. Le travail pionnier de Joseph Altman suggérait que la ZSV pouvait générer des neurones (Altman, 1969), d'autres études suggéraient que ces cellules servaient de réservoir de précurseurs de cellules gliales (Privat, 1977 ; Privat et al., 1972), ou encore mouraient très tôt après la mitose (Morshead et al., 1992).

2.1.1.1. Caractérisation morphologique de la ZSV

En 1993, Lois et Alvarez-Buylla (Lois et al., 1993), visualisent les cellules de la ZSV en prolifération par injection systémique de thymidine tritiée et montrent que ces cellules, dans des explants en culture, sont capables de générer des neurones et de la glie. La composition cellulaire et l'organisation de la ZSV a été décrite par Doetsch et collaborateurs en 1997 (Figure 14). Les neuroblastes de la ZSV (cellules de type A) migrent en chaînes homotypiques (Lois et al., 1996 ; Wichterle et al., 1997) via un réseau de voies interconnectées distribuées tout le long de la paroi du ventricule latéral (Doetsch et al., 1996). Ces chaînes sont gainées par les cellules de type B qui prolifèrent lentement (Lois et al., 1996). Les cellules B ont des propriétés d'astrocytes, incluant un cytoplasme clair, des faisceaux abondants de GFAP, des filaments intermédiaires positifs, des granules de glycogène et des corps denses (Doetsch et al., 1997). Dispersés le long des chaînes de cellules de type A, se trouvent de petits groupes de cellules de type C à division rapide (Doetsch et al., 1997). La ZSV est séparée du ventricule par une couche de cellules épendymaires multiciliées. Les chaînes de cellules de type A se rejoignent dans les parties antérieure et dorsale de la ZSV afin de former un chemin restreint appelé courant rostral de migration ou RMS (Rostral Migratory Stream) qui aboutit aux bulbes olfactifs.

2.1.1.2. Identification des cellules souches de la ZSV.

Plusieurs résultats expérimentaux indiquent que, dans la ZSV, une population de cellules reconnues par le marqueur astrocytaire GFAP constitue les cellules souches de cette aire cérébrale. Après infusion de la drogue anti-mitotique cytosine- β -D-arabinofuranoside (Ara-C) dans le cerveau de souris adultes pendant 6 jours, les neuroblastes (cellules A) et les cellules C à division rapide ne sont plus détectables dans la ZSV, alors que certains astrocytes et les cellules épendymaires le sont encore (Doetsch et al., 1999). 12 heures après l'arrêt du traitement, les astrocytes de la ZSV commencent à se diviser et donnent naissance à des cellules de type C (ou cellules transitoires à amplification rapide), elles-mêmes à l'origine des neuroblastes (Doetsch et al., 1999). Au bout de 10 jours, la ZSV est entièrement régénérée. Les cellules épendymaires n'incorporent pas les marqueurs mitotiques indiquant que ces cellules ne sont pas les précurseurs primaires des nouveaux neurones, contrairement à ce qu'avaient suggéré Johansson et collaborateurs (Johansson et al., 1999).

En accord avec ces données, l'utilisation d'une lignée de souris (RCAS-AP) exprimant le récepteur pour un rétrovirus aviaire fusionné à la phosphatase alcaline (PA) et placé sous le promoteur de la GFAP, a permis de visualiser les cellules GFAP de la ZSV à l'aide d'un substrat coloré de la PA et de montrer que ces cellules sont à l'origine des neuroblastes migrant vers le bulbe olfactif (Doetsch et al., 1999).

Par ailleurs, des cellules qui possèdent les propriétés de cellules souches (auto-renouvellement et multipotentialité) ont été isolées à partir de la ZSV en utilisant de l'EGF, du FGF ou ces deux facteurs de croissance (Gritti et al., 1999 ; Morshead et al., 1994 ; Rietze et al., 2001). Ces cellules GFAP⁺ répondent à la signalisation EGF à la fois *in vivo* et *in vitro* (Alvarez-Buylla et al., 2002). *In vitro*, elles peuvent s'auto-renouveler et générer à la fois des neurones et des cellules gliales (Doetsch et al., 1999), suggérant qu'une population d'astrocytes de la ZSV (cellules B) correspond aux cellules souches de cette aire cérébrale. De manière intéressante, les astrocytes

prélevés à partir d'autres régions cérébrales, telles que le cortex cérébral, le cervelet et la moelle épinière, peuvent aussi générer *in vitro* des neurosphères, mais seulement s'ils sont isolés à partir de souris âgées de moins de 10 jours (Laywell et al., 2000). Au-delà, seuls les astrocytes de la ZSV conservent cette propriété (Laywell et al., 2000). En quoi ces astrocytes diffèrent de ceux des autres régions cérébrales demeure une question à résoudre.

Plusieurs autres travaux s'opposent à l'hypothèse proposant les cellules épendymaires comme CSN (Chiasson et al., 1999 ; Doetsch et al., 1999 ; Irvin et al., 2001 ; Laywell et al., 2000). Cependant ces cellules jouent toutefois un rôle important au cours de la neurogenèse adulte (Lim et al., 2000). Elles sécrètent l'antagoniste naturel des BMP, noggin, qui produits par les astrocytes de la ZSV, empêcheraient la neurogenèse dans cette région, si leur activité n'était pas inhibée de façon appropriée. L'interaction entre les astrocytes de la ZSV et les cellules épendymaires est donc vraisemblablement critique pour la création de la niche neurogénique (Lim et al., 2000).

2.1.1.3. Devenir des cellules souches nouvellement générées

In vivo, les cellules de la ZSV adulte génèrent de nouveaux neurones qui migrent en direction du bulbe olfactif où ils se différencient en interneurons granulaires et périglomérulaires (Lois et al., 1994 ; Luskin, 1993), un processus qui a lieu aussi chez les primates adultes (Kornack et al., 2001). Il a été suggéré que les cellules de la ZSV pourraient aussi donner naissance à des neurones qui migrent en direction d'autres régions cérébrales dans des conditions non physiologiques comme le cortex (Magavi et al., 2000) ou le striatum (Arvidsson et al., 2002) de rongeurs, ou physiologiques comme le cortex de primates (Gould et al., 1999), bien que ce dernier point soit sujet à controverses (Rakic, 2002b ; Koketsu et al., 2003). De plus, la ZSV post-natale et adulte apparaît être aussi une source de cellules astrogliales et oligodendrocytaires pour de nombreuses régions cérébrales dans des cas physiologiques ou traumatiques

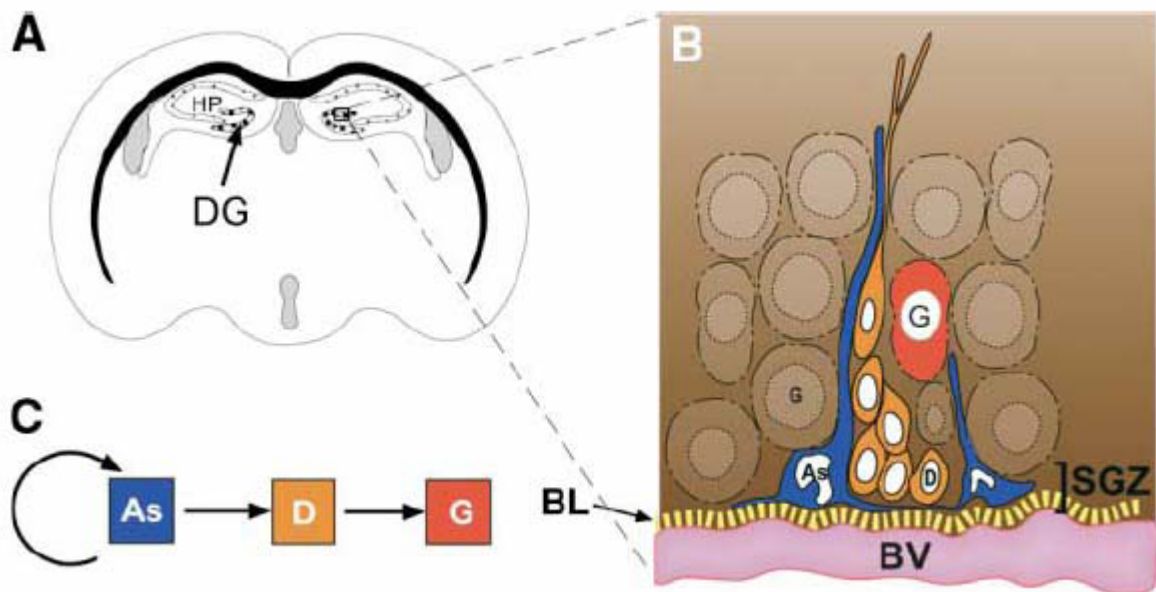


Figure 15 : La neurogenèse adulte dans la zone sous granulaire (ZSG) du gyrus denté de l'hippocampe. (A) section frontale du cerveau de souris adulte au niveau de l'hippocampe (HP). Le gyrus denté (DG) est indiqué par une flèche. La ZSG du DG est agrandie en (B). (B) Architecture de la ZSG. Les astrocytes (As, en bleu foncé) donnent naissance aux progéniteurs (cellules D, en orange), qui après maturation, donnent de nouvelles cellules granulaires (cellules G en rouge). Ces cellules granulaires nouvellement nées s'intègrent dans la couche des cellules granulaires du gyrus denté (cellules G, en marron). Des vaisseaux sanguins (BV, en rose) sont retrouvés proches de la ZSG, et la position de la lame basale périvasculaire (BL) à ce niveau rappelle ce qui a été observé dans la ZSV. Shh et VEGF régulent la niche ZSG *in vivo*. (C) Lignage de la ZSG (d'après Alvarez-Buylla et Lim, 2004).

(pour revues, Goldman, 2003 ; Marshall et al., 2003 ; Picard-Riera et al., 2004). Ce point sera développé dans le chapitre « Discussion » de ce manuscrit.

2.1.2. La zone sous granulaire de l'hippocampe

La zone sous granulaire (ZSG) du gyrus denté de l'hippocampe est située à l'interface entre la couche des cellules granulaires du gyrus denté et le hile de l'hippocampe. Des études *in vitro* indiquent que le gyrus denté adulte contient aussi des CSN (pour revue, Gage, 2000).

2.1.2.1. Caractérisation morphologique de la ZSG

Les études initiales avaient suggéré que de petites cellules sombres indifférenciées pouvaient correspondre aux CSN de la ZSG (Altman et al., 1965 ; Kaplan et al., 1984 ; Kaplan et al., 1977). Suite à l'identification des astrocytes de la ZSV comme CSN de cette aire cérébrale, Alvarez-Buylla et collaborateurs se sont intéressés à l'identification des CSN de la ZSG (Seri et al., 2001). Les astrocytes de la ZSG, visualisés à l'aide des anticorps anti-GFAP, ont leur corps cellulaire localisé dans la ZSG, un prolongement radial qui traverse la couche des cellules granulaires et des prolongements tangentiels courts s'étendant le long de la ZSG (Kosaka et al., 1986). En microscopie électronique, ces cellules présentent des caractéristiques ultrastructurales d'astrocytes similaires à ceux de la ZSV, avec un cytoplasme clair contenant des filaments intermédiaires et des prolongements multiples qui s'intercalent entre les cellules voisines (Seri et al., 2001).

2.1.2.2. Identification et devenir des cellules souches de la ZSG

Afin de déterminer si les cellules GFAP-positives de la ZSG pouvaient générer de nouveaux neurones dans le gyrus denté, une approche similaire à celle ayant permis d'identifier les cellules souches de la ZSV, a été utilisée. L'administration combinée d'Ara-C et de Procarbazol pour tuer

les cellules à division rapide dans la ZSG engendrent l'élimination des progéniteurs (les cellules D, équivalent des cellules C dans la ZSV) et de nombreux astrocytes (Seri et al., 2001). Cependant quelques astrocytes survivent et commencent à se diviser très tôt après la fin du traitement antimitotique. Les cellules D (Figure 15) réapparaissent 4 jours plus tard. L'injection de thymidine tritiée ou de BrdU deux jours après la fin du traitement, quand seuls les astrocytes de la ZSG sont en division, génère des neurones granulaires BrdU+, de même que des astrocytes et des oligodendrocytes un à cinq mois plus tard. L'utilisation des souris RCAS-AP a permis de montrer que des neurones marqués exprimant la PA sont trouvés dans la couche des cellules granulaires. Quelques unes des projections axonales de ces neurones peuvent être suivies vers la région CA3 de la corne d'Ammon indiquant que ces nouveaux neurones sont incorporés dans le réseau normal de l'hippocampe.

2.2. Régulation de la neurogenèse adulte

De nombreuses études ont identifié des hormones stéroïdiennes (telles que les stéroïdes adrénaliens, la testostérone et les oestrogènes) et peptidiques (comme la prolactine) mais aussi des signaux extracellulaires (tels que des facteurs de croissance et des morphogènes) comme régulateurs potentiels de la neurogenèse adulte dans l'hippocampe et dans la ZSV (Tableau 1).

2.2.1. Les facteurs de croissance

2.2.1.1. EGF et FGF-2

Une fois dissociées de la ZSV adulte, les CSN requièrent soit de l'EGF, soit du FGF-2 pour leur auto-renouvellement et leur survie à long terme en culture (Reynolds et al., 1992a ; Kuhn et al., 1997). La capacité des CSN à répondre au FGF-2 est présente dès le stade E8.5, un âge où les récepteurs à l'EGF (EGFR) ne sont pas exprimés par ces cellules. A partir du stade E14.5, les CSN

expriment les EGFR (Tropepe et al., 1999). Chez l'adulte, la grande majorité des cellules de la ZSV exprimant les EGFRs expriment aussi le récepteur 1 du FGF (FGFR1). Ainsi, la plupart des cellules répondant à l'EGF peuvent aussi être stimulées par le FGF-2 (Gritti et al., 1999). En accord avec cette observation, l'augmentation de la neurogenèse de la ZSV et la migration associée des neuroblastes en direction du bulbe olfactif après une infusion d'EGF de 6 jours est similaire à ce qui est observé après une infusion de FGF-2 (Craig et al., 1996). D'autres données suggèrent que ces facteurs de croissance agiraient soit sur les CSN (population relativement quiescente avec un cycle cellulaire de 28 jours) (Morshead et al., 1992 ; Morshead et al., 1994), soit sur les cellules progénitrices transitoires à amplification rapide (cellules TAP avec un cycle cellulaire d'environ 12 h). Par ailleurs, l'EGF pourrait stimuler plus rapidement l'expansion du pool de cellules souches que le FGF-2 en contrôlant différemment la longueur du cycle cellulaire (Gritti et al., 1999).

Cependant des données contradictoires ont démontré que l'infusion intracérébroventriculaire de FGF-2 dans le ventricule latéral engendre une augmentation du nombre de nouveaux neurones dans le bulbe olfactif, alors qu'une infusion d'EGF réduit le nombre de neurones atteignant cette aire cérébrale, mais augmente substantiellement la génération d'astrocytes dans le bulbe olfactif et dans le striatum (Kuhn et al., 1997), suggérant ainsi que l'EGF favoriserait la gliogenèse tandis que le FGF-2 stimulerait la neurogenèse. L'extension de cette étude par Doetsch et collaborateurs suggère que les cellules TAP sont réceptives à l'EGF, et sous l'influence de ce facteur, deviennent invasives, tandis que leur morphologie se rapproche de celle de la glie (Doetsch et al., 2002).

Par ailleurs, dans des conditions lésionnelles, l'infusion de FGF-2 et d'EGF dans la ZSV induit une augmentation de la neurogenèse de 50 fois en réponse à une ischémie (Nakatomi et al., 2002). Enfin, lors d'expériences de transplantation de ZSV saines dans des souris démyélinisées, le pré-traitement des donneurs par du FGF-2 permet d'augmenter la capacité du greffon à former de la myéline dans leur nouvel environnement (Lachapelle et al., 2002).

Facteurs Régulateurs	Prolifération		Survie		Différenciation neuronale		Mécanismes potentiels
	ZSV	ZSG	ZSV	ZSG	ZSV	ZSG	
Souche de la souris		+/-		+/-		+/-	
Genre	n. r.	+/-	n. r.	n. r.	n. r.	n. r.	
Age	-	-		n. r.		-	Signalisation EGFR Corticostéroïdes
Hormones							
Corticostéroides		-					
Estrogènes	n. r.	+		n. r.		n. r.	
Oestrogènes		+					Sérotonine ?
Gestation	+	n. r.					Prolactine
Afférences, neurotransmetteurs							
Dopamine	-	-					Récepteur D2L
Sérotonine	+	+					
Acétylcholine		-	-	-			
Glutamate		-		n. r.			mGluR, NMDAR
Norépinéphrine	n. r.	+		n. r.		n. r.	PAC1 et PKC
PACAP	+	+					
Oxide nitrique	-	n. r. / -	n. r.		+ / n. r.	n. r.	
Facteurs de croissance							
FGF-2	+	n. r.					
EGF	+	n. r.				-	
IGF-1		+		+		+	
Comportement							
Environnement enrichi	n. r.	+ / n. r.	n. r.	+ / n. r.	n. r.	n. r. / +	VEGF
Exposition à une odeur enrichie	n. r.	n. r.	+	n. r.			
Activité physique	n. r.	+	n. r.	+			VEGF
Apprentissage		n. r.		n. r.		n. r.	
Diète		n. r.		+			BDNF, NT3
Stress		-		n. r.			Glucocorticoïdes
Drogues							
Anti-dépresseurs		+					
Opiacés		-					
Métamphétamine		-					
Lithium		+				n. r.	
Stimulations pathologiques							
Ischémie	+	+ / -		+	+	+	NMDAR, CREB
Crises	+	+ / -		+ / n. r.		+ / n. r.	
Inflammation	+ / -	-		-		-	IL-6, TNF α
Maladies dégénératives	+	+					
Diabète		-					

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des facteurs impliqués dans la régulation des cellules progénitrices de la ZSV et de la ZSG. n.r., non renseigné (d'après Ming et Song, 2005).

2.2.1.2. CNTF et LIF

D'autres voies de signalisation ont été impliquées dans le choix entre l'auto-renouvellement via une division symétrique et la stimulation de la différenciation des CSN. La cytokine CNTF, via son complexe de récepteur hétérotrimérique α , les sous unités du récepteur β au LIF et la glycoprotéine 130 (gp130), supporterait l'auto-renouvellement des CSN dans le cerveau mature (Shimazaki et al., 2001 ; Chojnacki et al., 2003). Ainsi l'activation de la gp130 par le CNTF dans les CSN répondant à l'EGF induit l'augmentation de l'expression et de l'activité de Notch1 dans ces cellules, permettant ainsi leur auto-renouvellement et donc le maintien de la population des CSN dans le cerveau antérieur mature (Chojnacki et al., 2003).

2.2.1.3. TGF- α et BDNF

L'injection du facteur « transforming growth factor α » (TGF- α) dans le striatum d'un modèle animal de la maladie de Parkinson induit la migration et la prolifération des progéniteurs de la ZSV en direction du site d'injection du TGF- α , c'est-à-dire dans le striatum où ils se différencient en neurones (Fallon et al., 2000). Chez les animaux âgés, l'injection de TGF- α ou de FGF-2 permet aux cellules de la ZSV de retrouver un taux de prolifération semblable à celui de jeunes adultes. Cependant ce type de traitement augmente le nombre de cellules de la ZSV recrutées à l'endroit de la lésion chez les adultes jeunes, mais pas chez les animaux âgés (Tropepe et al., 1997 ; Decker et al., 2002). Le « brain-derived neurotrophic factor » (BDNF), favorise quant à lui le recrutement des cellules de la ZSV en direction du bulbe olfactif et stimule leur différenciation en neurones dans plusieurs régions cérébrales telles que le striatum, le septum, le thalamus et l'hypothalamus (Zigova et al., 1998 ; Pencea et al., 2001 ; Benraiss et al., 2001).

2.2.1.4. IGF-1 et GDNF

L'injection systémique de l'« insulin-like growth factor-1 » (IGF-1) stimule la prolifération des progéniteurs et induit sélectivement la production de neurones au sein de la ZSG (Aberg et al., 2000). De plus, l'administration simultanée de FGF-2 et d'IGF-1 est requise pour une prolifération maximale des progéniteurs de la ZSG (Aberg et al., 2003). Le « glia-derived growth factor » (GDNF), mais aussi l'IGF-1, augmentent la prolifération et la survie des progéniteurs de la ZSG chez des rats ischémiés (Dempsey et al., 2003). Par ailleurs, l'IGF-1 stimule également la différenciation des cellules progénitrices neurales de la ZSG en oligodendrocytes, vraisemblablement via l'inhibition de la signalisation BMP (Hsieh et al., 2004).

2.2.2. Les morphogènes

2.2.2.1. BMP

L'environnement neurogénique de la ZSV a été attribué en partie à l'interaction antagoniste entre noggin et les BMP (Lim et al., 2000). Les BMP sont des régulateurs négatifs de la détermination neuronale. Noggin reverse cet effet en fixant les BMP, prévenant donc l'activation de la voie (Gross et al., 1996 ; Shou et al., 1999). Les BMP sont exprimées par les cellules de la ZSV alors que noggin est exprimée par les cellules épendymaires (Lim et al., 2000). Cette distribution de signaux interagissant à partir des cellules épendymaires et de la ZSV adjacente fournit vraisemblablement la régulation nécessaire à la neurogenèse et à la gliogenèse dans cette région.

2.2.2.2. SHH

L'implication potentielle de la voie Shh dans les aires de neurogenèse du cerveau adulte a été initialement suggérée par la démonstration de l'activation transcriptionnelle de Ptc dans la ZSV

après injection de la protéine Shh recombinante dans le striatum de rongeurs adultes (Charytoniuk et al., 2002b). Par la suite, une observation similaire fut rapportée après l'administration systémique d'un agoniste de Smo (Machold et al., 2003). La voie Shh a également été proposée comme un régulateur positif de la neurogenèse dans la ZSG du gyrus denté de l'hippocampe de rongeur adulte (Lai et al., 2003). La surexpression de Shh à proximité du gyrus denté augmente le nombre de cellules BrdU+ dans la ZSG. De plus en culture, Shh induit la prolifération des progéniteurs neuraux de l'hippocampe adulte (Lai et al., 2003).

PRESENTATION DU SUJET

A partir de ce contexte bibliographique associé aux importantes découvertes de l'équipe depuis ces six dernières années concernant la description de la voie de signalisation Hh dans le cerveau de rongeurs adultes, le travail de recherche réalisé au cours de mon doctorat s'est dirigé tout naturellement selon deux axes majeurs :

1. le premier ayant comme objectif la caractérisation plus approfondie de la protéine Hip, chez l'embryon et chez l'adulte, de ses profils d'expression aux mécanismes qu'elle emploie afin de réguler négativement la voie de signalisation Hh ;
2. le second étant destiné à analyser les effets de l'activation de la voie Hh sur les progéniteurs cellulaires identifiés dans le cerveau de rongeurs adultes.

Afin de mener à bien ces travaux, des expériences *in vitro* associant transfections cellulaires, analyses biochimiques d'activités biologiques, hybridation *in situ* et immunocytochimie, ont permis de mettre en évidence et de caractériser la présence de formes soluble et membranaire de Hip dans le cerveau adulte, de détailler le profil d'expression spatiotemporel de ce récepteur du stade embryonnaire E13.5 au stade adulte et de suggérer pour la première fois l'existence d'interactions entre les voies de signalisation impliquant respectivement Hip et le neuromédiateur gazeux NO.

Concernant l'étude *in vivo* du rôle de Shh sur les progéniteurs du cerveau mature, des injections intracérébroventriculaires de protéine Shh recombinante et de vecteurs adénoviraux dans le cerveau de souris adulte, suivies par des hybridations *in situ* et les doubles marquages immunofluorescents, ont été réalisées afin de montrer que la voie Shh peut intervenir dans la prolifération et la régulation du destin des précurseurs oligodendrocytaires dans plusieurs régions cérébrales matures.

RESULTATS EXPERIMENTAUX

1. ARTICLE 1

Josée Coulombe, Elisabeth Traiffort, **Karine Loulier**, Hélène Faure, Martial Ruat. *Hedgehog interacting protein in the mature brain : Membrane-associated and soluble forms.* Molecular and Cellular Neuroscience, 25: 323-333, 2004.

RESUME DE L'ARTICLE 1

Le morphogène Sonic Hedgehog (Shh) est essentiel à la mise en place du système nerveux central (SNC), de la formation du tube neural au SNC mature. Sécrété par les deux centres organisateurs que sont la notochorde et la plaque du plancher, Shh est responsable de la ventralisation du tube neural, de la spécification des cellules ventrales incluant les motoneurons et les interneurons de la moelle épinière, les neurones dopaminergiques du cerveau moyen, les cellules sérotoninergiques de la partie ventrale du cerveau antérieur et les oligodendrocytes dans le cerveau et la moelle épinière (McMahon et al., 2003 ; Briscoe et al., 2005). Parmi les protéines capables d'interagir avec Shh à la surface des cellules émettrices ou réceptrices et de moduler la voie de signalisation, Hedgehog interacting protein (Hip) a été caractérisée chez l'embryon comme une protéine membranaire de type 1, exprimée dans les aires ventrales du SNC et capable de lier Shh avec une affinité comparable à celle décrite entre Shh et son principal récepteur Patched 1 (Ptc1). La voie Shh a aussi été caractérisée dans le cerveau mature (Traiffort et al., 1998 ; Traiffort et al., 1999 ; Traiffort et al., 2001) où elle a été montrée activable dans plusieurs régions incluant la zone sous ventriculaire (Charytoniuk et al., 2002b) et proposée intervenir dans la régulation de la prolifération de progéniteurs neuronaux dans l'hippocampe (Lai et al., 2003).

Dans cette étude, afin de mieux comprendre le rôle de cette protéine dans la régulation de la voie Shh dans le cerveau mature, nous nous sommes attachés i) à caractériser *in vitro* par transfections cellulaires et analyses biochimiques, les mécanismes intervenant dans la régulation de la voie Shh par Hip, puis ii) à déterminer le profil d'expression de Hip dans le cerveau de rongeurs adultes par hybridation *in situ* et analyses d'empreintes de western en utilisant un antisérum spécifique de Hip (Ab34) développé par notre équipe.

L'antiserum Ab34 nous a permis de mettre en évidence par analyses d'empreintes de western de cellules transfectées avec l'ADN Hip, l'existence de formes membranaires déjà décrites pour Hip, mais aussi de façon tout à fait inattendue, de formes solubles. Une analyse plus détaillée de la distribution de Hip à l'intérieur de la cellule a été réalisée utilisant des centrifugations différentielles, des approches immunocytochimiques et une analyse en microscopie confocale. L'ensemble de ces données montre que Hip, comme Shh (Traiffort et al., 2001), est distribué à la fois à la surface de la cellule et dans des compartiments intracellulaires. De plus, Hip est associé aux microdomaines lipidiques membranaires (ou « rafts »).

Initialement Hip a été définie comme une protéine transmembranaire de type I comprenant une longue partie amino-terminale débutant par un peptide signal, et se terminant par un domaine hydrophobe responsable de son ancrage à la membrane (Chuang et al., 1999). A l'aide de transfections cellulaires de différentes constructions de Hip « étiquetées » à l'aide d'épitopes Myc et Flag aux extrémités N- et C- terminales de la protéine, nous avons pu analyser plus en détails les propriétés biochimiques de Hip et ainsi mettre en évidence qu'une forme de Hip, pourvue de ses extrémités N- et C- terminales hydrophobes, est détectée à la fois dans les fractions membranaires et dans le surnageant de culture des cellules transfectées.

Afin de déterminer si Hip sous sa forme soluble est capable de moduler le signal Shh, nous avons utilisé un test biologique bien caractérisé, qui permet d'estimer l'activité biologique de Shh en suivant la différenciation des cellules de la lignée C3H10T1/2 en réponse à Shh par mesure de l'activité enzymatique phosphatase alcaline associée. Ainsi, nous avons pu montrer que les formes solubles de Hip peuvent inhiber, de manière dose dépendante, la différenciation des cellules C3H10T1/2 induite soit par le surnageant de culture de cellules transfectées avec l'ADN Shh, soit par la protéine recombinante myrShhN.

L'ensemble de ces données montre pour la première fois l'existence d'une forme soluble de Hip capable, comme la forme membranaire, d'antagoniser l'activité de Shh. De plus, ces résultats suggèrent que l'ancrage de Hip à la membrane pourrait mettre en jeu les domaines EGF identifiés à proximité de l'extrémité C-terminale de Hip plutôt que l'insertion d'un segment hydrophobe à travers la membrane cellulaire.

Par ailleurs, pour mieux comprendre le rôle de Hip dans le cerveau mature de rongeurs, nous avons réalisé des hybridations *in situ* et des analyses d'empreintes de western avec l'antisérum Ab34. Les localisations des transcrits de Hip sont identifiées dans des régions différentes de celles de l'ARNm Ptc, mais majoritairement dans des aires de projection des cellules exprimant Shh, suggérant que dans le cerveau mature, Hip et Ptc peuvent participer de façon complémentaire à la régulation de la signalisation Shh. De plus, la forme soluble de Hip est présente dans le cerveau mature comme l'indiquent nos analyses d'empreintes de western sur les fractions du cervelet adulte après centrifugations successives.

Hedgehog interacting protein in the mature brain: membrane-associated and soluble forms

J. Coulombe, E. Traiffort, K. Loulier, H. Faure, and M. Ruat*

Laboratoire de Neurobiologie Cellulaire et Moléculaire, Gif-sur-Yvette, France

Received 10 June 2003; revised 14 October 2003; accepted 29 October 2003

Hedgehog interacting protein (Hip) is considered as a membrane protein implicated in sequestering the hedgehog (hh) morphogens during embryonic development. Here, we demonstrate that Hip transcription also occurs in cells scattered in discrete brain areas of adult rodents and we identify the presence of membrane-associated and soluble forms of Hip in the mature brain. Moreover, we show that soluble forms of Hip, present in the conditioned medium of HEK293 cells overexpressing Hip, inhibit Sonic hedgehog (Shh)-induced differentiation of C3H10T1/2 cells, a well-characterised response associated with Shh signalling. After transfection in HEK293 cells, Hip partitions with the raft component ganglioside GM1 during density gradient centrifugation. Analysis of tagged Hip constructs reveals that the putative transmembrane domain of Hip is not cleaved suggesting that other mechanisms are implicated in the release of its soluble forms. Taken together, these data are consistent with the involvement of both membrane-associated and soluble Hip in the regulation of Shh signalling in adult neural tissues.

© 2004 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

The morphogen molecule Sonic hedgehog (Shh) displays inductive and proliferative properties along the ventral neuroaxis during embryonic development. Shh signalling is required for the proper generation of various classes of neurons including motor neurons and gabaergic interneurons in the ventral neural tube, dopaminergic neurons in the midbrain, serotonergic neurons in the hindbrain, and participates in oligodendroglia commitment. Shh signalling also regulates the proliferation and differentiation of granule cell precursors in the developing cerebellum and the growth of dorsal structures including the cortex and superior colliculi (Ingham and McMahon, 2001; Marti and Bovolenta, 2002; Ruiz i Altaba et al., 2002a). Moreover, Shh secreted from the floor plate displays a chemoattractant activity for commissural axons in embryos (Charron et al., 2003). The Shh signalling

pathway has also been characterised in the mature brain (Traiffort et al., 1998, 1999, 2001), where it can be activated in various structures including the subventricular zone (Charytoniuk et al., 2002a), and it has been proposed to regulate hippocampal stem cell proliferation (Lai et al., 2003).

Activation and regulation of Shh signalling are complex and have been studied mostly during embryonic development. Binding of Shh to the multipass transmembrane protein Patched (Ptc) results in the relief of inhibition exerted by Ptc on Smoothed (Smo), a heptahelical protein thought to belong to the G-protein coupled receptor superfamily. Smo is then responsible for activation of the transcription factors of the Gli family resulting in the transcription of target genes. Thus, newly synthesised Ptc protein buffers exogenous Shh, a feedback mechanism aimed at diminishing Shh signalling (Ingham and McMahon, 2001). At the cell membrane, the glycoprotein hedgehog interacting protein (Hip) binds Shh with high affinity and acts as a negative regulator of hedgehog (hh) signalling in embryos. Hip is expressed next to hh expressing regions and transgenic mice overexpressing Hip in the cartilage display a phenotype reminiscent of Indian hh (Ihh) knockout mice (Chuang and McMahon, 1999). The growth-arrest-specific gene GAS1, which is induced by Wnt signalling in the dorsal somites, encodes a soluble hh binding protein proposed to antagonize Shh activity in the developing dorsal neural tube (Lee et al., 2001). The transport and release of hh proteins between cells involve Dispatched, a protein homologous to Ptc, which participates in hh release from the synthesising cells (Burke et al., 1999; Ma et al., 2002), and Tout-velu, an integral membrane protein belonging to the family of EXT proteins, which allows hh trafficking across the target cells (Bellaïche et al., 1998).

Identification of human mutations associated with Shh, Ptc, Smo and other genes linked to Shh signalling has unravelled the importance of the pathway not only during embryogenesis but also in adulthood (Ruiz i Altaba et al., 2002a; Wetmore, 2003). Ptc and Smo mutations have been reported in basal cell carcinoma and primitive neuroectodermal tumors, which are also observed in patients affected with Gorlin's syndrome linked to Ptc mutations. Shh mutations are responsible for holoprosencephaly which is associated with mild to severe developmental defects of the brain and face. Studies conducted in animal models have suggested that molecules aimed at modulating the Shh signalling pathway might be of therapeutic use for the treatment of brain (Berman et al.,

* Corresponding author. Laboratoire de Neurobiologie Cellulaire et Moléculaire, UPR 9040 CNRS, 1 Avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette, France. Fax: +33-1-69-82-36-39.

E-mail address: ruat@nbcm.cnrs-gif.fr (M. Ruat).

Available online on ScienceDirect (www.sciencedirect.com.)

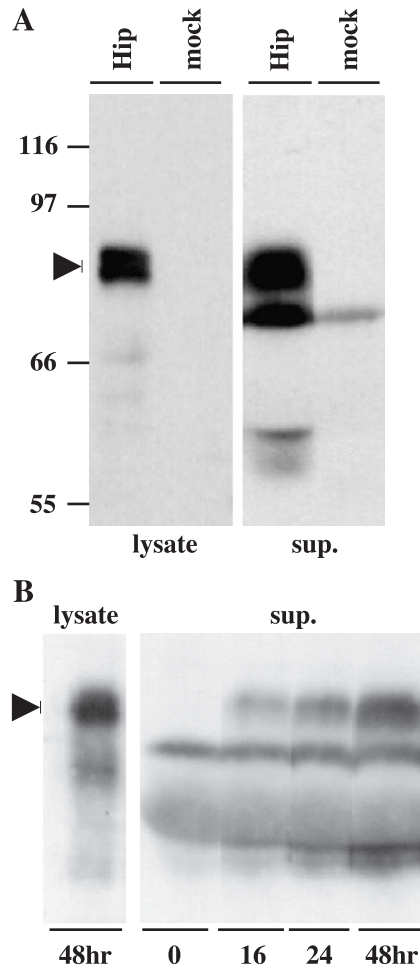


Fig. 1. Hip in lysates and culture supernatants of transfected HEK293 cells. (A, B) Western blot analysis of lysates (4 μ g) or culture supernatants (sup., 12 μ l) from HEK293 cells transfected with Hip (Hip) (A, B) or control (mock) (A) constructs, using the 34Ab rabbit anti-Hip serum. Hip was identified as a 83- to 88-kDa doublet (arrowhead in A and B) both in lysate and supernatant from Hip but not from mock-transfected cells. Molecular weight markers (kDa) are indicated on the left. (B) Time course of soluble Hip release in the cell medium. Samples of the culture supernatant were taken at the time indicated whereas cell homogenate was harvested after 48 hours (h). This experiment is representative of 3.

2002; Taipale et al., 2002), skin (Williams et al., 2003) and lung (Watkins et al., 2003) tumors, nerve injury and peripheral neuropathy (Engber et al., 1999; Frank-Kamenetsky et al., 2002; Pepinsky et al., 2002), as well as neurodegenerative diseases (Allendoerfer and Dudek, 2002).

In the present study, we identify strong expression of Hip by RNA in situ hybridisation (ISH) in the mature rodent nervous system. We demonstrate that Hip protein is expressed as soluble and membrane-associated forms in the adult brain using an anti-Hip serum that we developed. In addition, we show that medium conditioned by Hip-transfected cells inhibits Shh signalling activity in C3H10T1/2 cells. These observations strongly suggest that Hip participates in Shh signalling in the mature brain and point to a possible role for soluble Hip in regulating the Shh pathway in the adult brain.

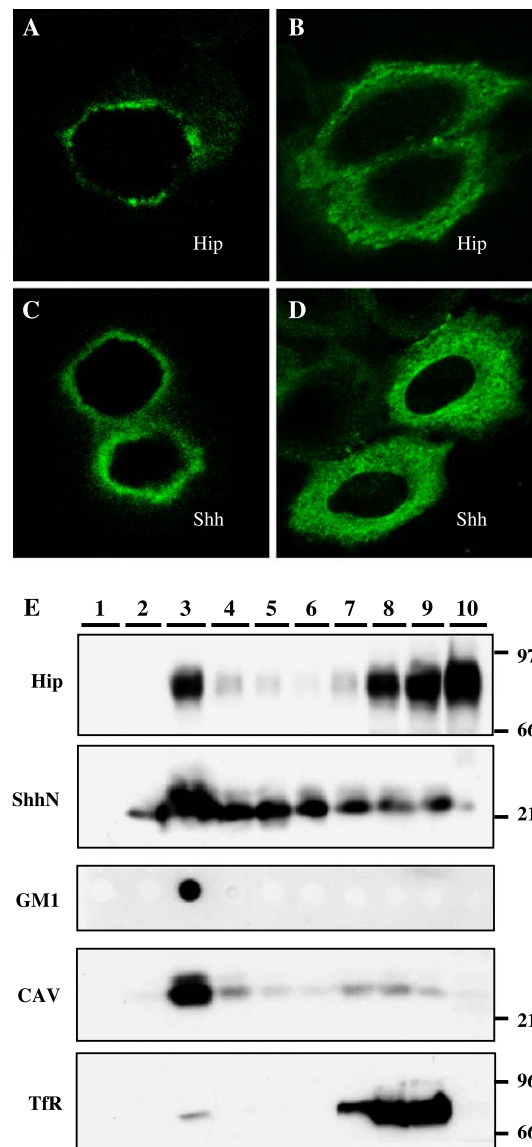


Fig. 2. Hip and Shh are distributed at the cell surface and in intracellular compartments and are associated with raft-like microdomains. (A–D) CHO-K1 cells were transfected with Hip (A, B) or Shh (C, D) constructs and then immunostained using the specific 34Ab Hip (A, B) or 167Ab ShhN (C, D) antisera without (A, C) or with (B, D) cell permeabilisation. The immunofluorescent staining signal identified by confocal microscopy without permeabilisation was consistent with the localisation of Hip and Shh at the cell membrane (A and C, respectively), whereas its widespread membrane and intracellular distribution observed after permeabilisation indicated that both Hip and Shh were present in intracellular compartments (B and D, respectively). (E) Hip and ShhN are associated with detergent-insoluble membrane lipid microdomains. Lysates from HEK293 cells transfected with Hip or Shh constructs were solubilised with 0.5% Triton X-100 at 4°C and separated by sucrose density gradient. Fractions 1 to 9 (from the top down) and insoluble pellets (fraction 10) were analysed by Western blotting with Hip or ShhN antisera, as well as with caveolin-1 (CAV) and transferrin receptor (TfR)-specific antibodies. Dot blot detected ganglioside GM1 with cholera toxin β -subunit. Hip and ShhN were observed in fraction 3 corresponding to cholesterol-rich microdomains associated with GM1 and CAV. Molecular weight markers (kDa) are indicated on the right.

Results

Hip is released into the medium of transfected cells

To further characterise the biochemical properties of Hip in cells and tissues, we have developed a specific polyclonal antiserum (34Ab) raised against 273 amino acid residues of mouse Hip (Chuang and McMahon, 1999) starting from amino acid 141 and fused to GST. The 34Ab antiserum reactivity was first evaluated by Western blot analysis against mouse Hip transiently transfected in HEK293 (HEK(Hip)) cells. Two intense polypeptides migrating

with a mobility corresponding to relative molecular masses of 83 and 88 kDa were identified in both lysate and supernatant from HEK(Hip) cells (Figs. 1A, B). In addition, two minor polypeptides of lower molecular weight (58–60 kDa), representing possibly proteolytic breakdown of the protein doublet, were also detected in the supernatant (Fig. 1A). Signals corresponding to the 83–88 kDa and 58–60 kDa polypeptides were not present in preparations from HEK293 cells transfected with an empty vector (HEK (mock)), or when the serum was preincubated overnight with an excess of immunising antigen, and they were not affected by serum incubation with an excess of GST protein indicating their specificity (Fig.

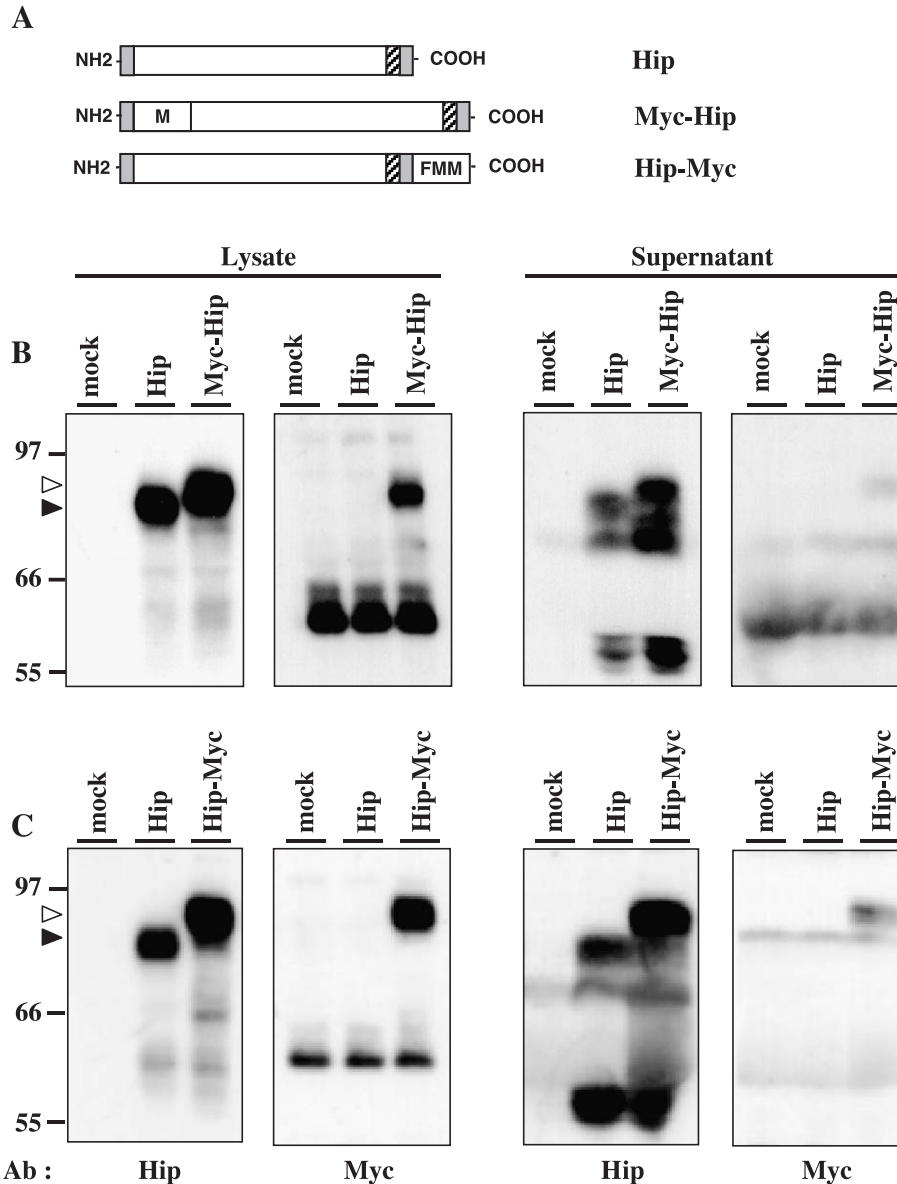
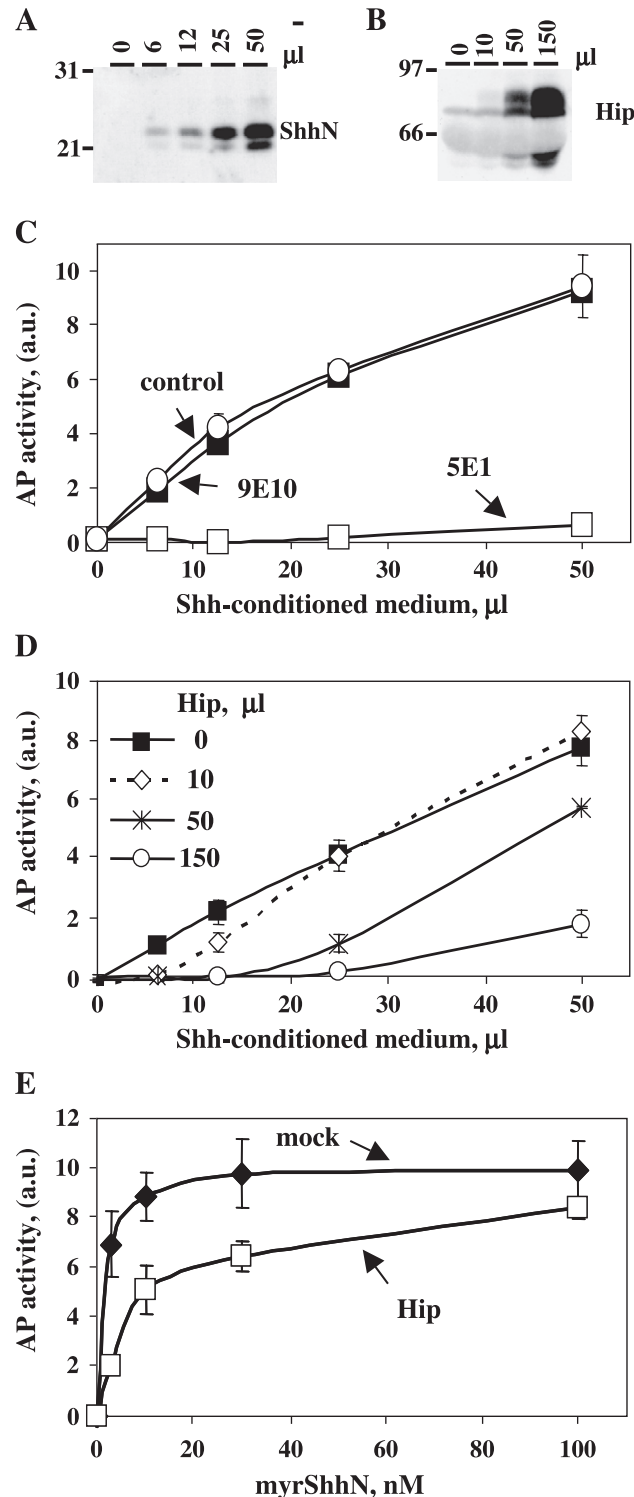


Fig. 3. Biochemical analysis of amino- and carboxyl-terminal tagged forms of Hip. (A) Schematic representation of Hip, Myc-Hip and Hip-Myc constructs. A Myc (M) epitope was inserted between amino acid residues 23–24 (Myc-Hip) or a Flag-Myc-Myc (FMM) after the last amino acid residue of Hip (Hip-Myc) as described in Experimental methods. The grey boxes correspond to putative hydrophobic domains, the hatched box to putative EGF-like domain (Chuang and McMahon, 1999). (B, C) Lysates (10 µg) and supernatants (12 µl) from HEK293 cells transfected with Hip, Myc-Hip, Hip-Myc or control (mock) constructs were analysed by Western blot using 34Ab antiserum or Myc 9E10 antibody. Myc-Hip and Hip-Myc were detected in both the cell lysate and the medium as a 91- to 96-kDa signal (white arrowhead) with both antibodies, whereas Hip was identified as a 83- to 88-kDa signal (black arrowhead) with Hip 34Ab. Molecular weight markers (kDa) are indicated on the left.

1A and data not shown). An additional 76 kDa signal was detected in the supernatant of both HEK(mock) and HEK(Hip) cells, and was therefore considered to represent nonspecific binding of the antiserum in the supernatant of HEK(mock) cells. This signal was stronger in HEK(Hip) supernatant indicating that an additional Hip peptide, possibly another breakdown product, had migrated with a similar mobility (Fig. 1A). Soluble Hip increased with time in the

culture medium and was already identified 16 h after transfection (Fig. 1B). Quantification of the intensity of the 83–88 kDa Hip spot showed a further increase of 2- to 3-fold after 48 h. At that time, soluble Hip represented $55 \pm 4\%$ of the total material present both in the homogenate and the culture medium (mean \pm SE, $n=5$). Soluble Hip did not reflect dying cells, since 48 h after mock or Hip transfection, dead cells represented 5–8% of the total.

Hip is expressed at the cell membrane and in intracellular compartments and is detected in raft-like microdomains



To determine the subcellular localisation of Hip, we submitted the lysate of HEK(Hip) cells to ultracentrifugation. The 83–88 kDa protein doublet was enriched in the membrane fraction whereas a faint signal corresponding to the 83-kDa protein was identified in the soluble fraction representing less than 5% of the membrane-bound Hip as estimated by quantification of the film from the ECL blot (data not shown). These data showed that Hip was predominantly membrane-associated in HEK(Hip) cells. We then examined the distribution of Hip transiently transfected in CHO-K1 (CHO(Hip)) cells by confocal microscopy using 34Ab antiserum. Hip was immunodetected at the surface of nonpermeabilised CHO(Hip) cells (Fig. 2A). However, after cell permeabilisation, Hip was also observed on endoplasmic reticulum-like structures inside the cells (Fig. 2B). In comparison, using 167Ab ShhN antiserum (Traiffort et al., 2001), we observed a ring of immunofluorescent signal at the membrane of nonpermeabilised CHO-K1 cells transiently expressing Shh (CHO(Shh), Fig. 2C), in agreement with the association of processed ShhN with the plasma membrane (Guy, 2000). When CHO(Shh) cells were fixed and permeabilised, an intense intracellular signal was observed (Fig. 2D), in accordance with the presence of both processed ShhN and uncleaved Shh protein (Guy, 2000). The specificity of the labelling was attested by the absence of cell staining when mock-transfected cells were incubated with 34Ab or 167Ab antisera (data not shown).

We have previously shown that hamster and rat brain ShhN is found in detergent-insoluble membranes characterised as raft-like microdomains (Traiffort et al., 2001). To investigate the potential distribution of Hip and ShhN in such domains of transfected cells, we solubilised extracts from HEK(Hip) and HEK(Shh) cells and centrifuged them to equilibrium on a sucrose density gradient. Hip

Fig. 4. Soluble Hip inhibits Shh signalling. (A, B) Western blot analysis of increasing volumes of conditioned media from HEK(Shh) (A) or HEK(Hip) (B) cells using ShhN 167Ab or Hip 34Ab antisera, respectively. Soluble ShhN and Hip were identified as major 22 and 83–88 kDa signals, respectively. Molecular weight markers (kDa) are indicated on the left. (C–E) Analysis of ShhN-induced C3H10T1/2 differentiation. (C) Shh-conditioned medium analysed in (A) induced differentiation of C3H10T1/2 cells as monitored by increased AP activity. This response was antagonised by the ShhN blocking monoclonal antibody 5E1 (10 μ g/ml), but not by its inactive-matched control isotype 9E10 (10 μ g/ml). (D) Hip-conditioned medium (analysed in B) inhibits the ShhN (analysed in A)-induced AP activity in a dose-dependent manner. (E) AP activity in C3H10T1/2 induced by myristoylated ShhN (myrShhN) was inhibited by Hip-conditioned medium (analysed in A, 150 μ l) as compared to mock-conditioned medium (150 μ l). The experiments shown are from a single experiment and are representative of three to five experiments. AP activity values expressed in arbitrary units (a.u.) are means \pm SEM of quadruplicates.

was identified as a 83–88 kDa signal by Western blot analysis in fraction 3 corresponding to the detergent-insoluble glycolipids and a significant proportion was found in fractions 8–10. ShhN was identified as a 22-kDa signal and was predominantly found in fraction 3 (32% of total material) from HEK(Shh) extracts but was also found in fractions 4 to 9 indicating that it was not only restricted to raft domains. GM1 lipid and caveolin 1-like proteins were concentrated in fraction 3 in agreement with their association with caveolar/raft microdomains, whereas the transferrin receptor (TfR), a non-raft protein, was concentrated in fractions 7–9 confirming the quality of the preparation (Fig. 2E). These data show that Hip and ShhN are both present in light density detergent-resistant (raft-like) microdomains upon transfection.

Biochemical analysis of secreted Hip protein

Our data suggested that Hip was predominantly membrane-associated in the cell, but was also released in the medium. In contrast to our results, a Myc-tagged epitope form of Hip (Myc–Hip) obtained by inserting a Myc epitope between amino acid residues 23 and 24, was found associated with membranes of transfected COS-7 cells, but absent from the corresponding culture medium (Chuang and McMahon, 1999). However, a Myc–Hip construct lacking the last 22 amino acid residues (Myc–Hip Δ C22) representing a putative transmembrane domain, was found both membrane-associated and present in the supernatant of transfected COS-7 cells, indicating the importance of this domain for membrane anchoring (Chuang and McMahon, 1999). In our experiments, we postulated that Hip was released in the cell culture medium as a soluble form after cleavage of this putative carboxyl transmembrane domain. To test this hypothesis, we generated a Myc–Hip construct similar to that described previously (Chuang and McMahon, 1999), and a Hip–Myc construct by inserting a Myc

epitope (Flag–Myc–Myc) after the last amino acid (Fig. 3A). Then, we used Western blots to analyse the lysates and supernatants from HEK293 cells transfected with Hip, Myc–Hip, Hip–Myc or a control vector, using 34Ab Hip antiserum or 9E10 Myc antibodies. Signals corresponding to 91–96 kDa polypeptides were detected with the rabbit polyclonal Hip 34Ab serum in the lysates and the supernatants from HEK293 cells transfected with Myc–Hip and Hip–Myc constructs whereas signals corresponding to 83–88 kDa polypeptides were detected in preparations from cells transfected with the Hip construct as previously observed (Figs. 3B, C). These results were in agreement with an expected increase of Hip molecular weight resulting from the insertion of the Myc-tags. The expression levels of Hip, Myc–Hip and Hip–Myc, as detected with Hip 34Ab serum, were similar in the lysates and the supernatants indicating that they were synthesised and released in the cell medium in a comparable manner. Using the less-sensitive monoclonal Myc antibody, the 91–96 kDa polypeptides were only detected in the lysates and the supernatants of cells transfected with the Myc constructs (Figs. 3B, C). Their detection by both antibodies in the supernatant of cells transfected with the Myc constructs indicates that cleavage of the Myc-epitope does not occur in these constructs, and suggests that the hydrophobic carboxy-terminal domain present in Hip is not sufficient for anchoring the protein at the cell membrane.

Soluble Hip inhibits Shh-induced differentiation of C3H10T1/2

We thought that soluble Hip present in the supernatant of transfected cells would affect Shh signalling. We took advantage of the recently characterised Shh responsive cell line C3H10T1/2 and the cell-based bioassay which estimates differentiation of these cells occurring in the presence of Shh by a measure of their alkaline phosphatase (AP) activity (Pepinsky et al., 1998; Zeng

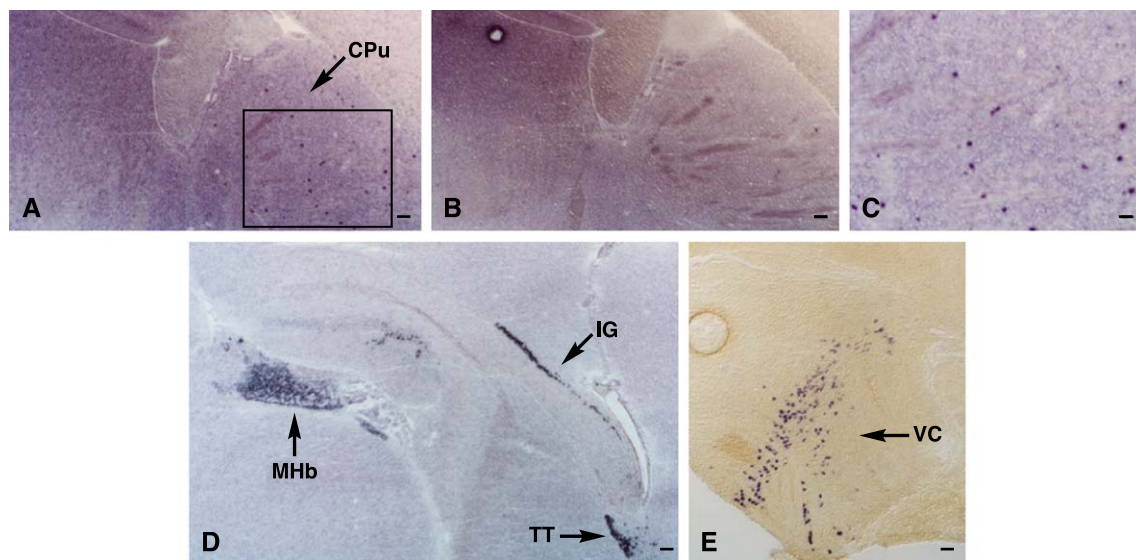


Fig. 5. Distribution of Hip transcripts in the mouse brain. ISH experiments using an antisense (A, C–E) or a sense (B) Hip cRNA probe were performed on sagittal brain sections. (A) Hip was expressed in scattered cells of the caudate putamen (CPu). The box indicates the area enlarged in (C). (B) No signal was detected with the sense riboprobe. (D) A dense staining was detected in cells located in the medial habenula (MHb), the indusium griseum (IG) and the tenia tecta (TT). (E) Hip-expressing cells were detected in the ventral cochlear nucleus (VC). Sections corresponded to the following lateral levels according to the atlas of Paxinos and Franklin, 2nd edition: 0.96 mm (A–C), 0.24 mm (D), 2.28 mm (E). Scale bars correspond to 200 μ m in A, B, D; 100 μ m in C, E.

et al., 2001). As a source of Shh and Hip, we used conditioned media from HEK(Shh) and HEK(Hip) cells containing a soluble form of ShhN and Hip, respectively, as shown by Western blot analysis (Figs. 4A, B). First, we demonstrated that AP activity induced by Shh-conditioned medium was reproducible and that it was completely blocked by a low concentration (10 $\mu\text{g/ml}$) of the Shh neutralising monoclonal antibody 5E1, but not by an isotype-matched control (Fig. 4C). This confirmed that the response was Shh-dependent in our assay. In contrast, AP activity was not affected when conditioned medium from HEK(mock) cells was used (data not shown). Then, we preincubated aliquots of Shh- and Hip-conditioned media together, and added them to C3H10T1/2 cells (Fig. 4D). Induction of AP activity by Shh-conditioned medium was inhibited by Hip-conditioned medium in a dose-dependent manner. The inhibition was already evident at the lowest tested volume (10 μl) of Hip-conditioned medium, whereas 80–100% inhibition was obtained with the highest Hip volume (150 μl). We also observed that AP activity, induced by a non-cholesterol-modified myristoylated ShhN (myrShhN) (Pepinsky et al., 2002), was also inhibited by Hip-conditioned medium as compared

Table 1

Relative abundance of Shh and Hip proteins, and Ptc and Hip mRNAs in the rodent brain

Area	Shh protein ^a	Ptc mRNA ^b	Hip mRNA ^c	Hip protein ^d
Olfactory bulb	1+	1+	0	3+
Cortex	1+	1+	0	3+
Striatum	2+			1+
Caudate putamen		0	3+	
Accumbens		0	2+	
Ventral pallidum		1+	2+	
Hippocampus	1+			4+
Dentate gyrus		1+	0	
CA3		1+	3+ ^e	
Indusium griseum		0	4+	
Tenia tecta		0	4+	
Hypothalamus	3+	3+	0	1+
Thalamus	3+	2+		1+
Medial habenula			4+	
Superior colliculus	3+			n.d.
Superficial grey layer		2+	1+	
Brainstem	3+	3+		n.d.
Ventral cochlear nucleus			3+	
Cerebellum	2+			2+
Granule cell layer		2+	1+	
Purkinje cell layer		4+	0	

Staining intensities : 0, not detectable; 1+, very low; 2+, low to moderate; 3+, moderate to strong; 4+, very strong; n.d., not determined.

^a Data from Western blot experiments on dissected hamster brain tissues (Traiffort et al., 2001).

^b Data from ISH experiments performed on rat brain sections (Traiffort et al., 1999; Charytoniuk et al., 2002b).

^c Data from ISH experiments performed on mouse brain sections. Similar data have also been found in rat brain except for the ventral cochlear nucleus where hybridisation signal has not been determined (present study).

^d Data from Western blot experiments from homogenates of dissected rat brain tissues (present study).

^e Signal observed in CA3 region of the hippocampal formation at a single laterality close to the sagittal suture.

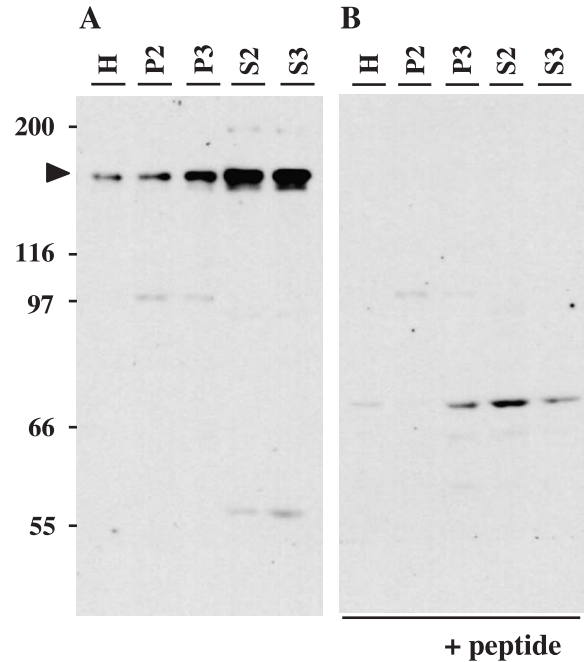


Fig. 6. Membrane-associated and soluble Hip in adult rat cerebellum. Cerebellar proteins (30 μg) from homogenates (H) or from pellets obtained after various centrifugation steps (30000 g, P2; 120000 g, P3) and from the corresponding supernatants (S2 and S3) were analysed by Western blot using 34Ab antiserum. Hip was detected as a major signal with an apparent molecular mass of 155 kDa (dark arrow) in both membrane and soluble fractions. A faint 150-kDa signal was also detected in P3, S2 and S3. Both signals were blocked when 34Ab antiserum was pre-adsorbed with GST–Hip fusion protein (B). An additional signal corresponding to a 70-kDa peptide was observed in P3, S2 and S3 in pre-adsorption experiments (B) and was therefore considered not related to Hip. Molecular weight markers (kDa) are indicated on the left.

to mock-conditioned medium (Fig. 4E). Together, these data indicate that Hip-conditioned medium contains a soluble biological activity able to block Shh signalling.

Hip is transcribed in the mature brain

During embryonic development, Hip expression occurs next to hh signalling centers (Chuang and McMahon, 1999). We have reported Shh expression in subpopulations of gabaergic and cholinergic neurons as well as in cells lining the basal part of the third ventricle in the adult brain (Traiffort et al., 1998, 1999, 2001). Therefore, we investigated Hip expression by ISH with Hip riboprobes on brain sections from adult mice. Application of antisense-specific Hip probe to mouse brain sections resulted in a low background and a highly contrasted cell labelling (Figs. 5A, C–E). Sense Hip probe gave no specific signal and omission of the antisense probe from the hybridisation mixture resulted also in absence of cell staining (Fig. 5B and data not shown). A strong signal was observed in cells of the ventral cochlear nucleus, medial habenula, indusium griseum and tenia tecta. Variable Hip signal was also observed in medium-sized cells scattered in the caudate putamen, the nucleus accumbens, the ventral pallidum and in the superficial layers of the superior colliculus (Figs. 5A, C–E, Table 1 and data not shown). A similar distribution of Hip transcripts was

also observed in rat brain (data not shown). These data demonstrate that Hip transcription persists in the mature brain.

Identification of soluble and membrane-associated Hip in the mature brain

We then analysed homogenates from dissected brain regions from adult rats by Western blot using Hip 34Ab antiserum. We identified a signal corresponding to a polypeptide migrating with an apparent molecular weight of 155 kDa, with the highest levels observed in the hippocampus, the cortex, the olfactory bulbs and the cerebellum, and the lowest levels in the striatum, the thalamus and the hypothalamus (Table 1, Fig. 6A first lane, and data not shown). The higher apparent molecular weight observed in brain compared to that obtained in transfected cells might reflect post-translational modifications such as glycosylation (Chuang and McMahon, 1999) rather than adult brain alternative splicing. Indeed, analysis of reverse transcription followed by polymerase chain reaction (RT-PCR) of adult mouse brain mRNA using primers spanning the complete cDNA gave PCR products of expected size (data not shown). A comparison of Hip expression by ISH and Western blot experiments revealed brain regions in which only the transcript or only the protein are detected such as the olfactory bulbs or the cortex, suggesting that Hip protein may be transported to projection areas of Hip-synthesising cells (Table 1).

We further characterised the subcellular distribution of Hip in fractions from the adult rat cerebellum. A 155-kDa polypeptide was detectable in the membrane fractions obtained after high-speed centrifugation and was enriched in the soluble fractions (Fig. 6A). A 150-kDa polypeptide was also faintly observed, mainly in the soluble fractions. Both signals were absent when 34Ab antiserum was preadsorbed with an excess of immunising antigen indicating their specificity (Fig. 6B). A faint signal corresponding to a 97-kDa polypeptide was observed in membrane-associated fractions, but was not blocked in preadsorption experiments indicating that it was not Hip-related (P2, P3 in Fig. 6B). These data demonstrate the presence of soluble and membrane-associated forms of Hip in the mature brain.

Discussion

In this study, we demonstrate for the first time that Hip can exist in both soluble and membrane-associated forms in tissues. These observations are further supported by the characterisation of soluble forms of Hip identified in the supernatant of Hip-transfected cells that inhibit a well-characterised Shh-mediated response, that is, the differentiation of C3H10T1/2 cells. Our observations now raise additional possibilities for Shh signalling regulation by Hip in mature neural tissues.

Hip was identified by screening a cDNA expression library from mouse limb bud for its ability to bind an AP-fusion form of ShhN. Hip has been proposed to be a type I transmembrane protein with a long amino-terminal extracellular tail starting with a putative signal peptide and ending by a hydrophobic domain implicated in membrane anchoring and with no evident intracellular tail. However, a form of Hip lacking this hydrophobic segment (HIP Δ C22) was found both associated with the cell membrane and present in the supernatant of cultured transfected cells indicating that other regions of the protein are involved in membrane anchoring

(Chuang and McMahon, 1999). In the present study, we have generated Hip and Hip constructs containing a Myc epitope in the amino- or carboxy-terminal tail and analysed their biochemical properties. Our analysis shows that soluble forms of Hip, containing at least the amino acid residues immediately carboxy-terminal to the first hydrophobic segment and those composing the last hydrophobic domain, are present in the culture medium of transfected cells. These data demonstrate that soluble forms of Hip are not generated by cleavage of the last hydrophobic segment. Hip may be anchored at the cell membrane by the last hydrophobic domain and the domains resembling epidermal growth factor repeats (Chuang and McMahon, 1999). In other proteins, such repeats are involved in protein–protein or protein–cell interactions (Swindle et al., 2001; Takagi et al., 2001). Our studies did not allow us to determine if the first hydrophobic segment serves as a signal peptide or participates in Hip membrane anchoring, and if this segment is cleaved or not. However, various mutants in which we have replaced this domain by a well-characterised signal peptide (Ango et al., 1999) were barely detectable after cell transfection as estimated by Western blot analysis using 34Ab antiserum indicating that it might be implicated in Hip stability and targeting (J.C. and M.R., data not shown). Our study also provides direct evidence that both Hip and ShhN are associated with raft-like microdomains in transfected cells suggesting that they act at these sites. Further work is required to address the precise localisation of Hip in intracellular compartments (as presently visualised by immunofluorescence in transfected cells) and the mechanisms, such as protein secretion or cleavage, involved in the release of Hip in the cell culture medium.

Hip, like Ptc, interacts with the three mammalian hh proteins with high affinity and confers cell-surface binding to these morphogens (Chuang and McMahon, 1999). However, Ptc, which shares biochemical and pharmacological properties with transporters (Chen et al., 2002; Goodrich et al., 1996), inhibits the constitutive activity of Smo. Shh binding to Ptc is believed to relieve this inhibition leading to the transcription of genes including Ptc itself. The subsequent increase in Ptc protein is thought to buffer exogenous Shh limiting its diffusion and its signalling, and to constitute a critical feedback mechanism (Ingham and McMahon, 2001). Hip is also thought to modulate Shh signalling by buffering ShhN, and our results show that soluble forms of Hip alter Shh signalling. Conditioned medium from Hip-transfected cells inhibits the differentiation of C3H10T1/2 cells induced by non-cholesterol-modified myrShhN. Hip also inhibits the effects of soluble ShhN released in the culture medium of HEK(Shh) cells. The released ShhN is presumably cholesterol and palmitoyl-modified (Cooper et al., 1998), thus, cholesterol does not appear to be a prerequisite for Hip-mediated Shh signalling inhibition. Hip presumably binds ShhN and acts as an inhibitor of ShhN preventing activation of its receptor complex Ptc/Smo. Accordingly, in transgenic embryo overexpressing Hip Δ C22 under the control of the related pituitary homeobox Pitx1 promoter, the transgene expressed in the oral ectoderm and Rathke's pouch was able to act as an antagonist of Shh proteins. Shh-mediated gene induction from the oral ectoderm and ventral diencephalon was blocked, thus, preventing pituitary gland development (Trier et al., 2001). This inhibition is reminiscent of Bone Morphogenetic Protein (BMP) antagonism by Chordin, Noggin or DAN, soluble proteins that bind BMPs and block their activity (Balemans and Van Hul, 2002). GAS1 has been recently proposed to act as an antagonist of Shh signalling upon Wnt protein stimu-

lation during somite development (Lee et al., 2001). GAS1, a glycosyl–phosphatidylinositol-linked membrane glycoprotein, may bind Shh at the cell surface and sequester the protein-like Ptc and Hip. GAS1 is also expressed in the adult brain and can be induced following injury (Mellstrom et al., 2002), but a role in modulating Shh signalling has not yet been reported.

Hip^{-/-} mutant mice do not manifest profound defects in tissues related to hh signalling during embryonic development, except in the presumptive lung. This has been attributed to functional redundancy between Ptc and Hip, whose expression overlaps during this period (Chuang et al., 2003; Chuang and McMahon, 1999; Cobourne and Sharpe, 2002); (K.L., E.T. and M.R., manuscript in preparation) suggesting that both proteins might participate in Shh sequestration in the same cells. In the adult brain, Hip transcription is observed in regions where Ptc is not expressed, and does not occur upon ShhN injection whereas strong Ptc transcription is detected (Charytoniuk et al., 2002a). These observations thus suggest different mechanisms for Shh regulation by Hip and Ptc during embryonic development and in the mature brain.

We recently reported a detailed distribution of Shh signalling components in the adult brain (Traiffort et al., 1999). ShhN is anterogradely transported to its sites of action by rapid axonal transport from the retina to the optic tectum. Other evidence for Shh activity at a distance from its site of synthesis is suggested by the lesion of the fimbria-fornix that affects the transport of ShhN from the basal forebrain to the hippocampus and the associated proliferation of neuroprogenitors (Lai et al., 2003). Interestingly, Hip protein is often observed in brain areas where ShhN is detected suggesting that Hip may regulate Shh signalling in these regions (Table 1) (Traiffort et al., 1999). Hip might be transported along the axons as a membrane-associated form, as for instance between the tenia tecta and its projection area, the olfactory bulb (De Olmos et al., 1978), and released in the synaptic cleft as a soluble form.

In the developing cerebellum, Shh signalling is involved in granule cell proliferation and differentiation (Charytoniuk et al., 2002b; Dahmane and Ruiz-i-Altaba, 1999; Wechsler-Reya and Scott, 1999) in agreement with the appearance of cerebellar tumors in Ptc^{+/-} mice (Goodrich et al., 1997). In addition, mutations of Ptc and Smo are associated with medulloblastoma, aggressive tumors from cerebellar origin (Ruiz i Altaba et al., 2002b). Further work should clarify the role of Hip in modulating the development of such tumors.

What should be the role of Hip in other adult brain regions? Delivery of Shh to rat hippocampus via adeno-associated viral vector induces proliferation of neural progenitors (Lai et al., 2003), and injection of ShhN into the mouse and rat striatum activates Shh signalling in the subventricular zone (Charytoniuk et al., 2002a). Interestingly, a soluble form of Hip is present in the hippocampus and the subventricular zone (data not shown) and might antagonize ShhN signalling in these regions. In vitro and in vivo studies have suggested that Shh may have a therapeutic value in neurodegenerative diseases such as Alzheimer or Parkinson (Dass et al., 2002; Engber et al., 1999; Reilly et al., 2002; Tsuboi and Shults, 2002) and long-acting forms of Shh have been shown to be efficacious in a sciatic nerve crush model (Pepinsky et al., 2002). It should be of interest to further analyse how Hip regulates Shh signalling in adult neural tissues and to define the pathway(s) implicated in Hip regulation. In summary, our data demonstrate the presence of Hip transcripts and proteins in the adult brain and suggest that Shh signalling might be modulated by soluble forms

of Hip. This provides another mechanism for regulating Shh functions in adult tissues.

Experimental methods

Generation of a polyclonal antiserum to mouse Hip

Recombinant mouse Hip protein (residues 141–413) was obtained after PCR amplification of mouse brain cDNA and subcloning of the expected DNA fragment into the pGEX-4T-1 vector (Amersham Bioscience, Saclay, France) allowing the production of a fusion protein with glutathione S-transferase (GST) in the bacteria strain *Escherichia coli* BL21. The fusion protein was purified (Traiffort et al., 2001) and 100 µg were injected into a rabbit to generate antiserum 34Ab.

DNA and plasmid constructions

The expression vectors containing mouse Shh (pRK5(Shh)) or Hip (pcDNA3(Hip)) were provided by Dr. P. Beachy (The Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, USA) and Dr. A. McMahon (Harvard University, Cambridge, USA), respectively. The mock conditions of transfection were performed using the pcDNA3 or pRK5 vectors alone.

To generate the Hip-Myc construction, full-length mouse Hip cDNA was cloned into the vector pcDNA3.1-Myc-His(+)(B) (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) using the *Hind*III and *Ksp*I sites, and a Flag-Myc epitope was inserted at the 3' end of the cDNA leading to the multiple-epitope tag Flag-Myc-Myc. Briefly, two oligonucleotides encoding the Flag-Myc epitope flanked by *Ksp*I restriction sites were designed to hybridise to each other over 15 bases at their 3' end. Conversion of annealed oligonucleotides to double-stranded DNA was performed using the Klenow fragment as described (Ausubel et al., 1992) and followed by *Ksp*I restriction before subcloning into the *Ksp*I-linearised recombinant vector pcDNA3.1-Hip-Myc-His(+)(B).

The Myc-Hip construction was generated by inserting a Myc epitope between amino acid residues 23 and 24 of mouse Hip (Chuang and McMahon, 1999). Using PCR amplification, *Xba*I and *Mlu*I restriction sites were introduced between base pairs 543 and 544 of a mouse Hip cDNA fragment encompassing the nucleotide sequence 313–2669 (Genbank accession #, AF116865) to allow the insertion of a *Xba*I-*Mlu*I cassette encoding the Myc-epitope. The constructions were finally verified by DNA sequencing (Eurogentec, Seraing, Belgium).

Cell culture and transfections

HEK293 and C3H10T1/2 cells (ATCC, Molsheim, France) were cultured in high glucose DMEM and CHO-K1 cells in Ham's F-12 medium (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS; Eurobio, Les Ulis, France).

HEK293 cells were transfected using the calcium phosphate procedure with 10 µg of DNA according to standard protocol (Ausubel et al., 1992). CHO-K1 cells (1.5×10^6) were plated in a 60-mm dish and transfected with 4 µg of Hip or Shh plasmids or control vectors combined with 25 µl of Lipofectamine™ 2000 reagent (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Unless indicated, cells were harvested 48 h following the transfection, centrifuged at 4°C, $500 \times g$ for 10 min, and the resulting culture super-

natants used as conditioned media. For estimation of cell death, mock- and Hip-transfected cells were trypsinised (trypsin 0.25%, EDTA 1 mM, Invitrogen, Cergy Pontoise, France) and centrifuged ($100 \times g$, 10 min) with the culture medium. The resulting cell pellets were resuspended in fresh culture medium and an aliquot was taken for cell counting with 20% trypan blue dye (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) (Ausubel et al., 1992).

Western blot analysis

Tissues from adult male Wistar rats (Iffa Credo, L'Arbresle, France) were homogenised in ice-cold 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1 mM EDTA, aprotinin (10 $\mu\text{g/ml}$), leupeptin (10 $\mu\text{g/ml}$), phenylmethylsulfonyl fluoride (100 $\mu\text{g/ml}$) and benzamide (60 $\mu\text{g/ml}$). Transfected cells were washed in cold phosphate-buffered saline (PBS) and lysed in the mixture described above. Proteins (Lowry et al., 1951) were electrophoresed on 7% or 12.5% SDS-polyacrylamide gels for Hip and Shh detection, respectively. For culture medium, 12 μl was analysed. For the fractionation study, pellets (P1, P2, P3) and supernatants (S1, S2, S3) were obtained after centrifugation at $9000 \times g$ for 20 min, $30000 \times g$ for 30 min and $120000 \times g$ for 1 h. Proteins were transferred to a nitrocellulose membrane, probed for 2 h at RT in 20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 450 mM NaCl, 0.1% Tween^R 20, 4% dry milk with the following antibodies: 34Ab (1:1000), 167Ab (1:1000) directed against the amino-terminal fragment of Shh (ShhN) (Traiffort et al., 2001) or 9E10 (1:100), a mouse monoclonal anti-Myc antibody (Sigma). The immunoreactivity was revealed with enhanced chemiluminescence (ECL, Amersham Bioscience). The specificity of the signal obtained with 34Ab was verified by blocking experiments performed by overnight incubation of the diluted 34Ab antiserum with the mouse GST-Hip purified fusion protein (20 $\mu\text{g/ml}$) used for antiserum production. This signal was not blocked by GST purified protein alone (20 $\mu\text{g/ml}$). Quantification of the chemiluminescent signals was performed by scanning the Western films with a Canon scanner (Canoscan 300, Canon, Courbevoie, France) and measuring the pixel densities in the signal areas using SigmaGelTM (Version 1.0, SPSS Inc., USA).

Preparation of detergent-insoluble fractions from HEK293 transfected cells

HEK293 cells were scraped in cold PBS 48 h after transfection with pcDNA3(Hip) or pRK5(Shh) or pcDNA3 or pRK5 control vectors. After centrifugation, the cell pellet was homogenised in ice-cold 25 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA containing 0.2 mM Na_3VO_4 (TNE buffer), 0.5% Triton X-100 and protease inhibitors as described above. The cells were solubilised (30 min, 4°C) and then mixed with an equal volume of 80% sucrose in TNE. One milliliter of this sample was overlaid with 2.5 ml of 30% sucrose in TNE and 1.25 ml of 4% sucrose in TNE in a Beckman SW65 tube and centrifuged at 4°C for 14 h at $200000 \times g$ in a Beckman SW65 rotor. Nine 0.525-ml fractions were recovered (numbered 1 to 9 from the top down) and the pellet (fraction 10) at the bottom of the tube was resuspended in 0.525 ml of TNE/Triton X-100 buffer. The sucrose density gradient (4–40%) was determined by measuring the refractive index (Brown and London, 2000). Each fraction (10 μl) was analysed by SDS-PAGE followed by Western blotting as described above and

probed with specific antibodies for the transferrin receptor (H68.4, Zymed, Montrouge, France), caveolin-1 (N-20, Santa Cruz Biotechnology, France), or by dot blot for detection of gangliosides (GM1) using peroxidase-conjugated cholera toxin β subunit (Sigma). Fraction 3 contained floating detergent-insoluble glycolipid enriched material. Most proteins were observed in fractions 8–9 and 10 containing soluble and insoluble, non-floating material, respectively.

Immunofluorescence on CHO-K1-transfected cells

The immunofluorescence experiments were adapted from Mary et al. (1998). For the detection of the protein at the cell surface, cells were incubated for 90 min at 37°C in the culture medium with a 1:400 dilution of Hip 34Ab or Shh 167Ab antisera and then fixed in 4% paraformaldehyde. For the detection of the protein inside and at the cell surface, cells were first fixed in 4% paraformaldehyde before treatment with 5% Triton X-100 and incubation for 2 h at RT in PBS-2% gelatin supplemented with a 1:600 dilution of 34Ab or 167Ab antisera. A 1:400 dilution of FITC-labelled goat anti-rabbit IgG (Santa Cruz Biotechnology) was used as secondary antibody and Vectashield medium as mounting medium (AbCys, Paris, France). The immunofluorescence staining was visualised and analysed through 0.3- μm sections of transfected cells under a Leica TCS-SP2 confocal microscope. Negative controls were performed in parallel by incubating mock-transfected cells with the antisera diluted as above.

Alkaline phosphatase (AP) assay on C3H10T1/2 cells

C3H10T1/2 cells were seeded in 96-well plates at a density of 5×10^3 cells per well, 24 h before addition of myristoylated-recombinant ShhN (myrShhN, a kind gift from D. Baker and A. Galdes, Biogen, Cambridge, USA) (Taylor et al., 2001) or conditioned medium from HEK293 cells transfected with pRK5(Shh) or pRK5, as described above. When required, 10 $\mu\text{g/ml}$ of the ShhN monoclonal blocking antibody 5E1 (Ericson et al., 1996) or its inactive-matched control isotype 9E10 (provided by Dr K. Williams, Biogen, Cambridge, USA), or conditioned medium from HEK293 cells transfected with pcDNA3(Hip) or pcDNA3, were added to Shh-conditioned medium before incubation with cell culture. Five days later, cells were washed in cold PBS and lysed by sonication at 4°C in 50 μl of a solution containing 0.9% NaCl and 0.2% Triton X-100 and AP assay was performed (Pepinsky et al., 1998). After the addition of 100 μl of reaction buffer (200 mM Tris-HCl pH10.5, 0.4 M 2-amino-2-methyl propanol, 8 mM MgCl_2) and 50 μl of substrate (4 mM p-Nitrophenyl phosphate disodium, Sigma), the lysates were incubated at 37°C for 30–60 min before OD recording at 415 nm. Independent experiments were carried out at least three times with similar results and each condition was performed in quadruplicates.

In situ hybridisation (ISH)

Digoxigenin-labelled mouse Hip riboprobes were synthesised using T7 or SP6 RNA polymerases (Roche Molecular Biochemicals, Meylan, France) on linearised recombinant pGEM-4Z plasmids containing a DNA fragment obtained by PstI restriction on Hip cDNA and encoding amino acids 80–626 (Chuang and McMahon, 1999). ISH experiments were performed as previously described (Traiffort et al., 1999).

Acknowledgments

K. Loulier is supported by a PhD grant from Le Ministère de la Recherche. We thank K. Moya for critical reading of the manuscript.

References

- Allendoerfer, K.L., Dudek, H., 2002. Translation of developmental biology into therapeutics: the hedgehog signaling pathway and neurodegenerative diseases. *Curr. Opin. Investig. Drugs* 3, 1742–1744.
- Ange, F., Albani-Torregrossa, S., Joly, C., Robbe, D., Michel, J.M., Pin, J.P., Bockaert, J., Fagni, L., 1999. A simple method to transfer plasmid DNA into neuronal primary cultures: functional expression of the mGlu5 receptor in cerebellar granule cells. *Neuropharmacology* 38, 793–803.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K., 1992. *Short protocols in Molecular Biology*, 2nd ed. Wiley, New York.
- Balemans, W., Van Hul, W., 2002. Extracellular regulation of BMP signaling in vertebrates: a cocktail of modulators. *Dev. Biol.* 250, 231–250.
- Bellaïche, Y., The, I., Perrimon, N., 1998. Tout-velu is a Drosophila homologue of the putative tumour suppressor EXT-1 and is needed for Hh diffusion. *Nature* 394, 85–88.
- Berman, D.M., Karhadkar, S.S., Hallahan, A.R., Pritchard, J.I., Eberhart, C.G., Watkins, D.N., Chen, J.K., Cooper, M.K., Taipale, J., Olson, J.M., Beachy, P.A., 2002. Medulloblastoma growth inhibition by hedgehog pathway blockade. *Science* 297, 1559–1561.
- Brown, D.A., London, E., 2000. Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J. Biol. Chem.* 275, 17221–17224.
- Burke, R., Nellen, D., Bellotto, M., Hafen, E., Senti, K.A., Dickson, B.J., Basler, K., 1999. Dispatched, a novel sterol-sensing domain protein dedicated to the release of cholesterol-modified hedgehog from signaling cells. *Cell* 99, 803–815.
- Charron, F., Stein, E., Jeong, J., McMahon, A.P., Tessier-Lavigne, M., 2003. The morphogen sonic hedgehog is an axonal chemoattractant that collaborates with netrin-1 in midline axon guidance. *Cell* 113, 11–23.
- Charytoniuk, D., Traiffort, E., Hantraye, P., Hermel, J.M., Galdes, A., Ruat, M., 2002a. Intrastratial sonic hedgehog injection increases Patched transcript levels in the adult rat subventricular zone. *Eur. J. Neurosci.* 16, 2351–2357.
- Charytoniuk, D.A., Porcel, B., Rodriguez, J.A., Faure, H., Ruat, M., Traiffort, E., 2002b. Sonic Hedgehog signaling in the developing and adult brain. *J. Physiol. (Paris)* 96, 9–16.
- Chen, J.K., Taipale, J., Young, K.E., Maiti, T., Beachy, P.A., 2002. Small molecule modulation of Smoothed activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 14071–14076.
- Chuang, P.T., McMahon, A.P., 1999. Vertebrate hedgehog signalling modulated by induction of a hedgehog-binding protein. *Nature* 397, 617–621.
- Chuang, P.T., Kawcak, T., McMahon, A.P., 2003. Feedback control of mammalian Hedgehog signaling by the Hedgehog-binding protein, Hip1, modulates Fgf signaling during branching morphogenesis of the lung. *Genes Dev.* 17, 342–347.
- Cobourne, M.T., Sharpe, P.T., 2002. Expression and regulation of hedgehog-interacting protein during early tooth development. *Connect. Tissue Res.* 43, 143–147.
- Cooper, M.K., Porter, J.A., Young, K.E., Beachy, P.A., 1998. Teratogen-mediated inhibition of target tissue response to Shh signaling. *Science* 280, 1603–1607.
- Dahmane, N., Ruiz-i-Altaba, A., 1999. Sonic hedgehog regulates the growth and patterning of the cerebellum. *Development* 126, 3089–3100.
- Dass, B., Irvani, M.M., Jackson, M.J., Engber, T.M., Galdes, A., Jenner, P., 2002. Behavioural and immunohistochemical changes following supranigral administration of sonic hedgehog in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated common marmosets. *Neuroscience* 114, 99–109.
- De Olmos, J., Hardy, H., Heimer, L., 1978. The afferent connections of the main and the accessory olfactory bulb formations in the rat: an experimental HRP-study. *J. Comp. Neurol.* 181, 213–244.
- Engber, T.M., Wang, S., Huang, C., Reilly, J., Galdes, A., Mahanthappa, N., 1999. Sonic hedgehog is neuroprotective in the adult striatum in vivo. *Soc. Neurosci. Abst.* 25, 1534.
- Ericson, J., Morton, S., Kawakami, A., Roelink, H., Jessell, T.M., 1996. Two critical periods of Sonic Hedgehog signaling required for the specification of motor neuron identity. *Cell* 87, 661–673.
- Frank-Kamenetsky, M., Zhang, X.M., Bottega, S., Guicherit, O., Wichterle, H., Dudek, H., Bumcrot, D., Wang, F.Y., Jones, S., Shulok, J., Rubin, L.L., Porter, J.A., 2002. Small-molecule modulators of Hedgehog signaling: identification and characterization of Smoothed agonists and antagonists. *J. Biol.* 1, 1–19.
- Goodrich, L.V., Johnson, R.L., Milenkovic, L., McMahon, J.A., Scott, M.P., 1996. Conservation of the hedgehog/patched signaling pathway from flies to mice: induction of a mouse patched gene by Hedgehog. *Genes Dev.* 10, 301–312.
- Goodrich, L.V., Milenkovic, L., Higgins, K.M., Scott, M.P., 1997. Altered neural cell fates and medulloblastoma in mouse patched mutants. *Science* 277, 1109–1113.
- Guy, R.K., 2000. Inhibition of sonic hedgehog autoprocessing in cultured mammalian cells by sterol deprivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 7307–7312.
- Ingham, P.W., McMahon, A.P., 2001. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev.* 15, 3059–3087.
- Lai, K., Kaspar, B.K., Gage, F.H., Schaffer, D.V., 2003. Sonic hedgehog regulates adult neural progenitor proliferation in vitro and in vivo. *Nat. Neurosci.* 6, 21–27.
- Lee, C.S., Buttitta, L., Fan, C.M., 2001. Evidence that the WNT-inducible growth arrest-specific gene 1 encodes an antagonist of sonic hedgehog signaling in the somite. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 11347–11352.
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Ma, Y., Erkner, A., Gong, R., Yao, S., Taipale, J., Basler, K., Beachy, P., 2002. Hedgehog-mediated patterning of the mammalian embryo requires transporter-like function of dispatched. *Cell* 111, 63–75.
- Marti, E., Bovolenta, P., 2002. Sonic hedgehog in CNS development: one signal, multiple outputs. *Trends Neurosci.* 25, 89–96.
- Mary, S., Gomez, J., Prezeau, L., Bockaert, J., Pin, J.P., 1998. A cluster of basic residues in the carboxyl-terminal tail of the short metabotropic glutamate receptor 1 variants impairs their coupling to phospholipase C. *J. Biol. Chem.* 273, 425–432.
- Mellstrom, B., Cena, V., Lamas, M., Perales, C., Gonzalez, C., Naranjo, J.R., 2002. Gas1 is induced during and participates in excitotoxic neuronal death. *Mol. Cell. Neurosci.* 19, 417–429.
- Pepinsky, R.B., Zeng, C., Wen, D., Rayhorn, P., Baker, D.P., Williams, K.P., Bixler, S.A., Ambrose, C.M., Garber, E.A., Miatkowski, K., Taylor, F.R., Wang, E.A., Galdes, A., 1998. Identification of a palmitic acid-modified form of human Sonic hedgehog. *J. Biol. Chem.* 273, 14037–14045.
- Pepinsky, R.B., Shapiro, R.I., Wang, S., Chakraborty, A., Gill, A., Lepage, D.J., Wen, D., Rayhorn, P., Horan, G.S., Taylor, F.R., Garber, E.A., Galdes, A., Engber, T.M., 2002. Long-acting forms of Sonic hedgehog with improved pharmacokinetic and pharmacodynamic properties are efficacious in a nerve injury model. *J. Pharm. Sci.* 91, 371–387.
- Reilly, J.O., Karavanova, I.D., Williams, K.P., Mahanthappa, N.K., Allendoerfer, K.L., 2002. Cooperative effects of Sonic Hedgehog and NGF on basal forebrain cholinergic neurons. *Mol. Cell. Neurosci.* 19, 88–96.
- Ruiz i Altaba, A., Palma, V., Dahmane, N., 2002a. Hedgehog-Gli signaling and the growth of the brain. *Nat. Neurosci.* 3, 24–33.

- Ruiz i Altaba, A., Sanchez, P., Dahmane, N., 2002b. Gli and hedgehog in cancer: tumours, embryos and stem cells. *Nat. Rev. Cancer* 2, 361–372.
- Swindle, C.S., Tran, K.T., Johnson, T.D., Banerjee, P., Mayes, A.M., Griffith, L., Wells, A., 2001. Epidermal growth factor (EGF)-like repeats of human tenascin-C as ligands for EGF receptor. *J. Cell. Biol.* 154, 459–468.
- Taipale, J., Cooper, M.K., Maiti, T., Beachy, P.A., 2002. Patched acts catalytically to suppress the activity of smoothened. *Nature* 418, 892–896.
- Takagi, J., Beglova, N., Yalamanchili, P., Blacklow, S.C., Springer, T.A., 2001. Definition of EGF-like, closely interacting modules that bear activation epitopes in integrin beta subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 11175–11180.
- Taylor, F.R., Wen, D., Garber, E.A., Carmillo, A.N., Baker, D.P., Arduini, R.M., Williams, K.P., Weinreb, P.H., Rayhorn, P., Hronowski, X., Whitty, A., Day, E.S., Boriack-Sjodin, A., Shapiro, R.I., Galdes, A., Pepinsky, R.B., 2001. Enhanced potency of human sonic hedgehog by hydrophobic modification. *Biochemistry* 40, 4359–4371.
- Traiffort, E., Charytoniuk, D.A., Faure, H., Ruat, M., 1998. Regional distribution of sonic hedgehog, patched, and smoothened mRNA in the adult rat brain. *J. Neurochem.* 70, 1327–1330.
- Traiffort, E., Charytoniuk, D., Watroba, L., Faure, H., Sales, N., Ruat, M., 1999. Discrete localizations of hedgehog signalling components in the developing and adult rat nervous system. *Eur. J. Neurosci.* 11, 3199–3214.
- Traiffort, E., Moya, K.L., Faure, H., Hassig, R., Ruat, M., 2001. High expression and anterograde axonal transport of aminoterminal Sonic Hedgehog in the adult hamster brain. *Eur. J. Neurosci.* 14, 839–850.
- Treier, M.S., O'Connell, S., Gleiberman, A., Price, J., Szeto, D.P., Burgess, R., Chuang, P.T., McMahon, A.P., Rosenfeld, M.G., 2001. Hedgehog signaling is required for pituitary gland development. *Development* 128, 377–386.
- Tsuboi, K., Shults, C.W., 2002. Intrastratial injection of sonic hedgehog reduces behavioral impairment in a rat model of Parkinson's disease. *Exp. Neurol.* 173, 95–104.
- Watkins, D.N., Berman, D.M., Burkholder, S.G., Wang, B., Beachy, P.A., Baylin, S.B., 2003. Hedgehog signalling within airway epithelial progenitors and in small-cell lung cancer. *Nature* 422, 313–317.
- Wechsler-Reya, R.J., Scott, M., 1999. Control of neuronal precursor proliferation in the cerebellum by Sonic Hedgehog. *Neuron* 22, 103–114.
- Wetmore, C., 2003. Sonic hedgehog in normal and neoplastic proliferation: insight gained from human tumors and animal models. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 13, 34–42.
- Williams, J.A., Guicherit, O.M., Zaharian, B.I., Xu, Y., Chai, L., Wichterle, H., Kon, C., Gatchalian, C., Porter, J.A., Rubin, L.L., Wang, F.Y., 2003. Identification of a small molecule inhibitor of the hedgehog signaling pathway: effects on basal cell carcinoma-like lesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 4616–4621.
- Zeng, X., Goetz, J.A., Suber, L.M., Scott Jr., W.J., Schreiner, C.M., Robbins, D.J., 2001. A freely diffusible form of Sonic hedgehog mediates long-range signalling. *Nature* 411, 716–720.

2. ARTICLE 2

Karine Loulier, Martial Ruat, Elisabeth Traiffort. *Analysis of hedgehog interacting protein in the brain and its expression in nitric oxide synthase-positive cells.* Neuroreport, 16 : 1959-62, 2005.

RESUME DE L'ARTICLE 2

L'activation et la régulation de la signalisation Shh sont des mécanismes complexes, essentiellement étudiés au cours du développement embryonnaire. La liaison de Shh à son récepteur à douze domaines transmembranaires Ptc permet de lever l'inhibition que Ptc exerce sur Smoothed (Smo), une protéine à sept domaines transmembranaires responsable de l'activation des facteurs de transcription de la famille Gli qui permettent à leur tour la transcription des gènes cibles de la voie Shh, tels que Ptc et Gli eux-mêmes (Briscoe et al., 2005). A la membrane des cellules cibles, la glycoprotéine Hedgehog interacting protein (Hip) lie Shh avec une affinité similaire à celle de Ptc et a été proposée comme régulateur négatif de la signalisation Hedgehog au cours de l'embryogenèse, notamment chez la souris aux stades E8.5-E10.5 (Chuang et al., 1999). Le rôle antagoniste de Hip sur les protéines Hedgehog (Hh) a été démontré par l'expression ectopique de Hip dans le squelette en développement (Chuang et al., 1999) et le primordium de la glande pituitaire (Treier et al., 2001), qui engendre dans les deux cas une régulation négative de la signalisation Hh. En accord avec ce rôle de modulateur négatif, une régulation positive de la signalisation Hh est observée chez les souris Hip(-/-) (Chuang et al., 2003).

Afin de mieux caractériser les fonctions de Hip dans le tissu neural des souris au cours du développement, nous avons comparé la distribution des profils d'expression des transcrits Shh, Ptc et Hip dans le cerveau de souris au stade E13.5, un âge critique pour la voie de signalisation Shh et ses interactions (McMahon et al., 2003). Par hybridation *in situ*, nous avons comparé les distributions de Shh, Ptc et Hip dans les régions télencéphaliques et métencéphaliques et nous avons montré que les transcrits Hip et Ptc sont détectés dans le

neuroépithélium du quatrième ventricule et du sulcus hypothalamique et dans une zone restreinte entre les éminences ganglionnaires médiane (medial ganglionic eminence ou MGE) et latérale (lateral ganglionic eminence ou LGE), tandis que Shh est exprimé à proximité des aires d'expression de Hip et Ptc, à savoir dans le sulcus médian, le raphé médullaire, dans les zones adjacentes rostrales et caudale du neuroépithélium du troisième ventricule ainsi que dans la MGE.

Par ailleurs, nous nous sommes intéressés à la caractérisation des cellules exprimant les transcrits de Hip dans le striatum de souris adulte et nous avons montré que Hip est détecté dans des cellules isolées dans le caudé putamen, alors que Ptc n'est pas présent dans le striatum et Shh est exprimé dans une sous-population de neurones GABAergiques dans le globus pallidus. Une analyse plus détaillée par double hybridation *in situ* du phénotype des cellules exprimant Hip (Hip+), nous a permis de démontrer que ces cellules ne correspondaient pas à une sous-population de neurones GABAergiques (sonde GAD) ou cholinergiques (sonde ChAT), mais à une sous-population de neurones exprimant la forme neuronale de l'enzyme responsable de la synthèse de l'oxide nitrique (nNOS). Dans cette région, nous avons mis en évidence que 75% des cellules Hip+ expriment aussi la nNOS et représentent 50% des neurones nNOS+.

Nous avons ainsi montré par nos travaux que, dans le cerveau de souris au stade E13.5, Hip et Ptc1 ont des profils d'expression superposables dans des groupes de cellules proches de celles exprimant Shh suggérant ainsi qu'à la fois Hip et Ptc1 participent de manière coordonnée au contrôle du signal Shh tandis que dans le striatum de souris adulte, Hip est non seulement exprimé en absence de Ptc1, mais une majorité de cellules exprimant Hip correspond aux neurones exprimant la nNOS, suggérant pour la première fois l'existence d'interactions entre les voies de signalisation impliquant respectivement Hip et le neuromédiateur gazeux NO.

Analysis of hedgehog interacting protein in the brain and its expression in nitric oxide synthase-positive cells

Karine Loulier, Martial Ruat and Elisabeth Traiffort

CNRS, Signal Transduction and Developmental Neuropharmacology, Laboratory of Cellular and Molecular Neurobiology, Alfred Fessard Institute of Neurobiology, Gif sur Yvette, France.

Correspondence and requests for reprints to Elisabeth Traiffort, PhD, CNRS, Signal Transduction and Developmental Neuropharmacology, UPR9040 Laboratoire de Neurobiologie Cellulaire et Moléculaire, Institut de Neurobiologie Alfred Fessard, IFR 2118, 1 avenue de la terrasse, 91198 Gif sur Yvette, France
Tel: + 33 1 69 82 43 01; fax: + 33 1 69 82 36 39; e-mail: Elisabeth.Traiffort@nbcn.cnrs-gif.fr

Sponsorship: This work was supported in part by a grant from GIS Institut des maladies rares, La Ligue contre le Cancer and Fondation pour la Recherche sur le Cerveau (FRC). K.L. is the recipient of a doctoral fellowship from the 'Ministère de la Recherche', and from La Ligue contre le Cancer and Association pour la Recherche contre le Cancer.

Received 16 September 2005; accepted 21 September 2005

Hedgehog interacting protein (Hip) and Patched 1 (Ptc1) regulate the cell responses to the morphogen Sonic Hedgehog (Shh). Here, we compare the relative expression patterns of *Shh*, *Hip* and *Ptc1* transcripts in the E13.5 mouse brain embryo. We observe that the expression of *Hip* and *Ptc1* often overlaps and is found close to *Shh*-expressing cells, suggesting that both proteins are required for controlling Shh signals. In the adult striatum in which *Ptc1* is not

detected, we show that a majority of *Hip*-expressing cells correspond to neurons expressing the neuronal form of nitric oxide synthase. These data raise the hypothesis for a functional link between nitric oxide and Shh signaling and for a nonredundant role of Hip and Ptc1 in the adult brain. *NeuroReport* 16:1959–1962
© 2005 Lippincott Williams & Wilkins.

Keywords: GABAergic, hedgehog, neurotoxicity, nitric oxide

Introduction

Hedgehog interacting protein (Hip) and the receptor Patched 1 (Ptc1) bind the morphogen Sonic Hedgehog (Shh) with high affinity and are transcriptional target genes of the Shh pathway in the mouse embryo [1–3]. Hip, which is a type I membrane protein, is thought to sequester Shh proteins and has been proposed to function as a negative regulator of the Shh pathway in the E8.5–E10.5 mouse embryo. The antagonistic role of Hip on Hedgehog (Hh) proteins was demonstrated by the ectopic expression of Hip in the developing skeleton [1] or in the primordium of the pituitary gland [4], in both cases mimicking a down-regulation of Hh signaling. The upregulation of Hh signaling in *Hip* knockout mice was also in agreement with such a role [5]. Ptc1, a putative 12 transmembrane protein, mediates the Hh signal in the cell, and the induction of *Ptc1* transcription has been proposed as a feedback mechanism implicated in the regulation of Ptc1 protein expression responsible for sequestering Hh proteins at the cell membrane [2,6].

Hip-expressing cells have also been identified in the brain of the adult rodent, in which, in addition to the initially characterized membrane-associated form, a soluble form of Hip antagonizing Shh activity *in vitro* has been detected [7]. The intrastriatal injection of Shh proteins induces *Ptc1* but not *Hip* transcription in various areas of the brain in the

adult mouse, suggesting differences in the mechanisms involved in the regulation of their transcription in the adult. The functional roles of Hip in the adult brain and its potential involvement in Shh signaling, however, have so far received little attention.

In order to get further insight into Hip function, we compare here the relative expression patterns of *Shh*, *Hip* and *Ptc1* transcripts in the E13.5 mouse embryo neural tissues, a stage at which critical Shh signaling interactions occur [2]. We observe that the expression of *Hip* and *Ptc1* overlaps and is found close to *Shh*-expressing cells, suggesting that both proteins are implicated in controlling Shh signals. In the adult brain, we have previously shown that *Hip* is transcribed in discrete brain areas devoid of *Ptc1* [7]. Now, we show that, in the adult striatum, the majority of *Hip*-expressing cells corresponds to neurons expressing the neuronal form of nitric oxide synthase (*nNOS*). These data raise the hypothesis for a functional link between nitric oxide (NO) and Shh signaling and argue for distinct roles of Hip and Ptc1 in the adult brain.

Materials and methods

RNA probe synthesis and in-situ hybridization

Hip, *Ptc1*, *Shh*, glutamic acid decarboxylase (*GAD*) and choline acetyltransferase (*ChAT*) riboprobes were synthe-

sized as previously described [7–9]. *nNOS* cDNA encoding amino acids 268–772 [10] was obtained by reverse transcriptase-polymerase chain reaction amplification of total brain mRNA using specific oligonucleotide primers. For in-situ hybridization (ISH) experiments on the E13.5 embryonic tissues, pregnant mice (OF1, Iffa-Credo, l'Arbresle, France) were killed by decapitation. The embryos were removed from amniotic membranes by cesarean section before fixation in 4% paraformaldehyde and cryopreservation in 15% sucrose. Cryostat-cut parasagittal sections of 16 μ m were made. Single and double ISH protocols were performed on embryo and adult mouse tissues, as previously described [8,9]. All procedures were carried out in accordance with the European Communities Council Directive (86/609/EEC) for the care and use of laboratory animals. Application of antisense riboprobes to cryostat-cut sections of mouse frozen tissues from the E13.5 embryo and adult brain (Figs 1 and 2) resulted in a very low background and a highly contrasted cell labeling, as previously shown [8]. Sense riboprobes gave no specific signal and omission of the antisense cRNA probes from the hybridization mixtures also resulted in absence of cell staining (data not shown).

Results

Hip and *Ptc1* mRNA expression overlap in the brain of the E13.5 embryo

The spatial distribution of *Hip* mRNA in neural tissue has been previously reported in the presumptive midbrain and developing spinal cord at early mouse embryonic stages (E8.5–E10.5) [1,11]. Using ISH experiments, we compared *Hip*, *Ptc1* and *Shh* distribution in telencephalic and metencephalic brain regions at later developmental steps in the E13.5 mouse embryo. The expressions of *Hip* and *Ptc1* are partially overlapping and located in areas adjacent to *Shh*-expressing cells. *Hip* and *Ptc1* transcripts are both

detected along the neuroepithelium of the fourth ventricle (Fig. 1B, C, E, F), while *Shh* is found in tissues adjacent to its rostral and caudal parts, the median sulcus and the medullary raphe, respectively (Fig. 1A, D). Similarly, *Hip* and *Ptc1* are observed in the neuroepithelium of the hypothalamic sulcus (Fig. 1E and F), whereas *Shh* is detected in an adjacent caudal area (Fig. 1D). At a more ventral level of the brain, these complementary profiles are still observed. *Shh* is found in the rostral and caudal parts of the neuroepithelium of the third ventricle (3v) and in the medial ganglionic eminence (mge) (Fig. 1G), while *Ptc1* and *Hip* are detected in the medial part of the neuroepithelium and in a restricted region between the mge and the lateral ganglionic eminence (Fig. 1H and I). *Hip* expression, however, appears to be less widespread, as observed at the level of the 3v, in which *Ptc1* mRNA is expressed along the entire neuroepithelium, while *Hip* is only observed in restricted areas.

Hip is expressed in *nNOS*-positive cells in the striatum in the absence of *Ptc1*

We have previously reported that *Shh*, *Hip* and *Ptc1* mRNA are often not colocalized in the adult brain [7–9] as evidenced by the distribution in the striatum summarized in a series of low-power line drawings (Fig. 2a). In this structure, *Shh* is expressed in a subpopulation of GABAergic neurons in the globus pallidus [9] whereas *Hip* is observed in scattered cells in the caudate putamen (Fig. 2a, b, d, f and h). To get a further insight into the phenotype of *Hip*-expressing cells in this area, we performed double-ISH experiments using the antisense *Hip* riboprobe simultaneously with cRNA probes corresponding to *GAD*, *ChAT* or *nNOS*. *Hip* was not colocalized with *GAD* or *ChAT* (Fig. 2f–i), indicating that *Hip*-expressing cells in the caudate putamen do not correspond to a subpopulation of GABAergic or cholinergic neurons. Conversely, *Hip*-expressing cells constitute a subpopulation of *nNOS*-positive neurons (Fig. 2b–e). In this brain region, we identified that at least 75% of *Hip*-expressing cells were positive for *nNOS* and represented about 50% of all *nNOS*-positive neurons.

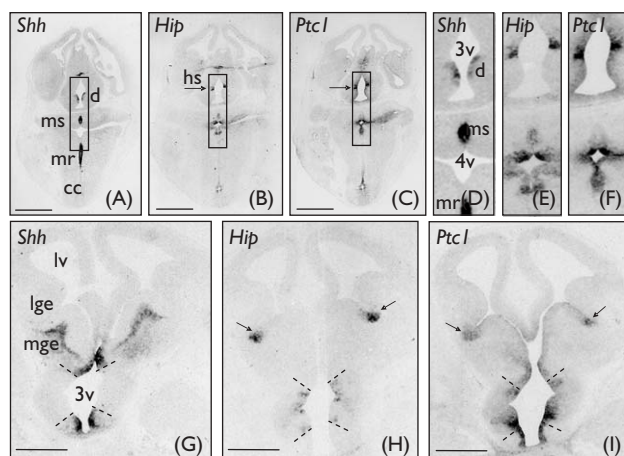


Fig. 1 Comparison of *Shh*, *Ptc1* and *Hip* mRNA in the mouse embryonic brain. (A–I) *Shh* (A, D, G), *Hip* (B, E, H) and *Ptc1* (C, F, I) on adjacent sections of E13.5 mouse brain. (A–F) Central canal (cc), diencephalon (d), hypothalamic sulcus (hs, arrows in B, C), medullary raphe (mr), median sulcus (ms), third ventricle (3v), fourth ventricle (4v). (D–F) Magnifications from (A–C). (G–I) *Hip* and *Ptc1* are found in the area devoid of *Shh* transcripts demarcated by four dotted lines. Arrows indicate the localization of *Hip* and *Ptc1* in a restricted area between the medial (mge) and the lateral (lge) ganglionic eminence. lv, lateral ventricle. Scale bars correspond to 1 mm (A–C), 0.5 mm (G–I).

Discussion

Our results report for the first time the relative spatial distributions of *Shh*, *Ptc1* and *Hip* mRNA in the brain of the E13.5 embryo at a time when critical *Shh* signaling interactions occur [2,3]. *Hip* and *Ptc1* distributions are overlapping and found in cell clusters close to *Shh*, suggesting that both *Hip* and *Ptc1* participate in a coordinated manner in the control of the *Shh* signal. In the adult brain, however, *Hip* and *Ptc1* are often not colocalized, suggesting that they might regulate different actions of *Shh* signaling. In addition, we now provide direct evidence that, in the adult striatum in which *Hip* is expressed in the absence of *Ptc1*, a majority of *Hip*-expressing cells correspond to neurons expressing *nNOS*. These data suggest either that regulation of NO synthesis may be modulated by *Hip* or that *nNOS* activation participates in controlling the activity of *Hip* proteins.

Although *Ptc1* and *Hip* have been initially characterized as Hh transcriptional targets, and both are located close to Hh sources and are able to antagonize Hh signal [1,12], several data have demonstrated that they do not have a redundant activity in all tissues. The main evidence came

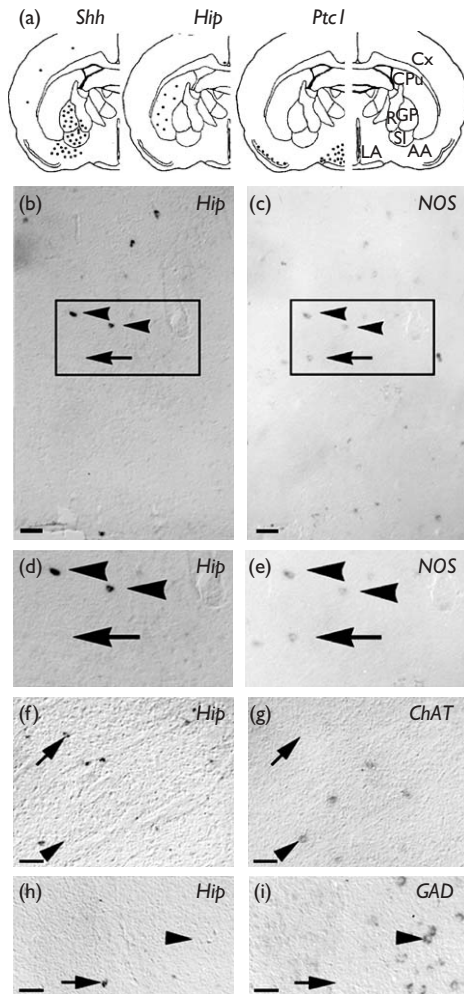


Fig. 2 Compared expression of *Shh*, *Ptc1* and *Hip* transcripts in the adult rodent brain and *Hip* mRNA expression in a subpopulation of cells expressing *nNOS* in the caudate putamen. (a) Line drawings of coronal sections of the adult rodent brain illustrating the comparative distributions of *Shh* and *Ptc1* mRNA in the rat [8] and *Hip* mRNA in the mouse and rat [7]. Transcripts are indicated as dark dots. The right row illustrates the histological level of neuroanatomical structures at the interaural level 7.60 mm. AA, anterior amygdaloid area; CPu, caudate putamen; Cx, cerebral cortex; GP, globus pallidus; LA, lateroanterior hypothalamic nucleus; R, reticular thalamic nucleus; SI, substantia innominata. (b–i) Double in-situ hybridization (ISH) of sagittal sections from the adult mouse brain was performed at the level of the caudate putamen using simultaneously digoxigenin-labeled *Hip* (b, d, f, h) and fluorescein-labeled *nNOS* (c, e) or *ChAT* (g) or *GAD* (i) riboprobes. (b–e) Black arrowheads indicate cells co-expressing *Hip* and *nNOS*. A few cells express *nNOS* but not *Hip* (black arrows). (d) and (e) are enlargements of (b) and (c), respectively. (f–i) *Hip*-expressing cells (black arrows in f and h) are not *ChAT*-positive (black arrow in g) or *GAD*-positive (black arrow in i) cells. In the same way, *ChAT*-positive (black arrowhead in g) or *GAD*-positive (black arrowhead in i) cells do not express *Hip* transcripts (black arrowheads in f, h). Scale bars correspond to 100 μm (b–i).

from the analysis of the phenotype of *Ptc1* and *Hip* knockout mice, showing that *Hip*^{-/-} mice display a complete embryogenesis and die only a few hours after birth as a result of respiratory failure [5], whereas *Ptc1*^{-/-} mice die around E8.5, with a severe cardiac insufficiency [13]. Moreover, *Shh* chemoattractive and chemorepulsive activities have been reported to be mediated by *Ptc1* and *Hip*, respectively [3,14]. Our present data indicate that, at an embryonic time

later than those previously reported (E8.5–E10.5) [1,11], the *Ptc1* and *Hip* expression profiles overlap in many areas directly adjacent to *Shh* sources, in agreement with the characterization of *Hip* and *Ptc1* as *Shh* target genes. The more widespread expression pattern observed for *Ptc1* compared with *Hip*, however, suggests that their transcriptional regulation is likely not strictly comparable. The expression profile of *Ptc1* close to the 3v and ganglionic eminences reminds one of that reported in E12.5 and E14.5 embryos for *Olig2* induced by *Shh* to direct progenitors to an oligodendroglial fate [15]. These spatial and temporal features suggest that *Ptc1* and *Hip* might both participate in the combinatorial code acting in the specification of oligodendrocytes, but likely not in a strictly equivalent manner.

In the adult brain, *Ptc1* and *Hip* have likely nonredundant activities, because *Hip* and *Ptc1*-expressing cells are not found in the same areas, although in both cases these areas mostly appear complementary to those of *Shh* [7]. In agreement with the latter observations, *Hip* is expressed in a subpopulation of *nNOS* neurons in the caudate putamen, in which neither *Ptc1* nor *Shh* are detected. It has been shown, however, that *nNOS*-immunoreactive interneurons are innervated by projecting neurons of the globus pallidus [16]. Whether *Shh* expression in GABAergic interneurons in the globus pallidus [9] coincides with one of these populations of neurons is not known. Considering that the anterograde *Shh* axonal transport, which has been demonstrated in the adult rodent brain [9,17], presumably occurs also in GABAergic projecting neurons, *Shh*-expressing neurons in the globus pallidus might provide a source of ligand for *Hip*-expressing cells in the striatum. In agreement, we have detected *Shh* protein in the striatum by Western blot analysis [9]. It is also possible that some *Hip* functions in the adult brain might not be related to *Shh* signaling. *Hip* has recently been identified as an inhibitor of Wnt-8 and eFgf/Fgf-8 signaling during olfactory and lens placode formation in *Xenopus* [18].

The present data on *Hip* expression in *nNOS*-positive cells in the caudate putamen should help to further identify *Hip* roles in this area. In the brain, NO is a neuronal messenger synthesized from L-arginine and released by diffusion [19]. NO is thought to activate soluble guanylate cyclase and the production of cGMP, a second cyclic nucleotide messenger that can modulate the physiological response of a neuron. A direct link between *Shh* signaling and NO functions in the adult brain has not been reported yet. It has been shown, however, that cGMP analogs enhance the differentiating response of chick neural plate explants to *Shh* [20]. Although we cannot exclude a role of *Hip* outside the *Shh* signaling pathway, it would be interesting to investigate whether *Shh* signaling modulates *nNOS* expression and functions by binding to *Hip* and also whether NO signaling acts on soluble and membrane-associated forms of neuronal *Hip* that might be implicated in regulating *Shh* proteins in the adult [7]. Such experiments should clarify the roles of *Shh* protein proposed to regulate cell maintenance in the telencephalic stem cell niches [21], neurogenesis in the mature hippocampus [17] and electrophysiological properties of mature neurons [22].

Conclusion

Altogether, the present data indicate differences in the spatial localizations of *Ptc1* and *Hip* mRNA in the embryo

and the adult brain. Moreover, this work suggests that potential interactions may exist between the signaling pathway involving Hip and the mechanisms regulating production and release of the gaseous neurotransmitter NO in the brain, a hypothesis that merits further investigations.

References

1. Chuang PT, McMahon AP. Vertebrate hedgehog signalling modulated by induction of a hedgehog-binding protein. *Nature* 1999; **397**:617–621.
2. McMahon AP, Ingham PW, Tabin CJ. Developmental roles and clinical significance of hedgehog signaling. *Curr Top Dev Biol* 2003; **53**:1–114.
3. Charron F, Tessier-Lavigne M. Novel brain wiring functions for classical morphogens: a role as graded positional cues in axon guidance. *Development* 2005; **132**:2251–2262.
4. Treier M, O'Connell S, Gleiberman A, Price J, Szeto DP, Burgess R, et al. Hedgehog signaling is required for pituitary gland development. *Development* 2001; **128**:377–386.
5. Chuang PT, Kawcak T, McMahon AP. Feedback control of mammalian Hedgehog signaling by the Hedgehog-binding protein, Hip1, modulates Fgf signaling during branching morphogenesis of the lung. *Genes Dev* 2003; **17**:342–347.
6. Chen Y, Struhl G. Dual roles for patched in sequestering and transducing Hedgehog. *Cell* 1996; **87**:553–563.
7. Coulombe J, Traiffort E, Loulier K, Faure H, Ruat M. Hedgehog interacting protein in the mature brain: membrane-associated and soluble forms. *Mol Cell Neurosci* 2004; **25**:323–333.
8. Traiffort E, Charytoniuk D, Watroba L, Faure H, Sales N, Ruat M. Discrete localizations of hedgehog signalling components in the developing and adult rat nervous system. *Eur J Neurosci* 1999; **11**:3199–3214.
9. Traiffort E, Moya KL, Faure H, Hassig R, Ruat M. Discrete localizations of hedgehog signalling components in the developing and adult rat nervous system. *Eur J Neurosci* 2001; **14**:839–850.
10. Bredt DS, Hwang PM, Glatt CE, Lowenstein C, Reed RR, Snyder SH. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature* 1991; **351**:714–718.
11. Jeong J, McMahon AP. Growth and pattern of the mammalian neural tube are governed by partially overlapping feedback activities of the hedgehog antagonists patched 1 and Hhip1. *Development* 2005; **132**:143–154.
12. Goodrich LV, Johnson RL, Milenkovic L, McMahon JA, Scott MP. Conservation of the hedgehog/patched signaling pathway from flies to mice: induction of a mouse patched gene by Hedgehog. *Genes Dev* 1996; **10**:301–312.
13. Goodrich LV, Milenkovic L, Higgins KM, Scott MP. Altered neural cell fates and medulloblastoma in mouse patched mutants. *Science* 1997; **277**:1109–1113.
14. Bourikas D, Pekarik V, Baeriswyl T, Grunditz A, Sadhu R, Nardo M, Stoeckli ET. Sonic hedgehog guides commissural axons along the longitudinal axis of the spinal cord. *Nat Neurosci* 2005; **8**:297–304.
15. Nery S, Wichterle H, Fishell G. Sonic hedgehog contributes to oligodendrocyte specification in the mammalian forebrain. *Development* 2001; **128**:527–540.
16. Bevan MD, Booth PA, Eaton SA, Bolam JP. Selective innervation of neostriatal interneurons by a subclass of neuron in the globus pallidus of the rat. *J Neurosci* 1998; **18**:9438–9452.
17. Lai K, Kaspar BK, Gage FH, Schaffer DV. Sonic hedgehog regulates adult neural progenitor proliferation *in vitro* and *in vivo*. *Nat Neurosci* 2003; **6**:21–27.
18. Cornesse Y, Pieler T, Hollemann T. Olfactory and lens placode formation is controlled by the hedgehog-interacting protein (Xhip) in *Xenopus*. *Dev Biol* 2005; **277**:296–315.
19. Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide, a novel neuronal messenger. *Neuron* 1992; **8**:3–11.
20. Robertson CP, Gibbs SM, Roelink H. cGmp enhances the sonic hedgehog response in neural plate cells. *Dev Biol* 2001; **238**:157–167.
21. Machold R, Hayashi S, Rutlin M, Muzumdar MD, Nery S, Corbin JG, et al. Sonic hedgehog is required for progenitor cell maintenance in telencephalic stem cell niches. *Neuron* 2003; **39**:937–950.
22. Pascual O, Traiffort E, Baker DP, Galdes A, Ruat M, Champagnat J. Sonic hedgehog signaling in neurons of adult ventrolateral nucleus tractus solitarius. *Eur J Neurosci* 2005; **22**:389–396.

3. ARTICLE 3

Karine Loulier, Martial Ruat, Elisabeth Traiffort. *Increase of proliferating oligodendroglial progenitors in the adult mouse brain upon Sonic Hedgehog delivery in the lateral ventricle*, (article en révision).

RESUME DE L'ARTICLE 3

La cascade cellulaire Shh est aussi présente dans le cerveau de rongeurs adultes (Traiffort et al., 1998 ; Traiffort et al., 1999 ; Traiffort et al., 2001). Elle peut être activée dans la zone sous ventriculaire (ZSV) par l'administration du fragment N-terminal actif de la protéine Shh, ShhN (Charytoniuk et al., 2002b) ou d'un agoniste de Smo (Machold et al., 2003). De plus, Shh est capable de réguler la neurogenèse dans l'hippocampe mature (Lai et al., 2003). Ces observations nous ont conduit à déterminer quels pouvaient être les effets induits par l'injection stéréotaxique de la protéine recombinante ShhN dans le ventricule latéral (VL) sur les progéniteurs neuraux de la souris adulte. Dans cette étude, nous montrons que deux jours après l'injection stéréotaxique de ShhN, la transcription de deux des principaux gènes cibles de la voie de signalisation Shh, à savoir *Ptc* et le facteur de transcription *Gli1*, est induite dans plusieurs aires cérébrales parmi lesquelles le striatum, le septum latéral, le corps calleux et le cortex cérébral. Cette induction est détectée à la fois du côté ipsilatéral et du côté contralatéral au site d'injection chez les animaux ayant reçu le traitement ShhN, mais n'est pas observée dans les animaux contrôles. Par ailleurs, la présence de cellules doublement marquées *Ptc*⁺/*BrdU*⁺ dans le cortex et le corps calleux des animaux traités avec la protéine ShhN indique clairement la capacité d'une population de cellules en prolifération dans ces régions à répondre à la signalisation Hh. De plus, les souris ayant reçu la protéine ShhN présentent une augmentation de la prolifération cellulaire dans le cortex cérébral et le corps calleux, révélée par un nombre élevé de cellules ayant incorporé le 5-Bromo-2'-désoxyUridine (*BrdU*) en phase S du cycle cellulaire. Le nombre de cellules *BrdU*⁺ est augmenté d'un facteur 2.5 dans le corps calleux et 3 dans le cortex cérébral des souris ayant reçu la protéine ShhN en comparaison des souris contrôles. Une telle augmentation n'a pas été observée dans la ZSV, une aire de neurogenèse majeure chez

l'adulte. Parmi les cellules BrdU⁺ analysées, le pourcentage de cellules exprimant un marqueur oligodendroglial, le protéoglycane membranaire NG2, est significativement plus élevé dans le cortex des souris ayant reçu la protéine ShhN. Par ailleurs, deux jours après l'injection de ShhN, un nombre significativement plus important de cellules en prolifération exprimant le marqueur des précurseurs oligodendrocytaires NG2, est observé dans le cortex cérébral de ces souris par rapport aux souris contrôles.

Pour déterminer si une injection de la protéine ShhN avait des effets à long terme, un autre groupe de souris traitées a été sacrifié au bout de 13 jours. Le nombre de cellules BrdU⁺ apparaît encore significativement élevé et le nombre de cellules doublement marquées BrdU⁺/NG2⁺ est augmenté chez les souris ayant reçu ShhN.

Afin d'analyser l'effet à plus long terme de la surexpression continue de la protéine Shh, un vecteur adénoviral Ad5-hShh-ires-eGFP destiné à exprimer la forme humaine de la protéine Shh a été développé, puis caractérisé *in vitro* par infection de cellules CHO-K1. Un peptide ShhN de 22 kDA est produit de manière concentration-dépendante et en fonction du temps dans le surnageant de cellules infectées par le vecteur adénoviral Ad5-hShh-ires-eGFP. Ce vecteur a ensuite été délivré dans le ventricule latéral de souris adultes. Quatre jours après, la protéine Shh est détectée, par immunohistochimie, dans les régions épendymaire et subépendymaire du VL et une forte transcription de Gli1 est retrouvée dans la ZSV, le striatum, le corps calleux et le cortex cérébral. Vingt-six jours après l'injection du vecteur Ad5-hShh-ires-eGFP, la voie Shh est toujours active comme le révèle la présence de nombreuses cellules exprimant le transcrit Gli1 dans les mêmes aires cérébrales. Une augmentation de 50% du nombre de cellules BrdU⁺ exprimant le marqueur oligodendroglial DM20⁺ est détectée dans le cortex cérébral et le corps calleux des souris ayant reçu le vecteur adénoviral Ad5-hShh-ires-eGFP par rapport aux souris ayant reçu le vecteur contrôle Ad5-eGFP. Par contre, nous n'avons pas observé de différence significative entre les pourcentages

de cellules BrdU+ exprimant des marqueurs oligodendrogliaux plus matures, tels que MBP, RIP ou CNPase, ou des marqueur d'astrocytes (GFAP) ou de neurones matures (NeuN) chez les souris traitées avec le vecteur Ad5-hShh-ires-eGFP.

Dans leur ensemble, ces résultats suggèrent la capacité de la voie Shh à stimuler les cellules oligodendrocytaires pré-matures dans plusieurs régions du cerveau de rongeurs adultes. Nos données apportent ainsi des arguments en faveur de l'implication de la voie de signalisation Shh dans la régulation des progéniteurs neuraux et la modulation de cette voie apparaît donc potentiellement intéressante pour le traitement des maladies affectant le lignage oligodendrocytaire.

**INCREASE OF PROLIFERATING OLIGODENDROGLIAL PROGENITORS IN THE
ADULT MOUSE BRAIN UPON SONIC HEDGEHOG DELIVERY
IN THE LATERAL VENTRICLE**

By

Karine Loulier, Martial Ruat* and Elisabeth Traiffort*

CNRS, Signal Transduction and Developmental Neuropharmacology, UPR9040 Laboratoire de Neurobiologie Cellulaire et Moléculaire, Institut de Neurobiologie Alfred Fessard, IFR 2118, 1 avenue de la terrasse, 91198 Gif sur Yvette, France

Abbreviations

eGFP, enhanced Green Fluorescent Protein; LV, lateral ventricle; OL, oligodendrocyte; OLP, oligodendroglial precursor; Ptc, Patched; Shh, Sonic Hedgehog; ShhN, aminoterminal domain of Sonic Hedgehog; Smo, Smoothened; SVZ, subventricular zone.

* Correspondence should be addressed to M.R. (e-mail : ruat@nbcn.cnrs-gif.fr, phone: 33 1 69 82 36 41, fax: 33 1 69 82 36 39 or E.T. (e-mail : Elisabeth.Traiffort@nbcn.cnrs-gif.fr, phone: 33 1 69 82 43 01, fax: 33 1 69 82 36 39)

ABSTRACT

Sonic hedgehog signaling is not only involved in growth and patterning in the embryo, but is also required for the maintenance of stem cell niches in the postnatal subventricular zone and the proliferation of neural progenitors in the mature hippocampus. We show here that delivery of Sonic hedgehog protein into the lateral ventricle of adult mice increases cell proliferation in the corpus callosum and cerebral cortex. In this latter area, the number of neural progenitors expressing the proteoglycan NG2 is enhanced two days after the injection. Twenty-six days following the adenovirus-mediated delivery of Sonic hedgehog into the lateral ventricle, newly generated cells in the cerebral cortex and in the corpus callosum are influenced towards the initial steps of oligodendrogenesis as indicated by a fifty percent increase in the number of cells expressing the oligodendroglial marker DM20. Sonic hedgehog signaling is associated to these effects as indicated by the robust upregulation of Patched and Gli1 mRNAs, two downstream transcriptional targets of the pathway. Our experiments demonstrate that the number of oligodendrocyte precursor cells in the cerebral cortex and corpus callosum can be increased upon delivery of Sonic hedgehog proteins and highlight the potential capacity of the adult brain to mobilize a pool of premyelinating cells.

Keywords: morphogen, adenoviral transfer, cerebral cortex, corpus callosum.

Running title : Shh and oligodendroglial fate in adult brain

INTRODUCTION

Sonic Hedgehog (Shh) is a member of the Hedgehog family of secreted proteins involved in embryonic development. Synthesized as a large precursor protein, Shh undergoes an unique post-translational processing including autoproteolysis and lipid modifications of its biologically active aminoterminal (ShhN) domain. ShhN binding to its receptor Patched (Ptc) relieves the inhibition that Ptc exerts on the seven transmembrane domain protein Smoothed (Smo). This leads to the activation of downstream Shh target genes including the transcription factors of the Gli family and Ptc itself (Briscoe and Therond, 2005). During the early embryonic stages, Shh is responsible for the ventralization of the neural tube and specifies the fate of ventral cells including motoneurons and interneurons of the spinal cord, dopaminergic neurons of the midbrain and serotonergic cells of the ventral forebrain (McMahon *et al.*, 2003).

Gain and loss-of-function experiments in mouse have further indicated that Shh is required for the specification of a first wave of oligodendroglial progenitors (OLP) originating in the ventral regions of the embryonic spinal cord and forebrain through induction of genes encoding the bHLH proteins, Olig1 and Olig 2 (Briscoe and Therond, 2005; McMahon *et al.*, 2003; Rowitch, 2004). In the dorsal spinal cord, a later production of OLP was reported to be Shh-independent (Cai *et al.*, 2005), while in the neocortex Shh also potently induces precursors to adopt an oligodendroglial fate (Murray *et al.*, 2002).

In the postnatal and adult nervous system, the cellular Shh cascade is still present (Coulombe *et al.*, 2004; Traiffort *et al.*, 1999) and ShhN modulates electrophysiological properties of mature neurons (Pascual *et al.*, 2005). During postnatal development, Shh regulates the proliferation of cells in the dorsal brain, namely the neocortex, tectum and cerebellum (Ruiz i Altaba *et al.*, 2002). It controls the number of neocortical cells with stem cell properties and is required for the maintenance of stem cell niches in the subventricular zone (SVZ) of the lateral ventricles (LV), a major neurogenesis area in the adult (Machold *et al.*, 2003; Palma and Ruiz i Altaba, 2004). In adulthood, the adenovirus-associated mediated

transfer of Shh in the hippocampus regulates the proliferation of adult neural progenitors in the subgranular zone (SGZ) of the dentate gyrus (Lai *et al.*, 2003). In addition, the *in vivo* administration of ShhN in rodent striatum (Charytoniuk *et al.*, 2002) or of a Smo agonist orally in mouse (Machold *et al.*, 2003) activates the Shh signaling pathway in the adult SVZ. However, *in vivo* analysis of Smo and Shh null mice and *in vitro* data obtained with neurospheres derived from adult neural stem cells did not allow to conclude whether stimulation of adult SVZ cells *in vivo* by Shh induces cell proliferation (Machold *et al.*, 2003; Palma *et al.*, 2005).

Those observations prompted us to investigate the effects induced by the stereotaxic delivery of Shh into the LV on the neural progenitors of adult mice *in vivo*. Here we show that the activation of Shh pathway occurs in several brain areas, including the SVZ, the corpus callosum and the cerebral cortex. We observed a potent increase in the number of proliferating cells, namely those expressing the oligodendroglial markers NG2 and DM20 in the cerebral cortex or DM20 in the corpus callosum.

MATERIAL AND METHODS

Adenovirus production. Adenoviral vectors were generated by the Genethon Viral Production Network (Genopôle, Evry, France): pAd/CMV:huShh:IRES:eGFP contains human Shh cDNA (from Dr C. Tabin) under the control of the constitutive cytomegalovirus promoter, placed in tandem sequence with enhanced green fluorescent protein (eGFP) under the control of an internal ribosomal entry site; pAd/CMV:IRES:eGFP excludes Shh cDNA and was used as a control. Replication-defective recombinant type 5 adenoviruses (AdhuShh-eGFP and Ad-eGFP) were obtained.

Recombinant protein and BrdU injection. Male adult OF1 mice (25-30 g) were anesthetized with pentobarbital and stereotaxically injected into the right lateral ventricle (LV; anteroposterior +0.2 mm, lateral +0.8 mm, dorsoventral -2.5 mm) (Shimazaki *et al.*, 2001), with

5 μ l (3 μ g) of human ShhN (Biogen Idec, Boston, USA) or the vehicle solution as described (Charytoniuk *et al.*, 2002). Two days later, mice (n=5 for each group) received either 2 intraperitoneal (i.p.) injections of bromodeoxyuridine (BrdU) as described (Charytoniuk *et al.*, 2002) and were sacrificed 2 hr following the last injection (“D2 mice”), or 4 injections of BrdU and were sacrificed 15 days after the stereotaxic injection (“D15 mice”). All procedures were carried out in accordance with the European Communities Council Directive (86/806/EEC) for the care and use of laboratory animals.

Adenoviral vector injection. 75.10^6 plaque forming units (pfu) of either Ad-eGFP or AdhuShh-eGFP were injected into the right LV (3 μ l) of mice as described above. At D4, mice either were sacrificed (“D4 mice”, n=2 for each group) or were injected once daily between D4 and D18 before being sacrificed at D26 (“D26 mice”, n=6 for each group).

Tissue processing and immunostaining. Frontal brain sections (16 μ m) were processed and immunostained with primary antibodies against BrdU (1:200), CNPase (1:200, Sigma, Saint Quentin Fallavier, France), ShhN (1:500), GFAP (1:500; Dako, Cergy Saint-Christophe, France), rabbit NG2 (1:500), mouse NeuN (1:1000), mouse RIP (1:100000) (Chemicon, Paris, France) as described (Charytoniuk *et al.*, 2002; Traiffort *et al.*, 2001). The secondary antibodies used were: biotinylated goat anti-rat (1:200, Vector Laboratories, Paris, France), FITC- or TRITC-labeled goat anti-rat (1:400, Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., Marseille, France), FITC-labeled goat anti-rabbit (1:400, Santa Cruz Biotechnologies, Le Perray en Yvelines, France), highly cross-adsorbed goat anti-mouse and anti-rabbit Alexa Fluor 546 (1:1000, Molecular Probes, Cergy Pontoise, France). Immunofluorescent signals were detected by a conventional epifluorescence microscope (Leica DMRXA2; Leica Microsystems, Rueil Malmaison, France) or an upright laser scanning confocal microscope (Leica TCS SP2). Photomicrographs presented are from the cerebral hemisphere contralateral to the injection site unless mentioned. *In situ* hybridization (ISH) experiments using Ptc, Gli1, DM20 or MBP specific probes were performed as described (Charytoniuk *et al.*, 2002). After alkaline

phosphatase revelation, sections were either mounted with Aquaperm FluidTM medium (CML, Nemours, France) or washed in PBS before revelation of anti-BrdU immunohistochemistry (IHC) as described (Charytoniuk *et al.*, 2002).

Cell counting. All cell counts were performed by two independent experimenters according to a double-blind protocol. BrdU⁺ nuclei were counted under a light microscope within the entire area of the cortex, corpus callosum, striatum and SVZ observed in 3-5 slices per animal (n=5 for each group of “D2” and “D15 mice”, n=6 for each group of “D26 mice”). The lateralities of the slices analyzed were comparable for each mouse and encompassed bregma levels -1.22 and +1.42. BrdU⁺ cells coexpressing another marker were quantified in the contralateral cortex except when stated in 3-6 consecutive slices from the sampled lateralities described above. Two counting areas (620 μ m \times 815 μ m, represented as red boxes in Fig. 2C) were defined with the 10X objective. The total number of BrdU⁺ nuclei was evaluated in each counting area. Results were expressed in percentage of this total number. Statistical analysis was performed using consecutively the unpaired bilateral Student’s t test and one way ANOVA. Statistical significance was considered for p value < 0.05 and high significance for p value < 0.01.

Western blot analysis. Expression of ShhN was investigated on homogenates and culture media from CHO-K1 cells (1.5×10^6 / 3 ml) harvested 24 and 48 hr after infection with increasing concentrations of AdhuShh-eGFP, and on homogenates of 30 cryostat-cut consecutive sections evenly harvested between bregma levels -1.22 and +1.42 for each adenovirus-infected brain analyzed. Western blot analysis was performed using the ShhN antiserum (Traiffort *et al.*, 2001) on either 12 μ l of culture medium or 30 μ g of proteins from brain homogenates.

RESULTS

Proliferation of cells in response to Shh

To investigate whether stimulation of adult SVZ cells *in vivo* by Shh induces cell proliferation, we have stereotaxically injected 3 μ g of ShhN directly into the right LV of adult mice (Fig. 1A). The animals were then killed 2 days later. We first demonstrated activation of the pathway by a robust upregulation of Ptc mRNA, a downstream transcriptional target of Shh signaling. The increase of Ptc transcription was observed in chains of cells in the SVZ and rostral migratory stream (RMS), in scattered cells in the striatum, lateral septum, corpus callosum and cerebral cortex from ShhN- (n=5), but not from vehicle-treated animals (n=5; Fig. 1B-F). Such activation was observed in both ipsi- and contralateral sides indicating the active ShhN protein had diffused throughout the cerebrospinal fluid. Further evidence for pathway activation in these brain areas was demonstrated by the increased mRNA of the transcription factor Gli1 from ShhN- but not from vehicle-treated animals (data not shown).

To study cell proliferation, mice received 2 i.p. injections of BrdU at 2 hr intervals the day of sacrifice, and were killed 2 hr after the last injection. Analysis of frontal brain sections from ShhN- and vehicle-treated animals showed the presence of BrdU⁺ cells in the SVZ, the corpus callosum, the cerebral cortex and also to a lesser extent in other brain areas such as the lateral septum and the striatum (Fig. 2A-C). Furthermore, we observed the presence of double-labeled Ptc⁺/BrdU⁺ cells in the cortex, the corpus callosum and the SVZ of Shh-treated mice but not of control mice (Fig. 2D, E and data not shown), indicating the presence of proliferating Shh-responsive cells in these regions. ShhN treatment was not followed by a significant increase of cell proliferation in the SVZ, nor in the striatum compared to controls in both contralateral and ipsilateral sides. However, in the contralateral side, BrdU⁺ cell number was significantly enhanced by 2-3 fold in the corpus callosum (ShhN, 34 ± 2 cells per section, total counted cells n= 1370; control 14 ± 1 , n= 416; $p < 0.01$) and more than 3 fold in the cortex

(ShhN, 85 ± 5 , $n=3381$; control 25 ± 5 , $n=749$; $p < 0.01$) upon ShhN treatment (Fig. 3). Similar results were obtained from the injected side (data not shown).

Shh signaling induces NG2⁺ progenitor proliferation in the mature cerebral cortex

To characterize the phenotype of the proliferating cells in both the corpus callosum and cerebral cortex, frontal sections were stained for BrdU and NG2, a chondroitin sulfate proteoglycan expressed by cells representing the major pool of adult brain proliferative progenitors distributed throughout the adult CNS and described mainly as OLP (Dawson *et al.*, 2003). Immunohistochemical analysis revealed expression of NG2 reactivity on both the body and processes of cells that were often bipolar and distributed both in the white and gray matter of both treated and control animals. Among BrdU⁺ cells analyzed by conventional and confocal microscopy, the percentage of BrdU⁺/NG2⁺ cells was significantly higher ($p < 0.05$) in the cortex of ShhN-treated animals (Fig. 4A, B; Table 1), but not in the corpus callosum (data not shown). Analysis of BrdU⁺/GFAP⁺ staining (Fig. 4C, D) indicated that the percentage of BrdU⁺/GFAP⁺ cell number was decreased but did not reach significance in ShhN-treated mice (Fig. 4C, D; Table 1). Thus, ShhN injection in the LV induced an increase of proliferation of NG2⁺ cells in the cortex.

Analysis of the origin of newly generated cells

Whereas no effect on BrdU index has been found in the SVZ at two days after ShhN injection (see above), we have further investigated the source of the cells that can contribute to ShhN-induced proliferation. SVZ proliferating cells migrate along the RMS to reach the olfactory bulb where they differentiate into GABAergic interneurons (Alvarez-Buylla and Lim, 2004). As migrating neuroblasts expressing markers such as PSA-NCAM or doublecortin may migrate not only rostrally, but also caudally in specific experimental conditions to the corpus callosum and cortex (Magavi *et al.*, 2000; Picard-Riera *et al.*, 2002), we looked for the presence

of cell chains labeled with these markers that would reflect such migration within the short time period after ShhN injection. In both the corpus callosum and cortex from ShhN-treated animals, we detected neither migrating PSA-NCAM nor doublecortin positive cells, nor chains of BrdU⁺ nuclei, which both would have reflected cell migration from the SVZ or from adjacent tissues (data not shown). In contrast, we observed a higher percentage of BrdU⁺ nuclei doublets (inset Fig. 2A) in the cortex of ShhN-treated mice (ShhN, 11 ± 2 %, total counted cells n=89; control, 6 ± 3 %, n=13; $p < 0.05$) strongly suggesting that the newly generated cells have their origin within the cortex itself.

Characterization of proliferating cells phenotype

In order to permit newly generated cells to reach a mature phenotype, we allowed another group of treated mice to survive 13 days after the last BrdU injection which was also done at D2 (Fig. 5A). We then analyzed the phenotype of BrdU⁺ cells in the cortex on frontal sections from these animals. In ShhN-treated “D15 mice”, Ptc mRNA expression was reduced as evidenced in the SVZ, the corpus callosum and the cortex compared to “D2 mice” (Fig. 5B and Fig. 1B, C, E). However, the number of BrdU⁺ cells remains significantly higher in ShhN-treated mice compared to control (Fig. 5C; ShhN, 155 ± 13 cells per section, total counted cells n= 4330; control, 111 ± 11 , n= 2337; $p < 0.05$). Double immunohistofluorescence experiments were carried out using antibodies against BrdU and several specific cell markers for OLP (NG2), astrocytes (GFAP) or differentiated neurons (NeuN). An increase in the number of BrdU⁺/NG2⁺ cells was still observed (ShhN, 32 ± 4 %, total double-labeled cells counted n= 776; control, 21 ± 4 %, n= 369; $p < 0.05$). The percentages of BrdU⁺/GFAP⁺ cells (ShhN, 29 ± 2 , n= 121; control, 28 ± 4 , n= 50) or BrdU⁺/ NeuN⁺ cells (ShhN, 8 ± 3 , n= 28; control, 8 ± 4 , n= 16) were not different between ShhN- and vehicle-treated mice. Interestingly, a significantly higher number of newly generated BrdU⁺ cells was found juxtaposed to mature neurons (Fig. 5D) in the ShhN-treated group (ShhN, 45 ± 2 %, n= 164; control, 34 ± 4 %, n= 70; $p < 0.05$)

reminiscent of the perineuronal satellite cells previously reported to belong to the astro- or oligodendroglial lineage (Kuhn *et al.*, 1997). These data suggest that an acute injection of ShhN into the LV does not drive further differentiation of newly generated cells in the cortex into mature neurons or astrocytes.

Characterization of the adenovirus-mediated transfer of ShhN into the LV of adult mouse

To get a sustained endogenous expression of ShhN in the adult brain, we used an adenoviral vector bearing the gene encoding the full-length human Shh protein and eGFP (AdhuShh-eGFP). This vector was developed in order to express the Shh precursor protein which should be able to be fully processed to produce the active aminoterminal Shh product (Porter *et al.*, 1995; Traiffort *et al.*, 2004). CHO-K1 cells were first infected with AdhuShh-eGFP and the presence of a 22 kDa ShhN peptide produced in a time and concentration-dependent manner was identified in the culture medium by western blot analysis (Fig. 6A). Adult mice were then injected (75×10^6 pfu) with AdhuShh-eGFP or a control adenoviral vector (Ad-eGFP) into the right LV and were allowed to survive 4 (Fig. 6B) or 26 (Fig. 7A) days. eGFP fluorescence was detected at the level of the ependymal cell layer both in the ipsi- and contralateral sides on frontal sections from animals injected with both vectors (data not shown). These data confirmed that the adenoviral particles are able to move throughout the cerebrospinal fluid as previously reported by others (Benraiss *et al.*, 2001). At D4, a robust Shh immunoreactivity was observed in infected cells bordering both the lateral and the third ventricle walls and was detected over several cell diameters inside the parenchyma in AdhuShh-eGFP-, but not in Ad-eGFP-treated animals (Fig. 6C-E). This immunoreactivity corresponds to ShhN peptide identified by western blot from tissue sections analyzed at this level in AdhuShh-eGFP injected animals suggesting the local production of ShhN peptide in the vicinity of SVZ cells (Fig. 6F). Further analysis of Shh signaling components indicated a robust increase of both Gli1 (Fig. 6G) and Ptc (data not shown) transcription in the same brain regions that were

previously identified after recombinant ShhN injection, including the SVZ, the corpus callosum and the cortex (see Fig. 1B-F), indicating activation of the pathway. Such transcription was not observed in tissue sections from Ad-eGFP animals (Fig. 6H and data not shown).

Adenovirus-mediated production of ShhN orients newly generated cells to the oligodendroglial lineage

Animals that were allowed to survive until D26, received a daily injection of BrdU between D4 and D18 to label proliferating cells (Fig. 7A). At D26, the Shh pathway was still active throughout the cortex from AdhuShh-eGFP animals as indicated by Gli1 transcription compared to control mice (Fig. 7B, C). We then examined the percentage of cells double-labeled for BrdU and the oligodendroglial marker NG2 in the cerebral cortex on sections from these animals. We observed that the percentage of BrdU⁺/NG2⁺ cells was significantly higher in animals that received AdhuShh-eGFP compared to control animals (AdhuShh-eGFP, 39 ± 3 %, total counted cells n=436; control 32 ± 2 %, n=214; p<0.05) (Fig. 8). To further investigate the phenotype of proliferating cells in the cerebral cortex and corpus callosum, first we used markers for premature (DM20 and MBP transcripts) or more mature (RIP, CNPase antigens) oligodendroglial cells. In the cortex of ShhN-treated mice, we observed a 50% increase in the percentage of BrdU⁺/DM20⁺ cells (AdhuShh-eGFP, 27 ± 1 %, total counted cells n=356; control, 18 ± 1 %, n=187; p<0.01) (Fig. 7D, 8). Interestingly, a similar increase in the percentage of BrdU⁺/DM20⁺ cells was found in the corpus callosum (AdhuShh-eGFP, 27 ± 1 %, total counted cells n=786; control, 19 ± 2 %, n=409; p<0.01) (data not shown). Thus, these data indicate that newly generated cells in the cortex and corpus callosum express the transcript of the major splice variant of the proteolipid protein PLP. In contrast, in these regions, we did not observe a significant difference between the percentages of BrdU⁺ cells expressing the other oligodendroglial markers (MBP, RIP, CNPase) or markers of astrocytes (GFAP) and mature neurons (NeuN) (Fig. 8 and data not shown). Altogether these experiments indicate that the

activation of Shh signaling *in vivo* in the adult brain is associated with an increase in cell proliferation in the cerebral cortex and corpus callosum and the regulation of brain precursor fate towards the first maturation steps of the oligodendroglial lineage.

DISCUSSION

We have delivered active forms of Shh in the LV using various strategies in order to determine its potential role in the regulation of neural progenitors in the mature brain. Our *in vivo* experiments demonstrate that the number of proliferating progenitors in the cerebral cortex and the corpus callosum can be increased upon brain administration of Shh proteins. They also indicate that Shh signaling is further involved in the expansion of the proliferating cell populations expressing the NG2 proteoglycan in the cerebral cortex and the DM20 oligodendroglial marker in cortical and callosal regions.

Although we cannot definitively exclude the possibility that the increase in the number of BrdU⁺ cells in the cerebral cortex and corpus callosum derives from proliferating cells migrating from the SVZ, several arguments are in supportive of an *in situ* proliferation of cells. First, we did not detect any increase in the number of BrdU⁺ cells in the SVZ, as already reported after activation of the Shh pathway in this region consecutive to an intrastriatal injection of ShhN (Charytoniuk *et al.*, 2002). Second, we did not observe in the corpus callosum or the cerebral cortex chains of BrdU⁺ cells or migrating neuroblasts which would have reflected the mobilization of cells displaying a backward and radial migration from the SVZ as previously described (Magavi *et al.*, 2000; Picard-Riera *et al.*, 2002). Third, the significant increase in the number of doublets of BrdU⁺ cells in the cerebral cortex is in accordance with an *in situ* proliferation. Finally, the presence of double-labeled Ptc⁺/BrdU⁺ cells in the corpus callosum and cerebral cortex of ShhN-treated animals clearly indicates the ability of a population of proliferating cells in those regions to respond to Shh signaling. However, the cortex constitutes an area remote from the site of delivery of Shh protein, which leads to

question about the mechanism through which Shh signaling pathway can be activated. We have previously demonstrated that ShhN is axonally transported in an anterograde manner from the hamster retina to the superior colliculus (Traiffort *et al.*, 2001) and lesion of the fornix interrupts basal forebrain anterograde transport of ShhN to the hippocampus (Lai *et al.*, 2003). Therefore, after Shh protein delivery, ShhN present in the LV might reach its target cells by axonal transport after being endocytosed by neurons close to one of the brain ventricles. This might be the case for cells of the basal amygdaloid nucleus bordering the LV and projecting to the frontal cortex (Kita and Kitai, 1990). It is noteworthy that recombinant ShhN used in the present study increases proliferation of cerebellar granule cell precursors, differentiation of the cell line C3H10T1/2 and controls electrophysiological properties of differentiated neurons at a subnanomolar concentration (Pascual *et al.*, 2005). In our present study, we observed a strong activation of Ptc and Gli1 transcription in several brain areas including the corpus callosum and the cerebral cortex suggesting that the concentration of ShhN was sufficient to activate the pathway. Nevertheless, we failed to detect ShhN by immunoreactivity in these regions presumably reflecting the limit of detection of our IHC protocol. However, the present data remind the report made by others of newly generated BrdU⁺ cells in several parenchyma areas, including the cerebral cortex, following the intracerebroventricular injection of BDNF. Those cells were distributed as a decreasing gradient from the closest to more remote regions around the lateral- and third- ventricles and were suggested, for a part, to be associated with cell division occurring *in situ* in the parenchyma (Pencea *et al.*, 2001).

Other growth factors, such as FGF (Fibroblast Growth Factor), EGF (Epidermal Growth Factor) or BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor), have already been reported to induce cell proliferation in the adult cerebral cortex, but neither the extent of the process nor the precise fate of the newly generated cells have been definitively characterized (Kuhn *et al.*, 1997; Pencea *et al.*, 2001). Our data do not support a potential indirect effect of Shh via the induction of such endogenous trophic factors. Indeed, exogenous FGF and EGF infused in the LV (Kuhn *et al.*,

1997) were reported to both increase the number of newborn cells in the SVZ, which is not observed upon administration of ShhN. In addition, BDNF infusion did not influence the number of BrdU⁺ cells in the frontal cortex (Benraiss *et al.*, 2001) unless BrdU is infused directly into the LV for several days (Pencea *et al.*, 2001).

In the adult brain, NG2-expressing cells have been reported to display features of stem cells distributed throughout the entire gray and white matter (Dawson *et al.*, 2003). Recent data indicate that NG2⁺ cells in the SVZ can give rise to interneurons in the hippocampus and the olfactory bulbs (Aguirre and Gallo, 2004; Aguirre *et al.*, 2004) and that a small population of NG2⁺ cells residing within the cortex itself may be the source of new neurons (Dayer *et al.*, 2005). These cells are, however, mainly characterized as OLP able to differentiate into OL *in vitro* and *in vivo*, and potentially increase the population of mature OL during adult life (Dawson *et al.*, 2003; Horner *et al.*, 2002). They can be mobilized from the SVZ in response to the demyelination process occurring in an animal model of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) (Picard-Riera *et al.*, 2002). Therefore, NG2⁺ cells are considered as a promising therapeutic approach towards alleviating extensive demyelination processes.

Here, we have shown that Shh signaling promotes the proliferation of NG2⁺ cells in the cortex as evidenced by the marked increase in the number of these cells upon delivery of an active form of ShhN in the LV. The transcriptional induction of DM20 in BrdU⁺ cells in the cortex and corpus callosum of AdhuShh-eGFP-treated D26 mice further supports the idea that Shh signaling can drive progenitor cell maturation towards the oligodendroglial lineage. During development, DM20 is expressed by premyelinating OL before PLP and is required for the maturation of these cells (Spassky *et al.*, 1998; Wight and Dobretsova, 2004). The 50% increase in the percentage of BrdU⁺/DM20⁺ cells in the cortex and corpus callosum of animals treated with the Shh adenoviral vector, indicates a strong effect on this cell population. Whether Shh responsive NG2⁺- and DM20⁺- cells in the cerebral cortex actually represent consecutive steps of the same lineage or two distinct types of progenitors remains to be further investigated. The

phenotypic characterization of dividing cells in AdhuShh-eGFP-treated D26 mice excludes that NG2⁺ cell increase is associated with the generation of new neurons in the cortex, which suggests that Shh does not influence adult neurogenesis in the cortex in contrast to the hippocampus (Lai *et al.*, 2003). Conversely, the absence of a significant increase in the number of NG2⁺ cells in the corpus callosum upon Shh treatment, despite a marked activation of Ptc and Gli1 transcription, disagrees with the hypothesis proposing NG2⁺ and DM20⁺ cells derive from the same lineage. Such a difference between the cerebral cortex and the corpus callosum might be accounted for by the heterogeneity described in the NG2⁺ cell population, mainly characterized at the level of their K⁺ and Na⁺ channel expression profiles and electrophysiological properties (Chittajallu *et al.*, 2004).

While the cerebral cortex and corpus callosum both contain progenitors sensitive to the proliferative activity of Shh, as previously found in the hippocampus (Lai *et al.*, 2003), the SVZ and striatum are insensitive to this effect, despite a potent activation of the Shh pathway. This result indicates that Shh effects are region-specific and is in agreement with the absence of a direct mitogenic effect of Shh in neurospheres from adult SVZ (Palma *et al.*, 2005). However, these data disagree with the increase and the decrease in cell proliferation observed in the adult mouse SVZ after peripheral administration of a Smo agonist and antagonist, respectively (Machold *et al.*, 2003; Palma *et al.*, 2005). It is possible that Smo activation can be achieved independently of Shh signaling and that some of Ptc effects can be mediated independently of Smo. Interestingly, the anti-apoptotic effect of Shh in the neural tube was suggested to be Ptc-related and Smo-independent (Thibert *et al.*, 2003).

In the developing cerebral cortex, the oligodendrogenesis process involves several steps including mainly the early Shh and FGF-dependent formation of OLP in the ventral forebrain (Kessaris *et al.*, 2004; Tekki-Kessaris *et al.*, 2001), and a second postnatal wave of precursors originating in the SVZ (Ivanova *et al.*, 2003). In addition, a local production of OLP derived from Emx-1 expressing cells was suggested to occur in the cerebral cortex after E17 and to give

rise to OL in the cortex, corpus callosum and fimbria (Gorski *et al.*, 2002). Mice invalidated for the receptor Smo subsequently to E12.5 stage have confirmed the role of Shh signaling in supporting the generation of OL from the ventral forebrain and indicated Shh requirement for the generation of pallial OL later during development (Machold *et al.*, 2003). Our data now suggest the involvement of Shh signaling in the generation of new OL in the adult brain, via a mechanism that may recapitulate the developmental processes described above. In this respect, the upregulation of the Nkx2.2 and Olig2 genes that are early markers of OL lineage, has been observed in a demyelination model in the adult brain (Fancy *et al.*, 2004; Watanabe *et al.*, 2004). Further work should delineate the specific combinatorial transcriptional code (including Olig1, Olig2, Mash1, Nkx2.2,...) induced by ShhN in newly generated cells and thus determine why this combination is apparently not sufficient to confer MBP promoter activation. It was recently shown that progressive stages of OL lineage maturation are characterized by dynamic changes in the subcellular distribution and combinatorial profiles of several transcriptional regulators (Gokhan *et al.*, 2005).

The presence of NG2⁺ cells throughout the whole brain (Dawson *et al.*, 2003) and spinal cord (Horner *et al.*, 2002) allows to suggest that Shh may participate in ongoing oligodendrogenesis in this persistent precursor population of the adult central nervous system. This process, which undoubtedly involves complex sets of signals such as insulin-growth factor-1, was recently shown to instruct multipotent neural precursors in the hippocampus to become OL (Hsieh *et al.*, 2004).

Taken together with the persistence of NG2⁺ cells observed in an EAE animal model (Reynolds *et al.*, 2002) or in demyelinating plaques of multiple sclerosis patients (Chang *et al.*, 2000), the proliferative effect of Shh on NG2⁺ cells and its transcriptional effect on DM20 gene might be of potential therapeutic interest for demyelinating diseases and complementary to the survival effect recently reported for LIF (Butzkueven *et al.*, 2002) and CNTF (Linker *et al.*, 2002). In agreement with our results, the induction of Shh and its receptor Ptc was recently

suggested to be required for overcoming the maturation-inhibitory effects of the Notch-1 signaling pathway in a model of nonautoimmune demyelination (Mastronardi *et al.*, 2004).

Acknowledgements

We thank A. Galdes and D.P. Baker (Biogen Idec, Cambridge, USA) for ShhN protein, A. Carleton and P.M. Lledo for technical advises and V. Zuliani and the Production Service Unit of Genethon for large scale production of adenoviral vectors within the Gene Vector Production Network (GVPN, <http://www.genethon.fr/gvpn>) program. K.L. is the recipient of a doctoral fellowship from the “Ministère de la Recherche”, and from La Ligue contre le Cancer and Association pour la Recherche contre le Cancer. This work was supported in part by a grant from GIS Institut des maladies rares, La Ligue contre le Cancer and Fondation pour la Recherche sur le Cerveau (FRC).

REFERENCES

- Aguirre A. and Gallo V. (2004) Postnatal neurogenesis and gliogenesis in the olfactory bulb from NG2-expressing progenitors of the subventricular zone. *J. Neurosci.* **24**, 10530-10541.
- Aguirre A.A., Chittajallu R., Belachew S. and Gallo V. (2004) NG2-expressing cells in the subventricular zone are type C-like cells and contribute to interneuron generation in the postnatal hippocampus. *J. Cell. Biol.* **165**, 575-589.
- Alvarez-Buylla A. and Lim D.A. (2004) For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron* **41**, 683-686.
- Benraiss A., Chmielnicki E., Lerner K., Roh D. and Goldman S.A. (2001) Adenoviral brain-derived neurotrophic factor induces both neostriatal and olfactory neuronal recruitment from endogenous progenitor cells in the adult forebrain. *J. Neurosci.* **21**, 6718-6731.
- Briscoe J. and Therond P. (2005) Hedgehog signaling: from the Drosophila cuticle to anti-cancer drugs. *Dev. Cell.* **8**, 143-151.
- Butzkueven H., Zhang J.G., Soilu-Hanninen M., Hochrein H., Chionh F., Shipham K.A., Emery B., Turnley A.M., Petratos S., Ernst M., Bartlett P.F. and Kilpatrick T.J. (2002) LIF receptor signaling limits immune-mediated demyelination by enhancing oligodendrocyte survival. *Nat. Med.* **8**, 613-619.
- Cai J., Qi Y., Hu X., Tan M., Liu Z., Zhang J., Li Q., Sander M. and Qiu M. (2005) Generation of oligodendrocyte precursor cells from mouse dorsal spinal cord independent of Nkx6 regulation and Shh signaling. *Neuron* **45**, 41-53.
- Chang A., Nishiyama A., Peterson J., Prineas J. and Trapp B.D. (2000) NG2-positive oligodendrocyte progenitor cells in adult human brain and multiple sclerosis lesions. *J. Neurosci.* **20**, 6404-6412.
- Charytoniuk D., Traiffort E., Hantraye P., Hermel J.M., Galdes A. and Ruat M. (2002) Intrastratial sonic hedgehog injection increases Patched transcript levels in the adult rat subventricular zone. *Eur. J. Neurosci.* **16**, 2351-2357.

- Chittajallu R., Aguirre A. and Gallo V. (2004) NG2-positive cells in the mouse white and grey matter display distinct physiological properties. *J. Physiol.* **561**, 109-122.
- Coulombe J., Traiffort E., Loulier K., Faure H. and Ruat M. (2004) Hedgehog interacting protein in the mature brain: Membrane-associated and soluble forms. *Mol. Cell. Neurosci.* **25**, 323-333.
- Dawson M.R., Polito A., Levine J.M. and Reynolds R. (2003) NG2-expressing glial progenitor cells: an abundant and widespread population of cycling cells in the adult rat CNS. *Mol. Cell. Neurosci.* **24**, 476-488.
- Dayer A.G., Cleaver K.M., Abouantoun T. and Cameron H.A. (2005) New gabaergic interneurons in the adult neocortex and striatum are generated from different precursors. *J. Cell. Biol.* **168**, 415-427.
- Fancy S.P., Zhao C. and Franklin R.J. (2004) Increased expression of Nkx2.2 and Olig2 identifies reactive oligodendrocyte progenitor cells responding to demyelination in the adult CNS. *Mol. Cell. Neurosci.* **27**, 247-254.
- Gokhan S., Marin-Husstege M., Yung S.Y., Fontanez D., Casaccia-Bonnet P. and Mehler M.F. (2005) Combinatorial profiles of oligodendrocyte-selective classes of transcriptional regulators differentially modulate myelin basic protein gene expression. *J. Neurosci.* **25**, 8311-8321.
- Gorski J.A., Talley T., Qiu M., Puelles L., Rubenstein J.L. and Jones K.R. (2002) Cortical excitatory neurons and glia, but not GABAergic neurons, are produced in the Emx1-expressing lineage. *J. Neurosci.* **22**, 6309-6314.
- Horner P.J., Thallmair M. and Gage F.H. (2002) Defining the NG2-expressing cell of the adult CNS. *J. Neurocytol.* **31**, 469-480.
- Hsieh J., Aimone J.B., Kaspar B.K., Kuwabara T., Nakashima K. and Gage F.H. (2004) IGF-I instructs multipotent adult neural progenitor cells to become oligodendrocytes. *J. Cell. Biol.* **164**, 111-122.

- Ivanova A., Nakahira E., Kagawa T., Oba A., Wada T., Takebayashi H., Spassky N., Levine J., Zalc B. and Ikenaka K. (2003) Evidence for a second wave of oligodendrogenesis in the postnatal cerebral cortex of the mouse. *J. Neurosci. Res.* **73**, 581-592.
- Kessaris N., Jamen F., Rubin L.L. and Richardson W.D. (2004) Cooperation between sonic hedgehog and fibroblast growth factor/MAPK signalling pathways in neocortical precursors. *Development* **131**, 1289-1298.
- Kita H. and Kitai S.T. (1990) Amygdaloid projections to the frontal cortex and the striatum in the rat. *J. Comp. Neurol.* **298**, 40-49.
- Kuhn H.G., Winkler J., Kempermann G., Thal L.J. and Gage F.H. (1997) Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain. *J. Neurosci.* **17**, 5820-5829.
- Lai K., Kaspar B.K., Gage F.H. and Schaffer D.V. (2003) Sonic hedgehog regulates adult neural progenitor proliferation in vitro and in vivo. *Nat. Neurosci.* **6**, 21-27.
- Linker R.A., Maurer M., Gaupp S., Martini R., Holtmann B., Giess R., Rieckmann P., Lassmann H., Toyka K.V., Sendtner M. and Gold R. (2002) CNTF is a major protective factor in demyelinating CNS disease: a neurotrophic cytokine as modulator in neuroinflammation. *Nat. Med.* **8**, 620-624.
- Machold R., Hayashi S., Rutlin M., Muzumdar M.D., Nery S., Corbin J.G., Gritli-Linde A., Dellovade T., Porter J.A., Rubin L.L., Dudek H., McMahon A.P. and Fishell G. (2003) Sonic hedgehog is required for progenitor cell maintenance in telencephalic stem cell niches. *Neuron* **39**, 937-950.
- Magavi S.S., Leavitt B.R. and Macklis J.D. (2000) Induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice. *Nature* **405**, 951-955.
- Mastronardi F.G., Min W., Wang H., Winer S., Dosch M., Boggs J.M. and Moscarello M.A. (2004) Attenuation of experimental autoimmune encephalomyelitis and nonimmune

- demyelination by IFN-beta plus vitamin B12: treatment to modify notch-1/sonic hedgehog balance. *J. Immunol.* **172**, 6418-6426.
- McMahon A.P., Ingham P.W. and Tabin C.J. (2003) Developmental roles and clinical significance of hedgehog signaling. *Curr. Top. Dev. Biol.* **53**, 1-114.
- Murray K., Calaora V., Rottkamp C., Guicherit O. and Dubois-Dalcq M. (2002) Sonic hedgehog is a potent inducer of rat oligodendrocyte development from cortical precursors in vitro. *Mol. Cell. Neurosci.* **19**, 320-332.
- Palma V., Lim D.A., Dahmane N., Sanchez P., Brionne T.C., Herzberg C.D., Gitton Y., Carleton A., Alvarez-Buylla A. and Ruiz I.A.A. (2005) Sonic hedgehog controls stem cell behavior in the postnatal and adult brain. *Development* **132**, 335-344.
- Palma V. and Ruiz i Altaba A. (2004) Hedgehog-GLI signaling regulates the behavior of cells with stem cell properties in the developing neocortex. *Development* **131**, 337-345.
- Pascual O., Traiffort E., Baker D.P., Galdes A., Ruat M. and Champagnat J. (2005) Sonic Hedgehog Signaling in Neurons of Adult Ventrolateral Nucleus Tractus Solitarius. *Eur. J. Neurosci.* **22**, 389-396.
- Pencea V., Bingaman K.D., Wiegand S.J. and Luskin M.B. (2001) Infusion of brain-derived neurotrophic factor into the lateral ventricle of the adult rat leads to new neurons in the parenchyma of the striatum, septum, thalamus, and hypothalamus. *J. Neurosci.* **21**, 6706-6717.
- Picard-Riera N., Decker L., Delarasse C., Goude K., Nait-Oumesmar B., Liblau R., Pham-Dinh D. and Evercooren A.B. (2002) Experimental autoimmune encephalomyelitis mobilizes neural progenitors from the subventricular zone to undergo oligodendrogenesis in adult mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**, 13211-13216.
- Porter J.A., von Kessler D.P., Ekker S.C., Young K.E., Lee J.J., Moses K. and Beachy P.A. (1995) The product of hedgehog autoproteolytic cleavage active in local and long-range signalling. *Nature* **374**, 363-366.

- Reynolds R., Dawson M., Papadopoulos D., Polito A., Di Bello I.C., Pham-Dinh D. and Levine J. (2002) The response of NG2-expressing oligodendrocyte progenitors to demyelination in MOG-EAE and MS. *J. Neurocytol.* **31**, 523-536.
- Rowitch D.H. (2004) Glial specification in the vertebrate neural tube. *Nat. Rev. Neurosci.* **5**, 409-419.
- Ruiz i Altaba A., Palma V. and Dahmane N. (2002) Hedgehog-Gli signaling and the growth of the brain. *Nat. Neurosci.* **3**, 24-33.
- Shimazaki T., Shingo T. and Weiss S. (2001) The ciliary neurotrophic factor/leukemia inhibitory factor/gp130 receptor complex operates in the maintenance of mammalian forebrain neural stem cells. *J. Neurosci.* **21**, 7642-7653.
- Spassky N., Goujet-Zalc C., Parmantier E., Olivier C., Martinez S., Ivanova A., Ikenaka K., Macklin W., Cerruti I., Zalc B. and Thomas J.L. (1998) Multiple restricted origin of oligodendrocytes. *J. Neurosci.* **18**, 8331-8343.
- Tekki-Kessarlis N., Woodruff R., Hall A.C., Gaffield W., Kimura S., Stiles C.D., Rowitch D.H. and Richardson W.D. (2001) Hedgehog-dependent oligodendrocyte lineage specification in the telencephalon. *Development* **128**, 2545-2554.
- Thibert C., Teillet M.A., Lapointe F., Mazelin L., Le Douarin N.M. and Mehlen P. (2003) Inhibition of neuroepithelial patched-induced apoptosis by sonic hedgehog. *Science* **301**, 843-846.
- Traiffort E., Charytoniuk D., Watroba L., Faure H., Sales N. and Ruat M. (1999) Discrete localizations of hedgehog signalling components in the developing and adult rat nervous system. *Eur. J. Neurosci.* **11**, 3199-3214.
- Traiffort E., Dubourg C., Faure H., Rognan D., Odent S., Durou M.R., David V. and Ruat M. (2004) Functional characterization of SHH mutations associated with holoprosencephaly. *J. Biol. Chem.* **279**, 42889-42897.

- Traiffort E., Moya K.L., Faure H., Hassig R. and Ruat M. (2001) High expression and anterograde axonal transport of aminoterminal Sonic Hedgehog in the adult hamster brain. *Eur. J. Neurosci.* **14**, 839-850.
- Watanabe M., Hadzic T. and Nishiyama A. (2004) Transient upregulation of Nkx2.2 expression in oligodendrocyte lineage cells during remyelination. *Glia* **46**, 311-322.
- Wight P.A. and Dobretsova A. (2004) Where, when and how much: regulation of myelin proteolipid protein gene expression. *Cell. Mol. Life Sci.* **61**, 810-821.

Table 1. BrdU-labeled cortical cell types recruited 2 days after ShhN injection.

	Vehicle	ShhN
NG2 ⁺	22 ± 3 (47)	31 ± 2 * (243)
GFAP ⁺	39 ± 9 (59)	28 ± 4 (173)

Data represent the percentages of cells double-labeled for BrdU and a cell-specific marker over the total population of BrdU⁺ cells counted in the contralateral cortex. The total number of double-labeled cells counted from three to five animals appears in brackets. Values are means ± S.E.M. *, p<0.05.

LEGENDS OF FIGURES

Figure 1. Influence of ShhN injection in the LV on the expression of Ptc mRNA in the brain of adult mice. (A) Time course of the delivery of ShhN or vehicle and BrdU. Mice were injected into the right LV on day 0 (D0), received BrdU on day 2 (D2) and were sacrificed 2 hr later. (B-F) ISH experiments performed on frontal (B-D) or sagittal (E, F) brain sections indicate that Ptc transcripts are induced in the SVZ (arrowheads), the cortex (Cx), the corpus callosum (cc), the striatum (B, C, E) and the rostral migratory stream (RMS; E) of ShhN-, but not vehicle- (D, F) injected mice. Arrows in (B, D) indicate the injection site. Scale bars (μm): 200 (B, D-F), 40 (C).

Figure 2. Characterization of proliferating cells in brain after an acute ShhN treatment. (A, B) BrdU IHC on frontal brain sections from ShhN-injected “D2 mice”. Distribution of BrdU⁺ nuclei in the cortex (Cx, arrows in A), SVZ (arrowhead in B) and corpus callosum (cc, B) of the contralateral injected side. The dotted line indicates the border line between the cortex and the corpus callosum. (C) Scheme indicating the distribution of BrdU⁺ cells in the cortex, corpus callosum, lateral septum (ls), striatum (st) and SVZ. Red boxes indicate representative areas used for cell counting. (D, E) Double BrdU IHC (brown) and Ptc ISH (blue) performed on frontal sections from ShhN-injected mice at the level of the Cx (D) or cc (E). Double-labeled cells are indicated by arrows. Scale bars (μm): 20 (A, B), 25 (D, E).

Figure 3. Quantification of BrdU⁺ cells in brain regions after ShhN injection. A significant increase in BrdU⁺ cell number is observed in the contralateral cortex and corpus callosum, but not in the striatum and SVZ from ShhN- compared to vehicle-treated animals. Values are means \pm S.E.M, from three to five animals. **, $p < 0.01$.

Figure 4. Phenotype of BrdU⁺ cells upon ShhN injection in D2 mice. (A, B) Frontal sections of ShhN-treated animals were analyzed by IHC using anti-NG2 (red in A, green in B) and anti-BrdU (green in A, red in B) antibodies. Double-labeled cells are observed by conventional (arrows in A) and confocal (B) microscopy. (C, D) A subpopulation of cortical GFAP⁺ cells (yellow in C, red in D) displays BrdU⁺ nuclei (blue in C, green in D) observed by conventional (C) and confocal (D) microscopy in ShhN-treated mice. Inset in (C) is a higher magnification of the boxed area. Scale bars (μm): 50 (A, C).

Figure 5. Long term effect of acute ShhN injection in the LV on Ptc transcription and cell proliferation. (A) Experimental protocol. (B) ISH on a frontal section from a ShhN-treated animal indicating Ptc expression remains induced in the SVZ (short arrows) as well as in the other brain areas surrounding the injected (long arrow) and non injected side of the LV. (C) BrdU⁺ cells were counted in the contralateral cortex from vehicle- or ShhN-treated mice. Cell numbers are means ± S.E.M, from five animals. *, p<0.05. (D) Double immunohistofluorescence using BrdU (green) and NeuN (red) on frontal sections from a ShhN-treated animal observed with conventional microscope. BrdU⁺ cells are juxtaposed to NeuN⁺ cells. DAPI (blue) labels the cell nuclei. cc, corpus callosum; Cx, cerebral cortex; ms, medial septum; st, striatum. Scale bars (μm): 200 (B), 50 (D).

Figure 6. Characterization of Shh signaling by adenovirus-mediated transfer of Shh in the LV. (A) Western blot on culture media harvested from CHO cells infected 24 or 48 hr earlier with increasing concentrations of AdhuShh-eGFP indicated as plaque forming units (pfu) per cell. ShhN protein is detected as a 22 kDa signal. (B) Experimental protocol. (C-E) A strong Shh immunoreactivity is associated with the ependymal and subependymal cell layers (black arrowheads) of the injected (black arrows) and non injected side of the LV and with the ependymal layer of the third ventricle (3v, black and white arrow) of AdhuShh-eGFP (D, E),

but not Ad-eGFP control mice (C). (E) is an enlargement of the area boxed in (D). (F) Western blot on brain tissue from Ad-eGFP (lane 2) or AdhuShh-eGFP (lanes 3, 4) mice. In AdhuShh-eGFP mice, ShhN and Shh are identified as major 22 and 47 kDa signals, respectively. Shh-infected CHO cells were used as positive control (lane 1). (G, H) Frontal sections from AdhuShh-eGFP (G) or Ad-eGFP (H) mice were hybridized with Gli1 riboprobe. Gli1⁺ cells are detected in the cortex (Cx), corpus callosum (cc) and SVZ of AdhuShh-eGFP mice only. ls, lateral septum; st, striatum. Scale bars (μm): 200 (C, D), 25 (E), 50 (G, H).

Figure 7. Adenovirus-mediated Shh signaling orients newly generated cortical cells towards the OL lineage. (A) Experimental protocol. (B, C) Gli1 mRNA is observed throughout the cortex (Cx) from AdhuShh-eGFP (B), but not Ad-eGFP (C) mice. The inset in (B) is an enlargement of the boxed area. (D) DM20 ISH (blue) followed by BrdU IHC (brown) shows that newly generated cells express (inset 1) or not (inset 2) DM20 transcripts in the cortex of AdhuShh-eGFP mice. A BrdU⁻/DM20⁺ cell is shown (inset 3). Scale bars (μm): 50 (B, C), 12.5 (D). cc, corpus callosum, Cx, cerebral cortex.

Figure 8. Phenotypical characterization of ShhN-induced proliferating cells in the cerebral cortex. AdhuShh-eGFP injection increases the number of BrdU⁺ cells expressing the NG2 proteoglycan or DM20 transcripts, but not MBP transcripts, CNPase, RIP, GFAP or NeuN markers. Values derive from counting of double-labeled cells observed in immunohistofluorescence experiments and are given as percentage of the total number of BrdU⁺ cells. They are means ± S.E.M from six mice for each group. The percentages obtained for double-labeled BrdU⁺/DM20⁺ cells correspond to 356 and 187 counted cells for Shh and control animals, respectively. **, p<0.01; *, p<0.05.

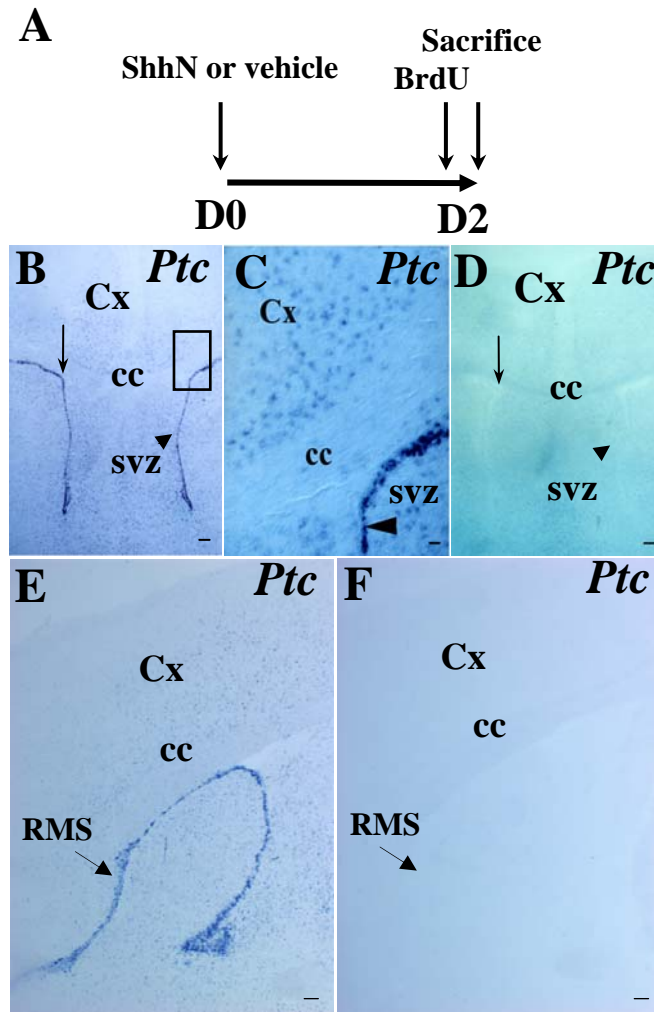


Figure 1. Loulier *et al.*
Increase of proliferating oligodendroglial progenitors in the adult mouse brain upon Sonic Hedgehog delivery in the lateral ventricle

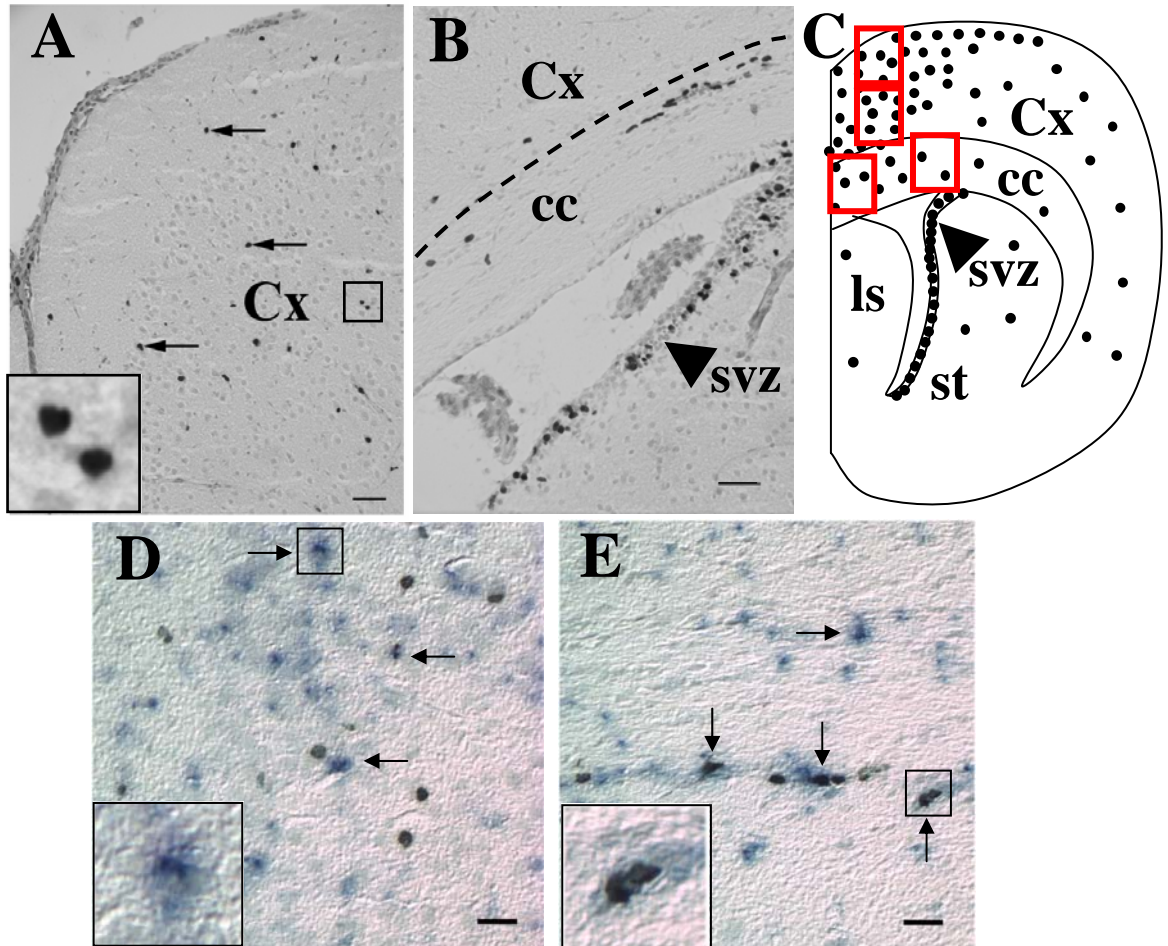


Figure 2. *Loulier et al.*
Increase of proliferating oligodendroglial progenitors in the adult mouse brain upon Sonic Hedgehog delivery in the lateral ventricle

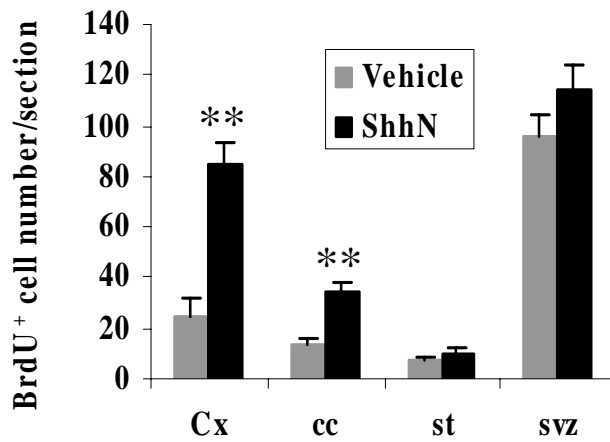


Figure 3. *Loulier et al.*
Increase of proliferating oligodendroglial progenitors in the adult mouse brain upon Sonic Hedgehog delivery in the lateral ventricle

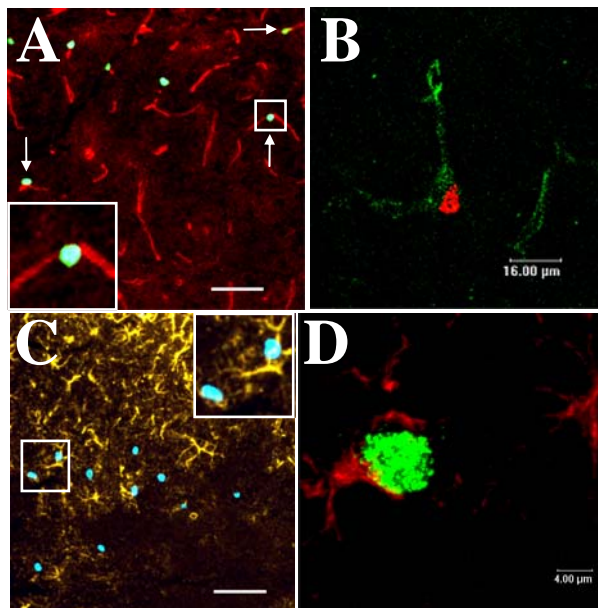


Figure 4. *Loulier et al.*
Increase of proliferating oligodendroglial progenitors in the adult mouse brain upon Sonic Hedgehog delivery in the lateral ventricle

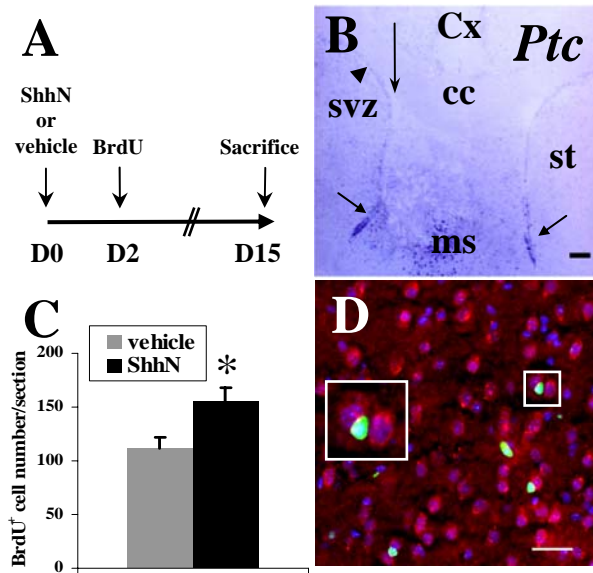


Figure 5. *Loulier et al.*
Increase of proliferating oligodendroglial progenitors in the adult mouse brain upon Sonic Hedgehog delivery in the lateral ventricle

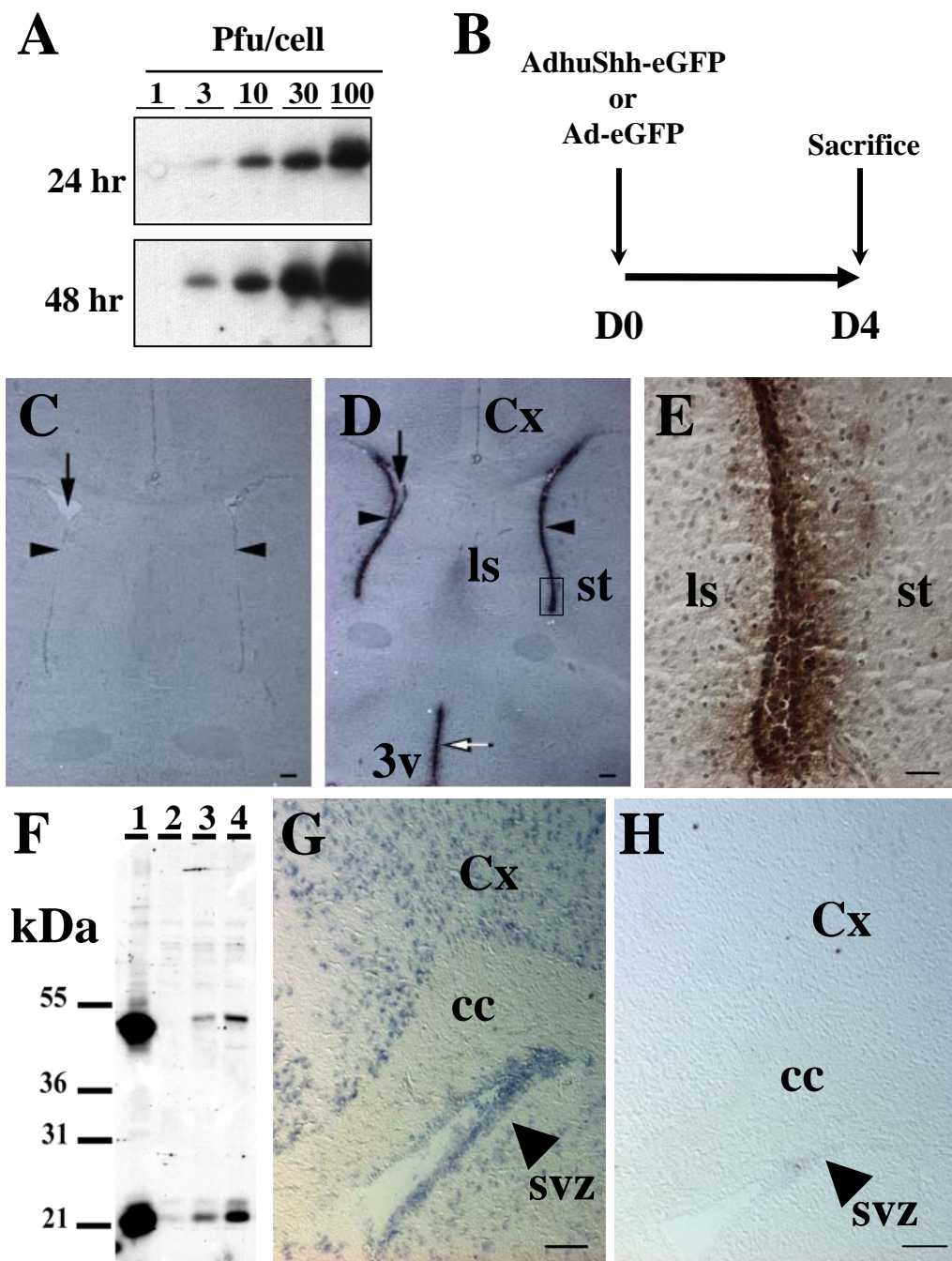


Figure 6. Loulier et al.

Increase of proliferating oligodendroglial progenitors in the adult mouse brain upon Sonic Hedgehog delivery in the lateral ventricle

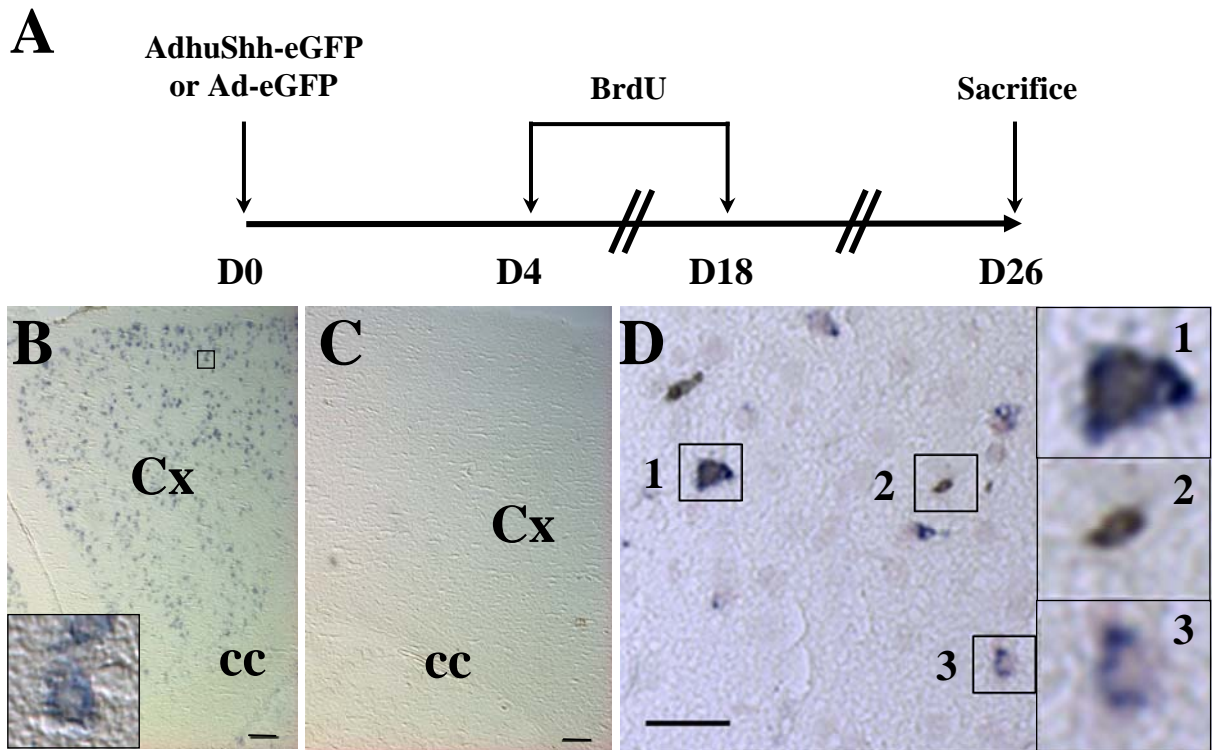


Figure 7. Loulier et al.
Increase of proliferating oligodendroglial progenitors in the adult mouse brain upon Sonic Hedgehog delivery in the lateral ventricle

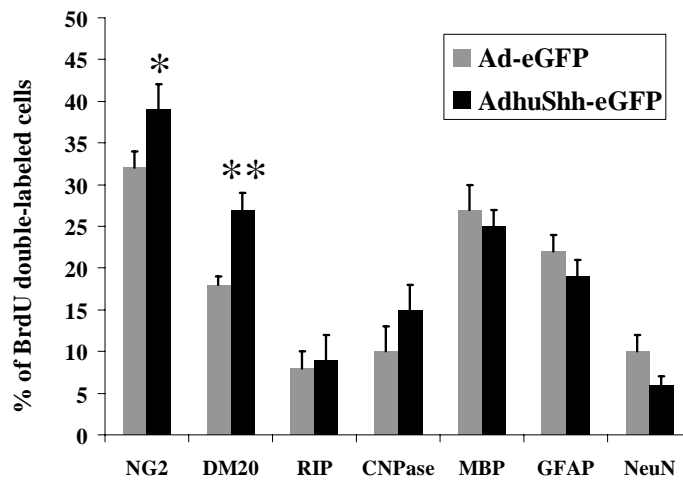


Figure 8. *Loulier et al.*
Increase of proliferating oligodendroglial progenitors in the adult mouse brain upon Sonic Hedgehog delivery in the lateral ventricle

DISCUSSION

DISCUSSION

Les travaux réalisés au cours de ce doctorat ont permis i) de mettre en évidence l'existence de formes soluble et membranaire de Hip dans le cerveau adulte, ii) de comparer chez l'embryon au stade E13.5 et chez l'adulte, son profil d'expression à celui de son ligand Shh et de l'autre récepteur de Shh, Ptc, et enfin iii) de suggérer des interactions potentielles entre les voies de signalisation impliquant respectivement Hip et le neuromédiateur gazeux NO. Par ailleurs, l'étude *in vivo* des effets de Shh sur les progéniteurs cérébraux chez la souris adulte, a apporté des arguments en faveur de son rôle dans la régulation des précurseurs oligodendrocytaires dans le cortex cérébral et le corps calleux.

1. Caractérisation *in vitro* et *in vivo* de Hip

1.1. Distribution de Hip dans le télencéphale

Dans le télencéphale embryonnaire, la voie Shh joue au moins 3 rôles distincts et critiques pour le développement du cerveau entre E9 et E15. Premièrement, Shh, en agissant principalement sur la formation du répresseur Gli3 (Rallu et al., 2002) contribue précocement à l'établissement du profil d'expression dorsoventral correct (Chiang et al., 1996 ; Fuccillo et al., 2004). Deuxièmement, la signalisation Shh intervient dans l'expansion et/ou la spécification des progéniteurs neuraux des parties ventrales et dorsales du télencéphale (Dahmane et al., 2001 ; Britto et al., 2002 ; Machold et al., 2003). Troisièmement, la voie Shh participe au maintien de l'identité des progéniteurs des interneurons corticaux via l'expression du facteur de transcription Nkx2.1 (Xu et al., 2005). Jusqu'à présent, seuls Ptc et Smo avaient été montrés impliqués dans ces trois rôles fonctionnels de la voie Shh. La distribution spatiotemporelle des transcrits de Hip dans des régions spécifiques du

télocéphale embryonnaire identifiées lors de nos études de localisation, suggère une implication de Hip dans la transmission du signal Hh dans ces structures, à cette période précise.

1.1.1. Hip et le maintien des progéniteurs des interneurons corticaux

Grâce à la souris invalidée pour le gène *Nkx2.1* (souris *Nkx2.1(-/-)*) où l'expression de *Shh* est sélectivement perdue essentiellement dans les structures ventrales antérieures du télencéphale, telles que la MGE et l'hypothalamus, plusieurs équipes ont démontré que *Shh* est un facteur nécessaire à l'oligodendrogenèse (Tekki-Kessarar et al., 2001 ; Nery et al., 2001) et participe au maintien des progéniteurs des interneurons *Nkx2.1+* sans intervenir sur leur migration ou leur différenciation (Xu et al., 2005). L'expression de Hip dans la région des éminences ganglionnaires (Loulier et al., 2005) pourrait expliquer la discordance observée au niveau de la génération des interneurons corticaux chez les souris *Nkx2.1(-/-)* par rapport aux mutants *Smo^{n/c};N^{cre}*. Ainsi, les mutants *Nkx2.1(-/-)*, chez lesquels l'expression de *Shh* est perdue dans la MGE ont une diminution drastique du nombre d'interneurons corticaux GABAergiques (Sussel et al., 1999 ; Nery et al., 2001). A l'inverse, les souris chez lesquelles *Smo* a été invalidé à partir du stade E12.5 (mutants *Smo^{n/c};N^{cre}*) ne présentent pas d'anomalies à ce niveau (Machold et al., 2003). Pour expliquer cette discordance, Machold et collaborateurs ont suggéré que cette perte d'interneurons dans les mutants *Nkx2.1(-/-)* reflétait la transformation de la MGE en LGE plutôt qu'une perte de la signalisation *Shh* (Machold et al., 2003). A l'encontre de cette hypothèse, le rôle critique de *Shh* vient d'être rapporté pour le maintien de l'identité des progéniteurs des interneurons corticaux via la régulation de *Nkx2.1* (Xu et al., 2005). Aussi l'expression de Hip dans cette aire cérébrale et à la période critique pour la génération des interneurons laisse supposer que l'action de *Shh* pourrait être indépendante de *Smo* et pourrait passer par Hip. Cette action différentielle de *Shh* alternativement via *Ptc/Smo* ou Hip a déjà été démontrée, au cours du développement, lors du guidage des axones commissuraux dans la moelle épinière où l'effet chémoattracteur de *Shh* passe par le complexe

Ptc/Smo alors que son action chémorepulsive passe par Hip (Charron et al., 2003 ; Bourikas et al., 2005).

1.1.2. Hip et l'oligodendrogenèse

Nery et collaborateurs ont mis en évidence, en utilisant les mutants Nkx2.1(-/-), l'importance du rôle de la voie Shh dans l'expression des marqueurs oligodendrocytaires, en montrant que ces marqueurs sont perdus dans les régions où Shh n'est plus exprimé alors qu'ils persistent dans les zones où Shh est toujours présent (Nery et al., 2001). Le profil d'expression du marqueur oligodendrocytaire précoce Olig2 est particulièrement intéressant à comparer chez les mutants Nkx2.1(-/-) et chez les souris sauvages. Les mutants Nkx2.1(-/-) expriment Olig2 de façon homogène dans la MGE et la LGE, alors que chez les souris sauvages, l'expression de Olig2 est restreinte à la MGE. Nos données actuelles permettent pour la première fois d'émettre l'hypothèse que Ptc et Hip, exprimés au niveau de la frontière entre LGE et MGE (Loulier et al., 2005), pourraient être impliqués, ensemble ou séparément, dans la limite de l'extension du marqueur Olig2 en direction de la LGE. Ainsi, Hip serait potentiellement un acteur à part entière du processus de l'oligodendrogenèse.

1.2. Expression de Hip dans la moelle épinière

Par hybridation *in situ*, nous avons localisé plusieurs groupes de cellules exprimant Hip dans la moelle épinière en développement au stade E14.5 (Figure 16 ; Loulier et al., 4th FENS Abstract, 2004). Les transcrits de Hip sont détectés, en l'absence de Ptc, dans deux noyaux ventraux de cellules qui pourraient correspondre soit à des motoneurones appartenant aux colonnes médiales et latérales (Eisen, 1999), soit à des interneurones ventraux (Briscoe et al., 2001b). L'âge embryonnaire E14.5 est tardif comparé à la période de génération de ces types cellulaires, ce qui

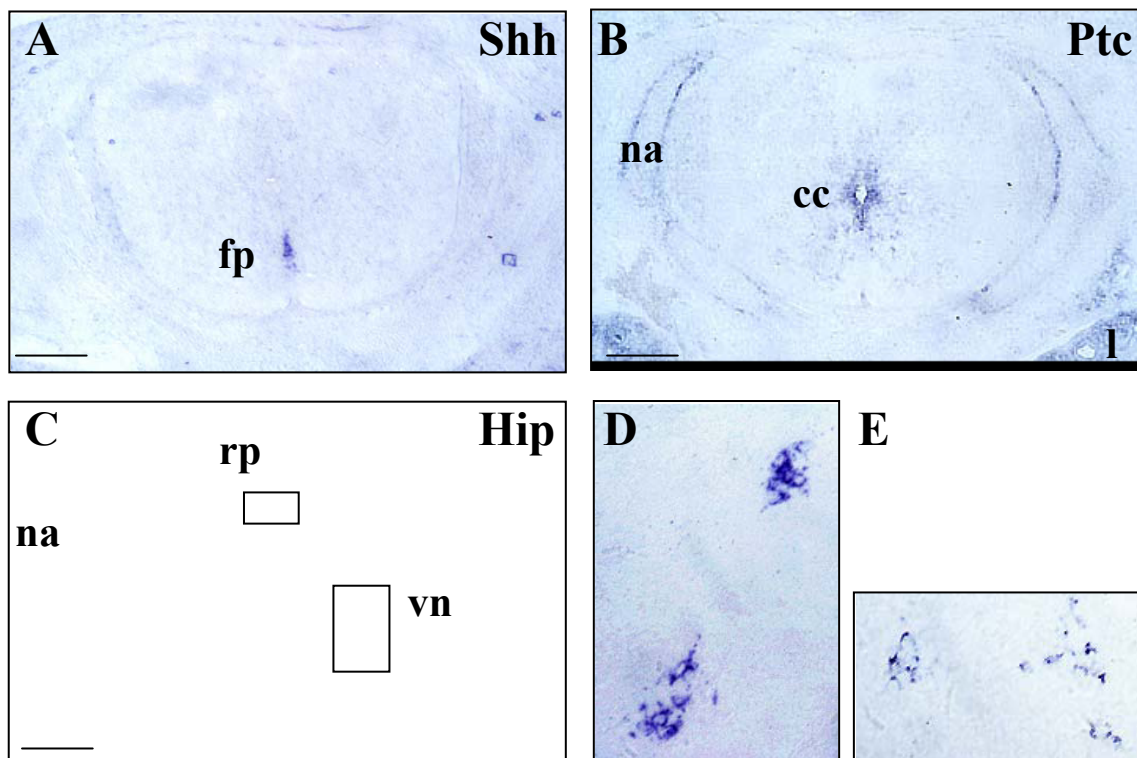


Figure 16 : Les distributions des transcrits de Shh, Ptc et Hip dans la moelle épinière embryonnaire de souris révèlent une expression de Hip à distance des sources de Shh et de Ptc. (A-E) Des expériences d'hybridations in situ en utilisant des ribosondes antisens de Shh (A), Ptc (B) ou Hip (C-E) ont été réalisées sur des sections adjacentes d'embryons de souris au stade E14.5. (A) l'expression de Shh est détectée dans la plaque du plancher (floor plate, fp). (B) le marquage Ptc est observé dans la partie ventrale du canal central (cc), dans le cartilage primordial de l'arc neural (neural arch, na) et dans le poumon (lung, l). (C) Hip est colocalisé avec Ptc dans le cartilage primordial de l'arc neural et est aussi détectable dans quatre groupes de cellules ventrales, vraisemblablement des neurones ventraux (vn) d'après leur taille et leur position, et dans deux groupes de cellules dans la plaque du plafond (roof plate, rp). Les cadres indiquent les régions agrandies en (D) et (E). La barre d'échelle correspond) 200 μ m (Loulier K., Ruat M. et Traiffort E., résultats non publiés).

laisse supposer que Hip pourrait intervenir dans la survie ou dans d'autres mécanismes de régulation de ces cellules déjà différenciées. Dans les tissus non neuraux tels que les articulations entre les côtes et les vertèbres, ou le poumon, les distributions de Ptc et Hip sont superposables, en accord avec le rôle redondant de ces deux protéines précédemment décrit dans l'établissement des ramifications pulmonaires (Chuang et al., 2003).

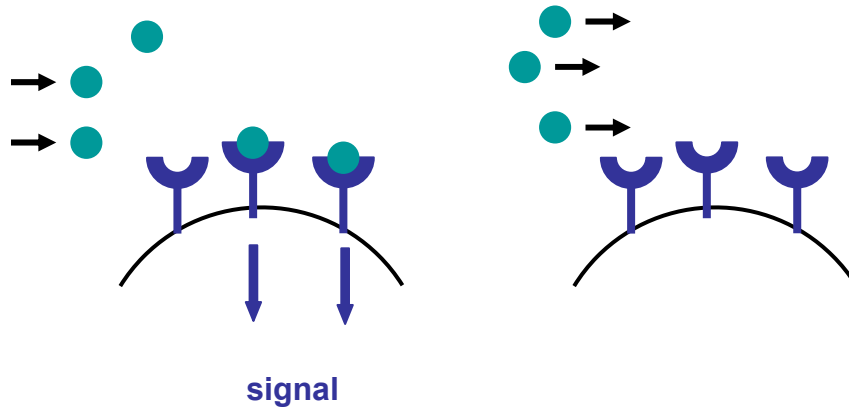
Par ailleurs, alors que l'expression de Hip n'avait été essentiellement rapportée que dans la partie ventrale du tube neural (Chuang et al., 1999), nos résultats montrent une localisation de ces transcrits dans deux groupes de cellules dorsales situées symétriquement de part et d'autre de la plaque du plafond, c'est-à-dire à distance des cellules exprimant Shh. Cette observation soulève trois hypothèses : i) les corps cellulaires exprimant Hip dorsalement pourraient être les neurones commissuraux dont les axones s'étendent en direction de la partie ventrale du tube neural. Cette hypothèse est en accord avec les données récentes de Bourikas et collaborateurs qui ont rapporté le rôle de Hip dans la transmission du signal chémorépulsif de Shh sur les axones post-commissuraux de la moelle épinière (Bourikas et al., 2005) ; ii) Hip pourrait intervenir dans l'inhibition du signal Shh produit ventralement par la plaque du plancher après avoir été libéré sous sa forme soluble (Coulombe et al., 2004). Seule cette forme serait capable d'atteindre le gradient du morphogène Shh issu de la partie ventrale du tube neural. Cette localisation dorsale de Hip rappelle celles d'autres molécules capables d'antagoniser l'action de Shh soit par une interaction physique directe comme dans le cas de GAS1, une protéine liée à la membrane par une ancre GPI, qui inhibe Shh dans des régions où Ptc n'est pas exprimé (Lee et al., 2001), soit par modification de la réponse des cellules cibles de Shh comme dans le cas des membres de la famille des BMP ; iii) enfin, Hip pourrait être impliqué dans une voie de signalisation autre que celle de Shh. La majorité des études concernant Hip jusqu'à maintenant l'ont essentiellement caractérisé comme un régulateur négatif de la voie de signalisation Hh (Chuang et al., 1999 ; Chuang et al., 2003 ; Kawahira et al., 2003). Nos récents travaux corroborent ces données *in vitro* (Coulombe et al., 2004) et *in vivo* dans le système nerveux

central embryonnaire et dans le cerveau adulte (Loulrier et al, 2005), où Hip est majoritairement retrouvé dans les zones de projections de neurones exprimant Shh (Traiffort et al., 1999 ; Coulombe et al., 2004). En accord avec l'hypothèse d'une activité de Hip en dehors de la voie de signalisation Hh, Cornesse et collaborateurs ont montré, à l'aide d'expériences de co-injections d'ARN messagers dans des embryons de Xénope, que la protéine Hip de Xénope peut interférer avec les voies de signalisation eFgf/Fgf-8 et Wnt-8, indépendamment de la voie Hh. A son tour Wnt-8 peut induire l'expression de Xhip indépendamment de la signalisation Hh (Cornesse et al., 2005).

1.3. Mécanismes d'inhibition de la voie Shh par Hip

Une modélisation des mécanismes d'antagonisme de la voie de signalisation Hh a récemment été proposée (Jeong et al., 2005). Hip, comme Ptc, interviendrait dans un mécanisme dit « d'antagonisme de la voie dépendant du ligand » (ou LDA), qui permet un rétrocontrôle négatif de la signalisation Shh après fixation directe du ligand par ses récepteurs Ptc et Hip (Figure 17). L'autre mécanisme dit « d'antagonisme indépendant du ligand » (ou LIA) correspond au blocage de l'activité constitutive de Smo et à ce jour ne fait intervenir que Ptc. Dans le modèle LDA, la présence du récepteur (Hip ou Ptc) à la surface des cellules cibles permet à la fois de diminuer la sensibilité de la cellule cible au morphogène et de restreindre la distance de propagation du morphogène en piégeant celui-ci et en l'empêchant d'agir sur les cellules situées à plus ou moins longue distance des cellules qui le synthétisent. Puisque nous avons rapporté l'existence de formes solubles de Hip (Coulombe et al., 2004), ce modèle peut être complété. Trois entités moléculaires (Ptc, Hip membranaire, Hip soluble) sont susceptibles de participer à ce mécanisme régulateur de la voie. Les mécanismes moléculaires qui suivent l'étape de la liaison de Shh à l'un de ses récepteurs commencent à être connus pour Ptc. Ainsi, une endocytose du complexe Shh/Ptc pourrait précéder la dégradation lysosomale de Shh (Incardona et al., 2002). Les mécanismes moléculaires intracellulaires mis en jeu après liaison de Shh à Hip ne sont pas connus, mais les localisations

A. En absence de LDA



B. En présence de LDA

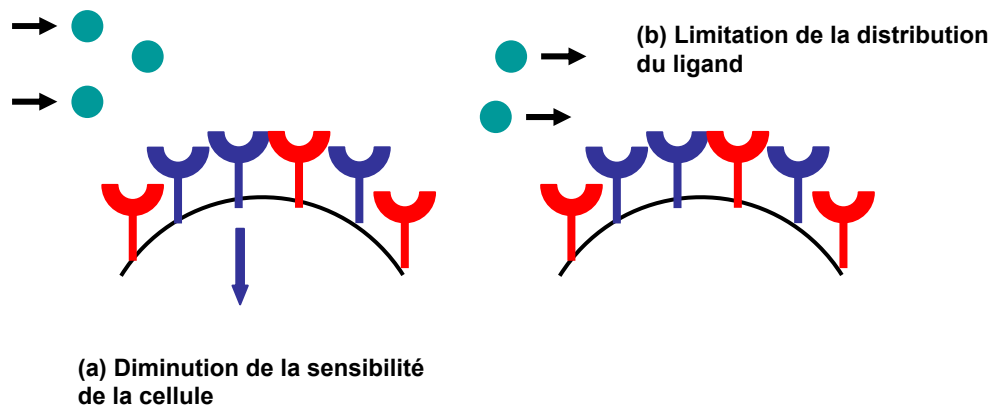


Figure 17 : Modèle de la régulation de la signalisation des morphogènes par le LDA. (A) en absence du LDA, le morphogène (rond vert) produit à partir d'une aire restreinte du tissu diffusera sur une certaine distance. Lorsque les molécules de morphogène atteignent une cellule qui exprime les récepteurs permettant la transmission du signal (molécule de surface bleue), quelques unes lieront le récepteur pour transmettre le signal à l'intérieur de la cellule (flèche bleue), alors que les molécules restantes vont rejoindre les cellules adjacentes pour former un gradient de concentration. (B) En présence du LDA, les antagonistes (molécule de surface rouge) entrent en compétition avec les récepteurs responsables de la transmission du signal pour une quantité limitée de ligand, et donc diminuent l'activité de la signalisation à l'intérieur de la cellule (une flèche bleue au lieu de 2 en A) à une concentration donnée du morphogène (effet cellulaire autonome). De plus, comme les molécules de ligand lient à la fois les récepteurs et les antagonistes, elles seront moins nombreuses à diffuser, ce qui affectera la distribution du morphogène dans le tissu (effet autonome non-cellulaire) (d'après Jeong et McMahon, 2005).

subcellulaires distinctes de Shh/Ptc et Shh/Hip suggèrent des mécanismes différents. Ainsi, des constructions « étiquetées » de chacune des protéines Hip, Ptc, Shh ont permis de montrer *in vitro* que le complexe Shh/Ptc est essentiellement visualisé dans des vésicules intracellulaires, alors que le complexe Shh/Hip est majoritairement identifié à la surface de la cellule (Jeong et al., 2005).

En tant que cible transcriptionnelle de la voie Hh, Hip s'est récemment révélé être un outil intéressant pour moduler l'hyperactivité de la voie Hh observée lors de tumeurs. Vogt et collaborateurs ont suggéré que Hip pourrait être utilisé chez des patients atteints du syndrome de Gorlin comme traitement préventif des carcinomes basocellulaires (CBC) résultant d'une signalisation Hh anormale et associés à une très forte surexpression des gènes cibles de la voie. Ainsi, une immunisation des souris Ptc1(+/-) avec des polypeptides recombinants Hip1 réduit le nombre de CBC d'environ 35% (Vogt et al., 2004).

1.4. Hip et NO

L'expression de Hip dans des neurones du cerveau mature exprimant l'enzyme de synthèse de l'oxyde nitrique (nNOS) permet aujourd'hui de suggérer l'existence d'une interaction inattendue entre la voie Shh et celle du neuromédiateur gazeux NO. Jusqu'alors, le seul lien entre ces deux voies avait été rapporté par Robertson et collaborateurs. Ces derniers avaient montré, sur des explants de tube neural de poulet, que le NO pouvait potentialiser les effets « ventralisant » de Shh en induisant la production du second messenger cGMP par la guanylate cyclase (Robertson et al., 2001). Les acteurs de la voie Shh impliqués dans ce processus n'ont pas été identifiés jusqu'à présent.

Dans le cerveau de rongeurs adultes, l'expression de la nNOS à proximité des zones de neurogenèse a conduit à suggérer son rôle dans le contrôle de la neurogenèse adulte. L'étude de la perte de fonction nNOS, par inhibition pharmacologique ou analyse du mutant nNOS(-/-), a récemment montré que la nNOS intervient dans l'inhibition de la prolifération cellulaire dans la

ZSV et le gyrus denté de l'hippocampe (Packer et al., 2003). Dans la ZSV et le bulbe olfactif, le NO endogène exercerait un contrôle négatif sur les précurseurs indifférenciés et induirait la différenciation neuronale (Moreno-Lopez et al., 2004). L'expression de Hip dans des neurones capables de synthétiser du NO et de le libérer à proximité de la ZSV, mais aussi l'implication de la voie Shh dans la régulation de la survie des progéniteurs dans cette région laissent supposer une possible interaction de ces voies de signalisation dans les mécanismes régulant la neurogenèse adulte. Par ailleurs, les cellules nNOS⁺ sont la cible du processus excitotoxique induit par le glutamate qui, en stimulant les récepteurs au glutamate de type NMDA présents sur les neurones nNOS⁺, constitue l'un des plus puissants activateurs de la nNOS (Boehning et al., 2003 ; Zhang et al., 2005). Il serait donc intéressant d'analyser l'existence d'une régulation de l'expression de Hip dans un modèle d'excitotoxicité glutamatergique et la potentielle implication de Hip de manière dépendante ou indépendante de la voie Hh dans ce processus d'excitotoxicité.

2. La voie Shh dans le contrôle de la régulation des progéniteurs cérébraux de souris adultes

La seconde partie des résultats obtenus a permis la mise en évidence du rôle de Shh *in vivo* sur l'expansion de progéniteurs exprimant le protéoglycane NG2 et le marqueur oligodendroglial dm20 dans les régions corticale et callosale chez le rongeur adulte. Tout en ouvrant de nouvelles perspectives à l'utilisation de l'activation de la voie Shh dans des pathologies mettant en jeu les précurseurs oligodendrocytaires, ces données nouvelles soulèvent un certain nombre d'interrogations sur les mécanismes de ces effets, notamment sur la nature et l'origine des cellules répondant à Shh.

2.1. Shh exogène et prolifération cellulaire dans le cerveau mature

2.1.1. Prolifération cellulaire et considérations techniques

L'utilisation de l'analogue de la thymidine, le BrdU, pour évaluer le niveau de prolifération cellulaire a constitué lors de sa mise en place une avancée technologique importante puisqu'elle facilitait la visualisation des cellules synthétisant de l'ADN (Schultze et al., 1981). Cependant la technique n'est pas dénuée de certains biais liés au fait que l'incorporation de BrdU au cours de la phase de synthèse d'ADN (phase S du cycle cellulaire) n'est pas synonyme uniquement de division mais aussi de réparation cellulaire. Plusieurs arguments confirment que l'augmentation du nombre de cellules BrdU+ que l'on retrouve chez les animaux traités avec Shh (Loulier et al, soumis) correspond bien à une augmentation du nombre de cellules en prolifération. Nous avons tout d'abord évité l'effet direct du traumatisme lié à l'injection en nous plaçant du côté opposé au site d'injection. Deuxièmement, nous utilisons un protocole standard de marquage de cellules en prolifération comportant notamment des injections systémiques de BrdU à la concentration faible de 50 mg/kg (Cameron et al., 2001 ; Seri et al., 2001 ; Belvindrah et al., 2002). Ces conditions limitent l'incorporation dans les cellules en réparation. Troisièmement, si les cellules en réparation avaient incorporé des quantités détectables de BrdU, nous aurions retrouvé de l'immunoréactivité BrdU+ au sein de toutes les catégories de cellules, or nous ne retrouvons que très peu de cellules NeuN+ marquées alors que nous devrions avoir le cas échéant une importante quantité de neurones pyramidaux BrdU+ dans le cortex cérébral (Dayer et al., 2005). Quatrièmement, les cellules en apoptose doivent disparaître dans les 3 jours (Hu et al., 1997 ; Thomaidou et al., 1997), alors que nous observons toujours des cellules doublement marquées au-delà de ce temps. Pour finir, la détection de doublets de cellules présentant un noyau BrdU+ dans le cortex, que nous avons observés dans nos expériences, est le reflet d'une prolifération *in situ* (Pencea et al., 2001).

2.1.2. Rôle prolifératif différentiel selon les régions cérébrales

Comme le montre l'absence de prolifération induite par Shh dans la ZSV et le striatum, et l'augmentation de prolifération observée dans le cortex, le corps calleux (Loulier et al, soumis) ou l'hippocampe (Lai et al., 2003), l'effet mitogène de Shh dans le cerveau adulte est spécifique de la région cérébrale considérée. Ces différences régionales résultent vraisemblablement de la présence de facteurs environnementaux (facilitant ou empêchant l'effet de Shh) variant d'une région à l'autre, mais aussi de la nature des progéniteurs capables de répondre à Shh dans la région considérée. En accord avec ces hypothèses, les cellules souches isolées à partir de la substance noire du cerveau mature et caractérisées par leur capacité à générer des neurosphères *in vitro* ne généreront que des cellules gliales *in vivo* dans l'environnement procuré par la substance noire mais généreront des neurones si elles sont greffées dans un environnement neurogène tel que l'hippocampe (Lie et al., 2002). Par ailleurs, des neurosphères dérivées de la paroi du 3^{ème} ventricule sont capables de générer des types neuronaux spécifiquement trouvés dans les régions hypothalamiques (Markakis et al., 2004).

Durant mon travail de thèse, l'existence d'un effet prolifératif de Shh dans la ZSV a été la source d'autres investigations *in vivo* et *in vitro*, et demeure néanmoins un sujet de controverses. *In vivo*, l'injection de la protéine ShhN recombinante dans le ventricule latéral (Loulier et al, soumis) ou le striatum (Charytoniuk et al., 2002b) n'induit pas d'augmentation de prolifération cellulaire dans la ZSV, mais l'administration systémique d'un antagoniste (cyclopamine) ou d'un agoniste du récepteur Smo respectivement réduit ou augmente la prolifération dans cette région (Palma et al., 2005 ; Machold et al., 2003). Cependant l'infusion de cyclopamine à l'aide d'une minipompe osmotique, dans le ventricule latéral de souris adultes, ne conduit pas à une diminution de la prolifération cellulaire dans la ZSV mais à une diminution de la prolifération cellulaire dans la ZSG de l'hippocampe (Banerjee et al., 2005). *In vitro*, Shh induit la prolifération des cellules des neurosphères uniquement si les concentrations d'EGF dans le milieu de culture ne sont pas

saturantes (Palma et al., 2005). Dans leur ensemble, ces données suggèrent que, dans la ZSV, l'effet prolifératif obtenu lors de l'activation directe de Smo *in vivo* ne met pas en jeu les mêmes cascades intracellulaires que celles activées par la liaison de Shh à son récepteur Ptc. Comme mentionné par Palma et collaborateurs, Shh n'aurait pas un effet mitogène direct sur les progéniteurs de la ZSV mais dépendant des concentrations d'EGF du milieu environnant (Palma et al., 2005).

2.2. Les cellules cibles de Shh

2.2.1. Les cellules NG2

La population cellulaire NG2⁺, est la plus large population de cellules en prolifération dans le cerveau postnatal et adulte, initialement décrite comme une population homogène de précurseurs oligodendrocytaires (OLP) . Ces OLP sont abondants à la fois dans la substance blanche et dans la substance grise et représentent 5 à 8% de toutes les cellules du cerveau mature. Morphologiquement, ces cellules ont un petit corps cellulaire de 10-15µm de diamètre et présentent une morphologie très variable d'une région à l'autre. Dans la substance grise, leurs prolongements ont tendance à adopter une orientation radiale, alors que dans la substance blanche, ils sont longitudinaux, comme alignés parallèlement aux fibres nerveuses. Bien que les OLP adultes se divisent lentement *in situ*, ils constituent la principale population de cellules en division dans les parenchymes cérébraux adultes (pour revues voir Dawson et al., 2000 ; Levine et al., 2001). Des études utilisant des vecteurs rétroviraux pour marquer et suivre les cellules en division dans le néocortex de rat adulte ont révélé que les cellules NG2⁺ constituent 35% de toutes les cellules infectées. Quelques uns des groupes de cellules marqués par le rétrovirus contiennent à la fois des cellules NG2⁺ et des oligodendrocytes suggérant que les cellules NG2⁺ constituent une population de précurseurs capables de générer des oligodendrocytes *in vivo* (Levison et al., 1999).

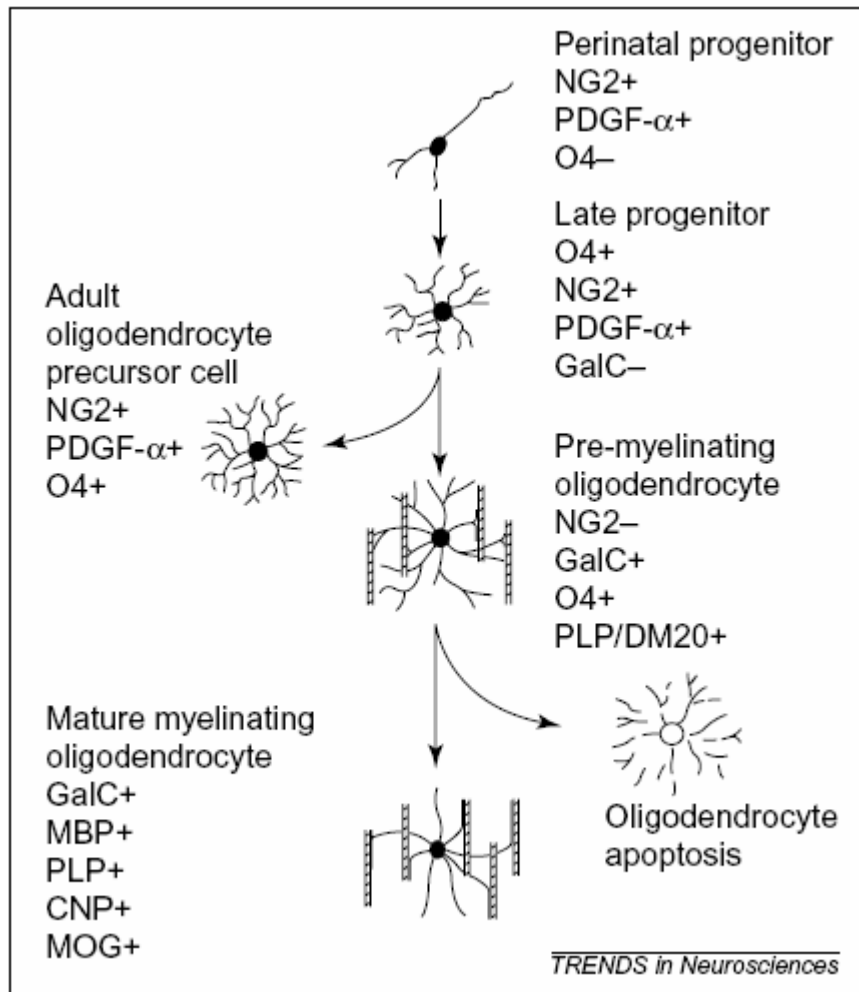


Figure 18 : Le développement du lignage oligodendrocytaire. Les principaux marqueurs qui identifient le stade développemental de la cellule sont cités. CNP, 2'-3'-cyclic nucleotide 3-phosphorylase; GalC, galactocérobroside ; MBP, myelin basic protein; MOG, myelin oligodendrocyte glycoprotein; PDGF, platelet-derived growth factor; PLP, proteolipid protein (d'après Levine, 2001).

L'antigène NG2 est exprimé *in vivo* par les OLP périnataux du SNC de rongeurs au cours des 3 ou 4 derniers jours de la vie embryonnaire et leur nombre croît rapidement au cours des 10 premiers jours post-nataux avant de se différencier en oligodendrocytes formant de la myéline. Cependant une partie persiste à l'âge adulte et constitue alors la population des cellules NG2+ adultes (Levine et al., 1993). L'OLP adulte diffère de l'OLP périnatal par son phénotype antigénique et son taux de prolifération (pour revue, Franklin, 2002). En conditions normales, le turnover de ces cellules est relativement bas, et des quantités limitées de mitogènes (Fruttiger et al., 2000) ou des interactions cellulaires locales telles que le phénomène d'inhibition de la prolifération, dépendant de la densité (Nakatsuji et al., 2001 ; Zhang et al., 1996) pourraient réguler leur division.

Initialement, ces cellules ont été considérées comme des OLP co-exprimant les marqueurs oligodendrocytaires O4 et PDGFR α (Dawson et al., 2003) (Figure 18). La capacité de ces progéniteurs adultes à participer à la remyélinisation sous conditions pathologiques (telles que la sclérose en plaque) est la source de multiples investigations, notamment la caractérisation des facteurs de croissance et des voies de signalisation capables de stimuler leur prolifération et leur maturation (Levine et al., 2001). Cependant, des données récentes montrent qu'en fait les cellules NG2+ constituent dans le SNC post-natal une population hétérogène, qui peut certes générer des oligodendrocytes, mais aussi former des neurosphères et générer des neurones *in vitro* et *in vivo* dans plusieurs régions cérébrales telles que le bulbe olfactif et l'hippocampe (Belachew et al., 2003 ; Aguirre et al., 2004b ; Aguirre et al., 2004a). Dans le néocortex et l'hippocampe, des cellules exprimant la CNPase et le NG2 expriment aussi des marqueurs neuronaux (tels que CRMP-4, β III-tubuline, NeuN et GAD-67) et présentent des courants synaptiques spontanés et des potentiels d'action (Belachew et al., 2003 ; Aguirre et al., 2004b ; Chittajallu et al., 2004). A cette hétérogénéité de progénie s'ajoute une hétérogénéité de propriétés électrophysiologiques entre les cellules NG2+ de la substance blanche (corps calleux) et celles de la substance grise (cortex cérébral) (Chittajallu et al., 2004). Cette dernière pourrait expliquer l'effet prolifératif différentiel

que semble jouer la voie Shh sur les cellules NG2 corticales et callosales (Loulrier et al., en révision).

La mise en évidence de l'effet de Shh sur les cellules NG2+ dans le cerveau mature rappelle un effet précédemment rapporté chez l'embryon. En effet, l'addition de cyclopamine à des cultures de cortex de rat embryonnaire aux stades E15.5 et E18.5 analysées à l'aide du marqueur NG2, inhibe fortement et de manière dose dépendante, la production des précurseurs NG2+, indiquant l'importance de la voie Shh pour le développement des OLP du télencéphale (Tekki-Kessarlis et al., 2001).

2.2.2. Les cellules *plp/dm-20*

Le gène *PLP* code pour deux protéines constitutives de la gaine de myéline, la PLP, l'isoforme majeure, et la DM20. L'isoforme DM20 diffère de la PLP par une délétion interne de 35 acides aminés, qui résulte d'un épissage alternatif utilisant un site donneur au sein de l'exon 3 (pour revue, Yool et al., 2000). Dans le cerveau de souris, les transcrits *dm-20* sont détectés au stade E9.5 dans les cellules de la plaque basal du diencephale, l'hypothalamus caudal, le rhombencéphale et la moelle épinière. Au stade E14.5, les cellules *dm-20+* disparaissent de la couche germinale ventriculaire du diencephale et colonisent la partie postérieure du diencephale basal. Entre E17.5 et P1, le nombre de cellules *dm-20+* augmente et envahit progressivement la substance blanche (Timsit et al., 1995). L'établissement du profil d'expression spatio-temporel des transcrits *dm-20*, associé à l'analyse des marqueurs oligodendrocytaires susceptibles d'être exprimés par ces cellules, révèle que la population de cellules exprimant le transcrit *dm-20* devient positive pour le marqueur pré-oligodendrocytaire O4, puis pour le marqueur RIP des oligodendrocytes différenciés. D'autre part, ces analyses suggèrent que les cellules *dm-20+* et *PDGFR α +* constituent deux populations oligodendrocytaires distinctes (Spassky et al., 1998).

Nery et collaborateurs ont démontré que dans le télencéphale, comme dans la moelle épinière, l'apparition des précurseurs oligodendrocytaires est liée à l'expression de Shh. Des expériences gain-de-fonction, à l'aide de vecteurs rétroviraux permettant l'expression ectopique de Shh, montrent que Shh est capable d'induire l'apparition de précurseurs oligodendrocytaires dans tout le télencéphale. Dans la souris mutante *Nkx2.1(-/-)* où l'expression de Shh est perdue dans plusieurs régions du télencéphale, il y a une perte concomitante de l'expression des transcrits *dm-20* dans les régions où Shh est absent, telles que l'hypothalamus (Nery et al., 2001).

2.2.3. Shh et le lignage oligodendrocytaire

Comme mentionné dans l'Introduction de ce manuscrit, Shh possède une activité primordiale au cours des phases précoces de l'oligodendrogenèse en induisant les facteurs de transcription de type bHLH, *Olig1* et *Olig2* (voir paragraphe I.2.1.1.1 « les oligodendrocytes »). Plus récemment, l'étude de souris invalidées pour l'expression de *Smo* dans les cellules exprimant la nestine, un marqueur de progéniteurs neuraux, à partir du stade E12.5 (souris *Smo^{n/c};N^{cre}*), a permis de montrer un défaut majeur de la MGE avec réduction du nombre de progéniteurs, notamment des OLP, indiqué par la perte ou la réduction d'expression du marqueur *Sox10* (Machold et al., 2003). Chez les souris *Smo^{n/c};N^{cre}* survivant jusqu'au jour post-natal 15, le corps calleux et la commissure antérieure sont dramatiquement réduits, les fibres axonales complètement défasciculées, l'expression du marqueur MBP est réduite et le degré de myélinisation est diminué de 30% (Machold et al., 2003). A partir de l'ensemble de ces données, les auteurs ont suggéré que la signalisation Hh est requise pour la génération d'une vague plus tardive d'oligodendrocytes dérivée du cortex et récemment mise en évidence par Gorski et collaborateurs (Gorski et al., 2002).

Faisant suite à ces travaux, nos résultats dans le cerveau mature (Loulier et al., en révision) suggèrent que la signalisation Shh peut stimuler *in vivo* la prolifération de cellules NG2+ et de cellules *dm-20*+, et donc la production d'oligodendrocytes pré-matures sans toutefois atteindre le

phénotype d'oligodendrocytes matures myélinisants. Nous n'avons pas déterminé si les cellules NG2⁺ et *dm-20*⁺ représentent les étapes consécutives d'un même lignage ou deux types distincts de progéniteurs. En effet, bien que l'expression du marqueur NG2 soit plus précoce que celle du marqueur *dm-20* et que l'on ne puisse pas exclure qu'ils reflètent différents stades de maturation d'une même sous-population oligodendrocytaire, plusieurs arguments suggèrent que, dans nos expériences, les cellules NG2 et *dm-20* appartiennent à deux populations différentes (Levine et al., 2001). Premièrement, nous obtenons un effet prolifératif significatif sur la population NG2⁺ corticale et pas callosale, alors que l'augmentation de la prolifération des précurseurs *dm-20* est obtenue à la fois dans le corps calleux et le cortex des souris ayant reçu du Shh. Deuxièmement, il a été proposé qu'au cours du développement embryonnaire la majorité des cellules NG2⁺ sont aussi PDGFR α ⁺ alors que les cellules *dm-20*⁺ appartiennent à un lignage différent de celui des cellules PDGFR α ⁺ (Spassky et al., 2001). Enfin, Ye et collaborateurs, en utilisant une technique de microdissection au laser suivie d'expérience de RT-PCR, ont montré que les cellules NG2⁺ corticales de souris adultes expriment la PLP mais pas le transcrit *dm-20* (Ye et al., 2003).

Une réponse à cette question pourrait être apportée par l'analyse de l'effet de la voie Shh *in vivo* chez des souris adultes PLP-eGFP (Mallon et al., 2002) qui permettent de suivre spécifiquement les progéniteurs NG2⁺ appelés devenir des oligodendrocytes, sans être contaminés par les cellules NG2⁺, précurseurs de neurones (Belachew et al., 2003 ; Aguirre et al., 2004b ; Aguirre et al., 2004a).

2.2.4. Origine des progéniteurs oligodendrocytaires

Nos résultats suggèrent que la prolifération de cellules observées notamment dans le cortex cérébral serait un processus local touchant directement les précurseurs du parenchyme cortical (Loulier et al., en révision). Premièrement, nous n'avons détecté aucune variation du nombre de cellules BrdU⁺ dans la ZSV. Deuxièmement nous n'avons observé aucune chaîne de cellules en

prolifération dans le cérébral cortex et le corps calleux, ni de cellules avec un phénotype de neuroblastes migrants (PSA-NCAM⁺ ou Doublecortin⁺) qui auraient reflété la mobilisation de cellules ayant migré radialement en provenance de la ZSV (Magavi et al., 2000 ; Picard-Riera et al., 2002). Troisièmement, l'augmentation significative du nombre de doublets de cellules BrdU⁺ dans le cortex cérébral est en accord avec une prolifération *in situ*. Pour finir, la présence de cellules doublement marquées Ptc⁺/BrdU⁺ dans le cortex et le corps calleux des animaux traités avec la protéine ShhN indique clairement la capacité d'une population de cellules en prolifération dans ces régions à répondre à la signalisation Hh, suggérant un transport potentiel de ShhN à partir du ventricule latéral (Loulier et al., en révision).

Cependant, on ne peut pas complètement exclure l'hypothèse d'une prolifération ayant comme origine la ZSV suivie d'une migration en direction du corps calleux et du cortex, c'est-à-dire d'un recrutement d'OLP à partir de la ZSV. Au cours du développement, les OLP colonisent le cortex en deux vagues temporellement distinctes. Les régions les plus ventrales sont envahies par la première vague qui provient de la MGE et de l'AEP et s'étend jusqu'au cortex via la plaque corticale en développement. Puis le cortex bénéficie d'une deuxième vague d'OLP, plus tardive, qui provient des cellules de la ZSV et est constituée de cellules PDGFR α ⁺ et de cellules *plp/dm-20*⁺ (Ivanova et al., 2003). Ces cellules *plp/dm-20*⁺ se répartissent essentiellement dans les couches corticales internes. De plus, Gorski et collaborateurs ont proposé que les oligodendrocytes du cortex cérébral étaient issus des progéniteurs exprimant le facteur de transcription Emx-1 dans le pallium (Gorski et al., 2002).

Chez l'adulte, des conditions lésionnelles induisant une démyélinisation focale ou multifocale (encéphalomyélite autoimmune expérimentale ou EAE) provoquent la prolifération des progéniteurs de la ZSV, leur mobilisation vers les sites de lésion et leur différenciation en astrocytes et oligodendrocytes, en particulier dans le corps calleux, le striatum, les bulbes olfactifs, le RMS et les régions corticales proches de la ZSV, rendant ainsi compte d'une forte capacité de mobilisation

et de migration des OLP en provenance de la ZSV, mais qui n'a pour l'instant été montrée qu'après démyélinisation et non dans des cas physiologiques (Nait-Oumesmar et al., 1999 ; Picard-Riera et al., 2002). Des expériences utilisant l'injection dans la ZSV d'un colorant lipophile de type DiI ou d'un rétrovirus exprimant la GFP permettraient de visualiser une potentielle migration des cellules de la ZSV.

2.3. Shh et processus de démyélinisation/remyélinisation

L'activation de la voie SHh dans le cerveau mature apparaît orienter une population de progéniteurs vers les phases initiales du lignage oligodendrocytaire sans toutefois permettre d'atteindre un phénotype d'oligodendrocytes plus avancé dans les stades de maturation. Chez l'adulte, comme au cours du développement embryonnaire, Shh serait donc impliqué dans les phases les plus précoces de l'oligodrogenèse persistant dans le cerveau mature (Dawson et al., 2003) et faire partie des combinaisons de facteurs vraisemblablement nécessaires à ce processus. Récemment, Gokhan et collaborateurs ont mis en évidence le lien entre la maturation des cellules oligodendrocytaires et les changements dynamiques de l'expression des différents types de facteurs de transcription tels que Olig1, Olig2, Mash1, Id2, Id4, Sox10 et Nkx2.2, démontrant ainsi que l'expression des gènes de myéline est dépendante de la composition moléculaire des complexes transcriptionnels faisant intervenir différents facteurs de transcription à un stade précis du développement (Gokhan et al., 2005).

Chez l'adulte, la connaissance des mécanismes et facteurs mis en jeu dans le processus de réparation consécutif à une démyélinisation pathologique commencent à être étudiés. Ainsi, Hsieh et collaborateurs ont montré que, chez le rat adulte, l'IGF-1 favorisait la différenciation de progéniteurs neuraux multipotents dérivés de l'hippocampe via une inhibition de la signalisation BMP, suggérant ainsi que le devenir des progéniteurs neuraux adultes, en particulier, vers le lignage

oligodendrocytaire, dépend de plusieurs facteurs environnementaux (Hsieh et al., 2004). Dans un modèle de démyélinisation expérimentale utilisant la neurotoxine cuprizone, l'expression d'Olig1 et notamment sa translocation nucléaire dans les cellules NG2⁺ se révèlent critiques pour le processus de différenciation oligodendrocytaire (Arnett et al., 2004). Par ailleurs, des cytokines sont capables de lutter contre la démyélinisation dans des modèles expérimentaux. Ainsi dans des modèles murins d'EAE induite par une sensibilisation des animaux à l'antigène MOG (myelin oligodendrocyte glycoprotein) de la myéline, le LIF (Butzkueven et al., 2002) et le CNTF (Linker et al., 2002) préviennent l'apoptose des oligodendrocytes jouant le rôle de facteurs protecteurs dans les pathologies démyélinisantes.

Il serait intéressant à présent de déterminer si la stimulation de la voie de signalisation Shh dans le SNC de souris présentant des lésions démyélinisantes focales ou multifocales peut influencer de manière positive le recrutement et la différenciation d'oligodendrocytes au sein des lésions et potentiellement participer au processus de remyélinisation. En accord avec nos données, Mastronardi et collaborateurs ont démontré récemment que, dans le cerveau de patients souffrant de sclérose en plaques, le fragment actif ShhN se trouverait en quantité réduite dans la substance grise et complètement absent dans la substance blanche (Mastronardi et al., 2003). Par ailleurs, dans un modèle de démyélinisation induite par un traumatisme de la moelle épinière, Shh potentialiserait les effets bénéfiques de la transplantation de précurseurs oligodendrocytaires sur la conduction axonale et les fonctions motrices (Bambakidis et al., 2004).

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les travaux réalisés au cours de ce doctorat ont permis de mettre en évidence et de caractériser la présence de formes soluble et membranaire de Hip dans le cerveau adulte, de détailler le profil d'expression spatiotemporel de ce récepteur du stade embryonnaire E13.5 au stade adulte et de suggérer pour la première fois l'existence d'interactions entre les voies de signalisation impliquant respectivement Hip et le neuromédiateur gazeux NO. De plus, ils apportent des arguments supplémentaires pour considérer la modulation de la voie de signalisation Hh comme une approche thérapeutique potentielle dans des pathologies comme les tumeurs ou les démyélinisations du SNC qui pourraient bénéficier respectivement du blocage et de l'activation de la voie Hh. Ces données contribuent aussi à améliorer la compréhension des mécanismes moléculaires intrinsèques et extrinsèques régulant la prolifération et la maturation des cellules du lignage oligodendrocytaire, un élément critique pour les pathologies de la myéline, parmi lesquelles la sclérose en plaques. Celle-ci se caractérise par des épisodes de démyélinisation aiguë suivis par la génération de nouveaux oligodendrocytes, une remyélinisation et un recouvrement fonctionnel. La remyélinisation inconstante et l'accumulation de lésions engendrent une détérioration neurologique progressive, en partie à cause de la capacité limitée à générer de nouveaux oligodendrocytes fonctionnels (pour revue voir Franklin, 2002).

Le défi de la recherche actuelle est non seulement d'améliorer la caractérisation des cellules souches neurales et des progéniteurs (isolement, amplification, différenciation selon le phénotype approprié des cellules), mais aussi celle des molécules et mécanismes intrinsèques et environnementaux capables d'influencer leur prolifération, leur survie, leur localisation et surtout leur phénotype, ce qui permettra d'élaborer des thérapies, vraisemblablement multi-stratégiques (approche neuroprotective, neurochirurgicale, recouvrement fonctionnel) pour lutter contre les pathologies neurodégénératives.

BIBLIOGRAPHIE

- Aberg, M. A., N. D. Aberg, et al. (2000). *Peripheral infusion of IGF-I selectively induces neurogenesis in the adult rat hippocampus*. J Neurosci 20(8): 2896-903.
- Aberg, M. A., N. D. Aberg, et al. (2003). *IGF-I has a direct proliferative effect in adult hippocampal progenitor cells*. Mol Cell Neurosci 24(1): 23-40.
- Aguirre, A. and V. Gallo (2004a). *Postnatal neurogenesis and gliogenesis in the olfactory bulb from NG2-expressing progenitors of the subventricular zone*. J Neurosci 24(46): 10530-41.
- Aguirre, A. A., R. Chittajallu, et al. (2004b). *NG2-expressing cells in the subventricular zone are type C-like cells and contribute to interneuron generation in the postnatal hippocampus*. J Cell Biol 165(4): 575-89.
- Ahlgren, S. C. and M. Bronner-Fraser (1999). *Inhibition of sonic hedgehog signaling in vivo results in craniofacial neural crest cell death*. Curr Biol 9(22): 1304-14.
- Ahlgren, U., J. Jonsson, et al. (1996). *The morphogenesis of the pancreatic mesenchyme is uncoupled from that of the pancreatic epithelium in IPF1/PDX1-deficient mice*. Development 122(5): 1409-16.
- Akiyama, H., C. Shigeno, et al. (1997). *Cloning of a mouse smoothed cDNA and expression patterns of hedgehog signalling molecules during chondrogenesis and cartilage differentiation in clonal mouse EC cells, ATDC5*. Biochem Biophys Res Commun 235(1): 142-7.
- Altman, J. (1969). *Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb*. J Comp Neurol 137(4): 433-57.
- Altman, J. and G. D. Das (1965). *Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats*. J Comp Neurol 124(3): 319-35.
- Altman, J. and G. D. Das (1966). *Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. I. A longitudinal investigation of the kinetics, migration and transformation of cells incorporating tritiated thymidine in neonate rats, with special reference to postnatal neurogenesis in some brain regions*. J Comp Neurol 126(3): 337-89.
- Alvarez-Buylla, A., J. M. Garcia-Verdugo, et al. (2001). *A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells*. Nat Rev Neurosci 2(4): 287-93.
- Alvarez-Buylla, A., D. G. Herrera, et al. (2000). *The subventricular zone: source of neuronal precursors for brain repair*. Prog Brain Res 127: 1-11.
- Alvarez-Buylla, A. and D. A. Lim (2004). *For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain*. Neuron 41(5): 683-6.
- Alvarez-Buylla, A., B. Seri, et al. (2002). *Identification of neural stem cells in the adult vertebrate brain*. Brain Res Bull 57(6): 751-8.
- Amato, M. A., S. Boy, et al. (2004). *Hedgehog signaling in vertebrate eye development: a growing puzzle*. Cell Mol Life Sci 61(7-8): 899-910.
- Apelqvist, A., U. Ahlgren, et al. (1997). *Sonic hedgehog directs specialised mesoderm differentiation in the intestine and pancreas*. Curr Biol 7(10): 801-4.
- Arnett, H. A., S. P. Fancy, et al. (2004). *bHLH transcription factor Olig1 is required to repair demyelinated lesions in the CNS*. Science 306(5704): 2111-5.
- Arvidsson, A., T. Collin, et al. (2002). *Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke*. Nat Med 8(9): 963-70.
- Aszterbaum, M., A. Rothman, et al. (1998). *Identification of mutations in the human PATCHED gene in sporadic basal cell carcinomas and in patients with the basal cell nevus syndrome*. J Invest Dermatol 110(6): 885-8.

- Aza-Blanc, P. and T. B. Kornberg (1999). *Ci: a complex transducer of the hedgehog signal*. Trends Genet 15(11): 458-62.
- Aza-Blanc, P., H. Y. Lin, et al. (2000). *Expression of the vertebrate Gli proteins in Drosophila reveals a distribution of activator and repressor activities*. Development 127(19): 4293-301.
- Aza-Blanc, P., F. A. Ramirez-Weber, et al. (1997). *Proteolysis that is inhibited by hedgehog targets Cubitus interruptus protein to the nucleus and converts it to a repressor*. Cell 89(7): 1043-53.
- Bak, M., C. Hansen, et al. (2001). *The human hedgehog-interacting protein gene: structure and chromosome mapping to 4q31.21-->q31.3*. Cytogenet Cell Genet 92(3-4): 300-3.
- Bambakidis, N. C. and R. H. Miller (2004). *Transplantation of oligodendrocyte precursors and sonic hedgehog results in improved function and white matter sparing in the spinal cords of adult rats after contusion*. Spine J 4(1): 16-26.
- Banerjee, S. B., R. Rajendran, et al. (2005). *Recruitment of the Sonic hedgehog signalling cascade in electroconvulsive seizure-mediated regulation of adult rat hippocampal neurogenesis*. Eur J Neurosci 22(7): 1570-80.
- Barnes, E. A., M. Kong, et al. (2001). *Patched1 interacts with cyclin B1 to regulate cell cycle progression*. Embo J 20(9): 2214-23.
- Barth, J. L. and W. S. Argraves (2001). *Cubilin and megalin: partners in lipoprotein and vitamin metabolism*. Trends Cardiovasc Med 11(1): 26-31.
- Beachy, P. A., S. S. Karhadkar, et al. (2004). *Tissue repair and stem cell renewal in carcinogenesis*. Nature 432(7015): 324-31.
- Belachew, S., R. Chittajallu, et al. (2003). *Postnatal NG2 proteoglycan-expressing progenitor cells are intrinsically multipotent and generate functional neurons*. J Cell Biol 161(1): 169-86.
- Bellaiche, Y., I. The, et al. (1998). *Tout-velu is a Drosophila homologue of the putative tumour suppressor EXT-1 and is needed for Hh diffusion*. Nature 394(6688): 85-8.
- Bellusci, S., Y. Furuta, et al. (1997a). *Involvement of Sonic hedgehog (Shh) in mouse embryonic lung growth and morphogenesis*. Development 124(1): 53-63.
- Bellusci, S., J. Grindley, et al. (1997b). *Fibroblast growth factor 10 (FGF10) and branching morphogenesis in the embryonic mouse lung*. Development 124(23): 4867-78.
- Belvindrah, R., G. Rougon, et al. (2002). *Increased neurogenesis in adult mCD24-deficient mice*. J Neurosci 22(9): 3594-607.
- Benraiss, A., E. Chmielnicki, et al. (2001). *Adenoviral brain-derived neurotrophic factor induces both neostriatal and olfactory neuronal recruitment from endogenous progenitor cells in the adult forebrain*. J Neurosci 21(17): 6718-31.
- Berman, D. M., S. S. Karhadkar, et al. (2003). *Widespread requirement for Hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumours*. Nature 425(6960): 846-51.
- Bezard, E., J. Baufreton, et al. (2003). *Sonic hedgehog is a neuromodulator in the adult subthalamic nucleus*. Faseb J 17(15): 2337-8.
- Billon, N., C. Jolicoeur, et al. (2002). *Normal timing of oligodendrocyte development depends on thyroid hormone receptor alpha 1 (TRalpha1)*. Embo J 21(23): 6452-60.
- Bitgood, M. J. and A. P. McMahon (1995). *Hedgehog and Bmp genes are coexpressed at many diverse sites of cell-cell interaction in the mouse embryo*. Dev Biol 172(1): 126-38.
- Bockaert, J. and J. P. Pin (1999). *Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success*. Embo J 18(7): 1723-9.
- Bodak, N., S. Queille, et al. (1999). *High levels of patched gene mutations in basal-cell carcinomas from patients with xeroderma pigmentosum*. Proc Natl Acad Sci U S A 96(9): 5117-22.
- Boehning, D. and S. H. Snyder (2003). *Novel neural modulators*. Annu Rev Neurosci 26: 105-31.
- Borycki, A. G., B. Brunk, et al. (1999). *Sonic hedgehog controls epaxial muscle determination through Myf5 activation*. Development 126(18): 4053-63.

- Bourikas, D., V. Pekarik, et al. (2005). *Sonic hedgehog guides commissural axons along the longitudinal axis of the spinal cord*. Nat Neurosci 8(3): 297-304.
- Boutet, N., Y. J. Bignon, et al. (2003). *Spectrum of PTCH1 mutations in French patients with Gorlin syndrome*. J Invest Dermatol 121(3): 478-81.
- Briscoe, J., Y. Chen, et al. (2001a). *A hedgehog-insensitive form of patched provides evidence for direct long-range morphogen activity of sonic hedgehog in the neural tube*. Mol Cell 7(6): 1279-91.
- Briscoe, J. and J. Ericson (1999). *The specification of neuronal identity by graded Sonic Hedgehog signalling*. Semin Cell Dev Biol 10(3): 353-62.
- Briscoe, J. and J. Ericson (2001b). *Specification of neuronal fates in the ventral neural tube*. Curr Opin Neurobiol 11(1): 43-9.
- Briscoe, J., A. Pierani, et al. (2000). *A homeodomain protein code specifies progenitor cell identity and neuronal fate in the ventral neural tube*. Cell 101(4): 435-45.
- Briscoe, J. and P. Therond (2005). *Hedgehog signaling: from the Drosophila cuticle to anti-cancer drugs*. Dev Cell 8(2): 143-51.
- Britto, J., D. Tannahill, et al. (2002). *A critical role for sonic hedgehog signaling in the early expansion of the developing brain*. Nat Neurosci 5(2): 103-10.
- Bulgakov, O. V., J. T. Eggenschwiler, et al. (2004). *FKBP8 is a negative regulator of mouse sonic hedgehog signaling in neural tissues*. Development 131(9): 2149-59.
- Burke, R., D. Nellen, et al. (1999). *Dispatched, a novel sterol-sensing domain protein dedicated to the release of cholesterol-modified hedgehog from signaling cells*. Cell 99(7): 803-15.
- Butzkueven, H., J. G. Zhang, et al. (2002). *LIF receptor signaling limits immune-mediated demyelination by enhancing oligodendrocyte survival*. Nat Med 8(6): 613-9.
- Cai, J., Y. Qi, et al. (2005). *Generation of oligodendrocyte precursor cells from mouse dorsal spinal cord independent of Nkx6 regulation and Shh signaling*. Neuron 45(1): 41-53.
- Cameron, H. A. and R. D. McKay (2001). *Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus*. J Comp Neurol 435(4): 406-17.
- Cann, G. M., J. W. Lee, et al. (1999). *Sonic hedgehog enhances somite cell viability and formation of primary slow muscle fibers in avian segmented mesoderm*. Anat Embryol 200(3): 239-52.
- Carpenter, M. K., X. Cui, et al. (1999). *In vitro expansion of a multipotent population of human neural progenitor cells*. Exp Neurol 158(2): 265-78.
- Cattaneo, E. and R. McKay (1990). *Proliferation and differentiation of neuronal stem cells regulated by nerve growth factor*. Nature 347(6295): 762-5.
- Cau, E., S. Casarosa, et al. (2002). *Mash1 and Ngn1 control distinct steps of determination and differentiation in the olfactory sensory neuron lineage*. Development 129(8): 1871-80.
- Cau, E., G. Gradwohl, et al. (1997). *Mash1 activates a cascade of bHLH regulators in olfactory neuron progenitors*. Development 124(8): 1611-21.
- Chamoun, Z., R. K. Mann, et al. (2001). *Skinny hedgehog, an acyltransferase required for palmitoylation and activity of the hedgehog signal*. Science 293(5537): 2080-4.
- Chang, D. T., A. Lopez, et al. (1994). *Products, genetic linkage and limb patterning activity of a murine hedgehog gene*. Development 120(11): 3339-53.
- Charrier, J. B., F. Lapointe, et al. (2001). *Anti-apoptotic role of Sonic hedgehog protein at the early stages of nervous system organogenesis*. Development 128(20): 4011-20.
- Charron, F., E. Stein, et al. (2003). *The morphogen sonic hedgehog is an axonal chemoattractant that collaborates with netrin-1 in midline axon guidance*. Cell 113(1): 11-23.
- Charron, F. and M. Tessier-Lavigne (2005). *Novel brain wiring functions for classical morphogens: a role as graded positional cues in axon guidance*. Development 132(10): 2251-62.
- Charytoniuk, D., B. Porcel, et al. (2002a). *Sonic Hedgehog signalling in the developing and adult brain*. J Physiol Paris 96(1-2): 9-16.

- Charytoniuk, D., E. Traiffort, et al. (2002b). *Intrastriatal sonic hedgehog injection increases Patched transcript levels in the adult rat subventricular zone.* Eur J Neurosci 16(12): 2351-7.
- Chen, J. K., J. Taipale, et al. (2002a). *Inhibition of Hedgehog signaling by direct binding of cyclopamine to Smoothed.* Genes Dev 16(21): 2743-8.
- Chen, J. K., J. Taipale, et al. (2002b). *Small molecule modulation of Smoothed activity.* Proc Natl Acad Sci U S A 99(22): 14071-6.
- Chen, Y., J. R. Cardinaux, et al. (1999). *Mutants of cubitus interruptus that are independent of PKA regulation are independent of hedgehog signaling.* Development 126(16): 3607-16.
- Chen, Y., N. Gallaher, et al. (1998). *Protein kinase A directly regulates the activity and proteolysis of cubitus interruptus.* Proc Natl Acad Sci U S A 95(5): 2349-54.
- Chenn, A. and S. K. McConnell (1995). *Cleavage orientation and the asymmetric inheritance of Notch1 immunoreactivity in mammalian neurogenesis.* Cell 82(4): 631-41.
- Chiang, C., Y. Litingtung, et al. (1996). *Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function.* Nature 383(6599): 407-13.
- Chiasson, B. J., V. Tropepe, et al. (1999). *Adult mammalian forebrain ependymal and subependymal cells demonstrate proliferative potential, but only subependymal cells have neural stem cell characteristics.* J Neurosci 19(11): 4462-71.
- Chittajallu, R., A. Aguirre, et al. (2004). *NG2-positive cells in the mouse white and grey matter display distinct physiological properties.* J Physiol 561(Pt 1): 109-22.
- Chojnacki, A., T. Shimazaki, et al. (2003). *Glycoprotein 130 signaling regulates Notch1 expression and activation in the self-renewal of mammalian forebrain neural stem cells.* J Neurosci 23(5): 1730-41.
- Chuang, P. T., T. Kawcak, et al. (2003). *Feedback control of mammalian Hedgehog signaling by the Hedgehog-binding protein, Hip1, modulates Fgf signaling during branching morphogenesis of the lung.* Genes Dev 17(3): 342-7.
- Chuang, P. T. and A. P. McMahon (1999). *Vertebrate Hedgehog signalling modulated by induction of a Hedgehog-binding protein.* Nature 397(6720): 617-21.
- Cobourne, M. T., I. Miletich, et al. (2004). *Restriction of sonic hedgehog signalling during early tooth development.* Development 131(12): 2875-85.
- Cooper, M. K., J. A. Porter, et al. (1998). *Teratogen-mediated inhibition of target tissue response to Shh signaling.* Science 280(5369): 1603-7.
- Cornesse, Y., T. Pieler, et al. (2005). *Olfactory and lens placode formation is controlled by the hedgehog-interacting protein (Xhip) in Xenopus.* Dev Biol 277(2): 296-315.
- Correa-Cerro, L. S. and F. D. Porter (2005). *3beta-hydroxysterol Delta7-reductase and the Smith-Lemli-Opitz syndrome.* Mol Genet Metab 84(2): 112-26.
- Coulombe, J., E. Traiffort, et al. (2004). *Hedgehog interacting protein in the mature brain: membrane-associated and soluble forms.* Mol Cell Neurosci 25(2): 323-33.
- Couve-Privat, S., M. Le Bret, et al. (2004). *Functional analysis of novel sonic hedgehog gene mutations identified in basal cell carcinomas from xeroderma pigmentosum patients.* Cancer Res 64(10): 3559-65.
- Craig, C. G., V. Tropepe, et al. (1996). *In vivo growth factor expansion of endogenous subependymal neural precursor cell populations in the adult mouse brain.* J Neurosci 16(8): 2649-58.
- Dahmane, N., J. Lee, et al. (1997). *Activation of the transcription factor Gli1 and the Sonic hedgehog signalling pathway in skin tumours.* Nature 389(6653): 876-81.
- Dahmane, N. and A. Ruiz-i-Altaba (1999). *Sonic hedgehog regulates the growth and patterning of the cerebellum.* Development 126(14): 3089-100.
- Dahmane, N., P. Sanchez, et al. (2001). *The Sonic Hedgehog-Gli pathway regulates dorsal brain growth and tumorigenesis.* Development 128(24): 5201-12.

- Dakubo, G. D. and V. A. Wallace (2004). *Hedgehogs and retinal ganglion cells: organizers of the mammalian retina.* Neuroreport 15(3): 479-82.
- Davis, A. A. and S. Temple (1994). *A self-renewing multipotential stem cell in embryonic rat cerebral cortex.* Nature 372(6503): 263-6.
- Dawson, M. R., J. M. Levine, et al. (2000). *NG2-expressing cells in the central nervous system: are they oligodendroglial progenitors?* J Neurosci Res 61(5): 471-9.
- Dawson, M. R., A. Polito, et al. (2003). *NG2-expressing glial progenitor cells: an abundant and widespread population of cycling cells in the adult rat CNS.* Mol Cell Neurosci 24(2): 476-88.
- Dayer, A. G., K. M. Cleaver, et al. (2005). *New GABAergic interneurons in the adult neocortex and striatum are generated from different precursors.* J Cell Biol 168(3): 415-27.
- Decker, L., N. Picard-Riera, et al. (2002). *Growth factor treatment promotes mobilization of young but not aged adult subventricular zone precursors in response to demyelination.* J Neurosci Res 69(6): 763-71.
- Dempsey, R. J., K. A. Sailor, et al. (2003). *Stroke-induced progenitor cell proliferation in adult spontaneously hypertensive rat brain: effect of exogenous IGF-1 and GDNF.* J Neurochem 87(3): 586-97.
- D'Errico, M., A. Calcagnile, et al. (2000). *UV mutation signature in tumor suppressor genes involved in skin carcinogenesis in xeroderma pigmentosum patients.* Oncogene 19(3): 463-7.
- Doetsch, F. and A. Alvarez-Buylla (1996). *Network of tangential pathways for neuronal migration in adult mammalian brain.* Proc Natl Acad Sci U S A 93(25): 14895-900.
- Doetsch, F., I. Caille, et al. (1999). *Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain.* Cell 97(6): 703-16.
- Doetsch, F., J. M. Garcia-Verdugo, et al. (1997). *Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain.* J Neurosci 17(13): 5046-61.
- Doetsch, F., L. Petreanu, et al. (2002). *EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells.* Neuron 36(6): 1021-34.
- Dunaeva, M., P. Michelson, et al. (2003). *Characterization of the physical interaction of Gli proteins with SUFU proteins.* J Biol Chem 278(7): 5116-22.
- Echelard, Y., D. J. Epstein, et al. (1993). *Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity.* Cell 75(7): 1417-30.
- Eggenschwiler, J. T., E. Espinoza, et al. (2001). *Rab23 is an essential negative regulator of the mouse Sonic hedgehog signalling pathway.* Nature 412(6843): 194-8.
- Eisen, J. S. (1999). *Patterning motoneurons in the vertebrate nervous system.* Trends Neurosci 22(7): 321-6.
- Ekker, S. C., L. L. McGrew, et al. (1995a). *Distinct expression and shared activities of members of the hedgehog gene family of *Xenopus laevis*.* Development 121(8): 2337-47.
- Ekker, S. C., A. R. Ungar, et al. (1995b). *Patterning activities of vertebrate hedgehog proteins in the developing eye and brain.* Curr Biol 5(8): 944-55.
- Ericson, J., S. Morton, et al. (1996). *Two critical periods of Sonic Hedgehog signaling required for the specification of motor neuron identity.* Cell 87(4): 661-73.
- Ericson, J., J. Muhr, et al. (1995). *Sonic hedgehog: a common signal for ventral patterning along the rostrocaudal axis of the neural tube.* Int J Dev Biol 39(5): 809-16.
- Estivill-Torres, G., H. Pearson, et al. (2002). *Pax6 is required to regulate the cell cycle and the rate of progression from symmetrical to asymmetrical division in mammalian cortical progenitors.* Development 129(2): 455-66.

- Fallon, J., S. Reid, et al. (2000). *In vivo induction of massive proliferation, directed migration, and differentiation of neural cells in the adult mammalian brain.* Proc Natl Acad Sci U S A 97(26): 14686-91.
- Fan, C. M., C. S. Lee, et al. (1997). *A role for WNT proteins in induction of dermomyotome.* Dev Biol 191(1): 160-5.
- Fan, H. and P. A. Khavari (1999). *Sonic hedgehog opposes epithelial cell cycle arrest.* J Cell Biol 147(1): 71-6.
- Fode, C., G. Gradwohl, et al. (1998). *The bHLH protein NEUROGENIN 2 is a determination factor for epibranchial placode-derived sensory neurons.* Neuron 20(3): 483-94.
- Forbes, A. J., Y. Nakano, et al. (1993). *Genetic analysis of hedgehog signalling in the Drosophila embryo.* Dev Suppl: 115-24.
- Frank-Kamenetsky, M., X. M. Zhang, et al. (2002). *Small-molecule modulators of Hedgehog signaling: identification and characterization of Smoothed agonists and antagonists.* J Biol 1(2): 10.
- Franklin, R. J. (2002). *Why does remyelination fail in multiple sclerosis?* Nat Rev Neurosci 3(9): 705-14.
- Fruttiger, M., A. R. Calver, et al. (2000). *Platelet-derived growth factor is constitutively secreted from neuronal cell bodies but not from axons.* Curr Biol 10(20): 1283-6.
- Fu, H., Y. Qi, et al. (2002). *Dual origin of spinal oligodendrocyte progenitors and evidence for the cooperative role of Olig2 and Nkx2.2 in the control of oligodendrocyte differentiation.* Development 129(3): 681-93.
- Fuccillo, M., M. Rallu, et al. (2004). *Temporal requirement for hedgehog signaling in ventral telencephalic patterning.* Development 131(20): 5031-40.
- Fuse, N., T. Maiti, et al. (1999). *Sonic hedgehog protein signals not as a hydrolytic enzyme but as an apparent ligand for patched.* Proc Natl Acad Sci U S A 96(20): 10992-9.
- Gage, F. H. (2000). *Mammalian neural stem cells.* Science 287(5457): 1433-8.
- Gailani, M. R., S. J. Bale, et al. (1992). *Developmental defects in Gorlin syndrome related to a putative tumor suppressor gene on chromosome 9.* Cell 69(1): 111-7.
- Gailani, M. R., M. Stahle-Backdahl, et al. (1996). *The role of the human homologue of Drosophila patched in sporadic basal cell carcinomas.* Nat Genet 14(1): 78-81.
- Gallet, A., R. Rodriguez, et al. (2003). *Cholesterol modification of hedgehog is required for trafficking and movement, revealing an asymmetric cellular response to hedgehog.* Dev Cell 4(2): 191-204.
- Galli, R., A. Gritti, et al. (2003). *Neural stem cells: an overview.* Circ Res 92(6): 598-608.
- Gangemi, R. M., M. Perera, et al. (2004). *Regulatory genes controlling cell fate choice in embryonic and adult neural stem cells.* J Neurochem 89(2): 286-306.
- Ghali, L., S. T. Wong, et al. (1999). *Gli1 protein is expressed in basal cell carcinomas, outer root sheath keratinocytes and a subpopulation of mesenchymal cells in normal human skin.* J Invest Dermatol 113(4): 595-9.
- Glise, B., C. A. Miller, et al. (2005). *Shifted, the Drosophila ortholog of Wnt inhibitory factor-1, controls the distribution and movement of Hedgehog.* Dev Cell 8(2): 255-66.
- Gokhan, S., M. Marin-Husstege, et al. (2005). *Combinatorial profiles of oligodendrocyte-selective classes of transcriptional regulators differentially modulate myelin basic protein gene expression.* J Neurosci 25(36): 8311-21.
- Goldman, S. (2003). *Glia as neural progenitor cells.* Trends Neurosci 26(11): 590-6.
- Goodrich, L. V., R. L. Johnson, et al. (1996). *Conservation of the hedgehog/patched signaling pathway from flies to mice: induction of a mouse patched gene by Hedgehog.* Genes Dev 10(3): 301-12.
- Goodrich, L. V., L. Milenkovic, et al. (1997). *Altered neural cell fates and medulloblastoma in mouse patched mutants.* Science 277(5329): 1109-13.

- Gorlin, R. J. (1995). *Nevoid basal cell carcinoma syndrome*. Dermatol Clin 13(1): 113-25.
- Gorski, J. A., T. Talley, et al. (2002). *Cortical excitatory neurons and glia, but not GABAergic neurons, are produced in the Emx1-expressing lineage*. J Neurosci 22(15): 6309-14.
- Gould, E., A. J. Reeves, et al. (1999). *Neurogenesis in the neocortex of adult primates*. Science 286(5439): 548-52.
- Graham, V., J. Khudyakov, et al. (2003). *SOX2 functions to maintain neural progenitor identity*. Neuron 39(5): 749-65.
- Gregg, C. and S. Weiss (2003). *Generation of functional radial glial cells by embryonic and adult forebrain neural stem cells*. J Neurosci 23(37): 11587-601.
- Gregori, N., C. Proschel, et al. (2002). *The tripotential glial-restricted precursor (GRP) cell and glial development in the spinal cord: generation of bipotential oligodendrocyte-type-2 astrocyte progenitor cells and dorsal-ventral differences in GRP cell function*. J Neurosci 22(1): 248-56.
- Grindley, J. C., S. Bellusci, et al. (1997). *Evidence for the involvement of the Gli gene family in embryonic mouse lung development*. Dev Biol 188(2): 337-48.
- Gritli-Linde, A., P. Lewis, et al. (2001). *The whereabouts of a morphogen: direct evidence for short- and graded long-range activity of hedgehog signaling peptides*. Dev Biol 236(2): 364-86.
- Gritti, A., P. Frolichsthal-Schoeller, et al. (1999). *Epidermal and fibroblast growth factors behave as mitogenic regulators for a single multipotent stem cell-like population from the subventricular region of the adult mouse forebrain*. J Neurosci 19(9): 3287-97.
- Gross, R. E., M. F. Mehler, et al. (1996). *Bone morphogenetic proteins promote astroglial lineage commitment by mammalian subventricular zone progenitor cells*. Neuron 17(4): 595-606.
- Groszer, M., R. Erickson, et al. (2001). *Negative regulation of neural stem/progenitor cell proliferation by the Pten tumor suppressor gene in vivo*. Science 294(5549): 2186-9.
- Gunther, T., M. Struwe, et al. (1994). *Open brain, a new mouse mutant with severe neural tube defects, shows altered gene expression patterns in the developing spinal cord*. Development 120(11): 3119-30.
- Hahn, H., J. Christiansen, et al. (1996a). *A mammalian patched homolog is expressed in target tissues of sonic hedgehog and maps to a region associated with developmental abnormalities*. J Biol Chem 271(21): 12125-8.
- Hahn, H., C. Wicking, et al. (1996b). *Mutations of the human homolog of Drosophila patched in the nevoid basal cell carcinoma syndrome*. Cell 85(6): 841-51.
- Hall, J. M., J. E. Hooper, et al. (1999). *Expression of sonic hedgehog, patched, and Gli1 in developing taste papillae of the mouse*. J Comp Neurol 406(2): 143-55.
- Hardcastle, Z., R. Mo, et al. (1998). *The Shh signalling pathway in tooth development: defects in Gli2 and Gli3 mutants*. Development 125(15): 2803-11.
- He, W., C. Ingraham, et al. (2001). *Multipotent stem cells from the mouse basal forebrain contribute GABAergic neurons and oligodendrocytes to the cerebral cortex during embryogenesis*. J Neurosci 21(22): 8854-62.
- Hebrok, M., S. K. Kim, et al. (1998). *Notochord repression of endodermal Sonic hedgehog permits pancreas development*. Genes Dev 12(11): 1705-13.
- Hebrok, M., S. K. Kim, et al. (2000). *Regulation of pancreas development by hedgehog signaling*. Development 127(22): 4905-13.
- Herrera, J., H. Yang, et al. (2001). *Embryonic-derived glial-restricted precursor cells (GRP cells) can differentiate into astrocytes and oligodendrocytes in vivo*. Exp Neurol 171(1): 11-21.
- Hill, R. E., S. J. Heaney, et al. (2003). *Sonic hedgehog: restricted expression and limb dysmorphologies*. J Anat 202(1): 13-20.
- Hitoshi, S., T. Alexson, et al. (2002). *Notch pathway molecules are essential for the maintenance, but not the generation, of mammalian neural stem cells*. Genes Dev 16(7): 846-58.

- Hooper, J. E. (2003). *Smoothened translates Hedgehog levels into distinct responses*. Development 130(17): 3951-63.
- Horner, P. J., A. E. Power, et al. (2000). *Proliferation and differentiation of progenitor cells throughout the intact adult rat spinal cord*. J Neurosci 20(6): 2218-28.
- Hsieh, J., J. B. Aimone, et al. (2004). *IGF-I instructs multipotent adult neural progenitor cells to become oligodendrocytes*. J Cell Biol 164(1): 111-22.
- Hu, D. and J. A. Helms (1999). *The role of sonic hedgehog in normal and abnormal craniofacial morphogenesis*. Development 126(21): 4873-84.
- Hu, Z., K. Yuri, et al. (1997). *The in vivo time course for elimination of adrenalectomy-induced apoptotic profiles from the granule cell layer of the rat hippocampus*. J Neurosci 17(11): 3981-9.
- Hui, C. C., D. Slusarski, et al. (1994). *Expression of three mouse homologs of the Drosophila segment polarity gene cubitus interruptus, Gli, Gli-2, and Gli-3, in ectoderm- and mesoderm-derived tissues suggests multiple roles during postimplantation development*. Dev Biol 162(2): 402-13.
- Hynes, M., J. A. Porter, et al. (1995). *Induction of midbrain dopaminergic neurons by Sonic hedgehog*. Neuron 15(1): 35-44.
- Incardona, J. P., W. Gaffield, et al. (1998). *The teratogenic Veratrum alkaloid cyclopamine inhibits sonic hedgehog signal transduction*. Development 125(18): 3553-62.
- Incardona, J. P., W. Gaffield, et al. (2000a). *Cyclopamine inhibition of Sonic hedgehog signal transduction is not mediated through effects on cholesterol transport*. Dev Biol 224(2): 440-52.
- Incardona, J. P., J. Gruenberg, et al. (2002). *Sonic hedgehog induces the segregation of patched and smoothened in endosomes*. Curr Biol 12(12): 983-95.
- Incardona, J. P. and H. Roelink (2000b). *The role of cholesterol in Shh signaling and teratogen-induced holoprosencephaly*. Cell Mol Life Sci 57(12): 1709-19.
- Ingham, P. W. and A. P. McMahon (2001). *Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles*. Genes Dev 15(23): 3059-87.
- Ingham, P. W., A. M. Taylor, et al. (1991). *Role of the Drosophila patched gene in positional signalling*. Nature 353(6340): 184-7.
- Inoue, Y., N. Niwa, et al. (2002). *Expression patterns of hedgehog, wingless, and decapentaplegic during gut formation of Gryllus bimaculatus (cricket)*. Mech Dev 110(1-2): 245-8.
- Irvin, D. K., S. D. Zurcher, et al. (2001). *Expression patterns of Notch1, Notch2, and Notch3 suggest multiple functional roles for the Notch-DSL signaling system during brain development*. J Comp Neurol 436(2): 167-81.
- Ivanova, A., E. Nakahira, et al. (2003). *Evidence for a second wave of oligodendrogenesis in the postnatal cerebral cortex of the mouse*. J Neurosci Res 73(5): 581-92.
- Jeong, J. and A. P. McMahon (2005). *Growth and pattern of the mammalian neural tube are governed by partially overlapping feedback activities of the hedgehog antagonists patched 1 and Hhip1*. Development 132(1): 143-54.
- Jessell, T. M. (2000). *Neuronal specification in the spinal cord: inductive signals and transcriptional codes*. Nat Rev Genet 1(1): 20-9.
- Jia, J., K. Amanai, et al. (2002). *Shaggy/GSK3 antagonizes Hedgehog signalling by regulating Cubitus interruptus*. Nature 416(6880): 548-52.
- Jia, J., C. Tong, et al. (2003). *Smoothened transduces Hedgehog signal by physically interacting with Costal2/Fused complex through its C-terminal tail*. Genes Dev 17(21): 2709-20.
- Jiang, F., T. J. Frederick, et al. (2001). *IGF-I synergizes with FGF-2 to stimulate oligodendrocyte progenitor entry into the cell cycle*. Dev Biol 232(2): 414-23.
- Jiang, J. and G. Struhl (1998). *Regulation of the Hedgehog and Wingless signalling pathways by the F-box/WD40-repeat protein Slimb*. Nature 391(6666): 493-6.

- Johansson, C. B., S. Momma, et al. (1999). *Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system*. Cell 96(1): 25-34.
- Johnson, R. L., A. L. Rothman, et al. (1996). *Human homolog of patched, a candidate gene for the basal cell nevus syndrome*. Science 272(5268): 1668-71.
- Kalderon, D. (2000). *Transducing the hedgehog signal*. Cell 103(3): 371-4.
- Kaplan, M. S. and D. H. Bell (1984). *Mitotic neuroblasts in the 9-day-old and 11-month-old rodent hippocampus*. J Neurosci 4(6): 1429-41.
- Kaplan, M. S. and J. W. Hinds (1977). *Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs*. Science 197(4308): 1092-4.
- Karhadkar, S. S., G. S. Bova, et al. (2004). *Hedgehog signalling in prostate regeneration, neoplasia and metastasis*. Nature 431(7009): 707-12.
- Katoh, Y. and M. Katoh (2004). *KIF27 is one of orthologs for Drosophila Costal-2*. Int J Oncol 25(6): 1875-80.
- Kawaguchi, A., T. Miyata, et al. (2001). *Nestin-EGFP transgenic mice: visualization of the self-renewal and multipotency of CNS stem cells*. Mol Cell Neurosci 17(2): 259-73.
- Kawahira, H., N. H. Ma, et al. (2003). *Combined activities of hedgehog signaling inhibitors regulate pancreas development*. Development 130(20): 4871-9.
- Kenney, A. M., M. D. Cole, et al. (2003). *Nmyc upregulation by sonic hedgehog signaling promotes proliferation in developing cerebellar granule neuron precursors*. Development 130(1): 15-28.
- Kenney, A. M. and D. H. Rowitch (2000). *Sonic hedgehog promotes G(1) cyclin expression and sustained cell cycle progression in mammalian neuronal precursors*. Mol Cell Biol 20(23): 9055-67.
- Kilpatrick, T. J. and P. F. Bartlett (1993). *Cloning and growth of multipotential neural precursors: requirements for proliferation and differentiation*. Neuron 10(2): 255-65.
- Kim, J., P. Kim, et al. (2001). *The VACTERL association: lessons from the Sonic hedgehog pathway*. Clin Genet 59(5): 306-15.
- Kim, S. K. and D. A. Melton (1998). *Pancreas development is promoted by cyclopamine, a hedgehog signaling inhibitor*. Proc Natl Acad Sci U S A 95(22): 13036-41.
- Kinzler, K. W., S. H. Bigner, et al. (1987). *Identification of an amplified, highly expressed gene in a human glioma*. Science 236(4797): 70-3.
- Kohtz, J. D., D. P. Baker, et al. (1998). *Regionalization within the mammalian telencephalon is mediated by changes in responsiveness to Sonic Hedgehog*. Development 125(24): 5079-89.
- Koketsu, D., A. Mikami, et al. (2003). *Nonrenewal of neurons in the cerebral neocortex of adult macaque monkeys*. J Neurosci 23(3): 937-42.
- Kondo, T. and M. Raff (2000). *Basic helix-loop-helix proteins and the timing of oligodendrocyte differentiation*. Development 127(14): 2989-98.
- Kornack, D. R. and P. Rakic (2001). *The generation, migration, and differentiation of olfactory neurons in the adult primate brain*. Proc Natl Acad Sci U S A 98(8): 4752-7.
- Kosaka, T. and K. Hama (1986). *Three-dimensional structure of astrocytes in the rat dentate gyrus*. J Comp Neurol 249(2): 242-60.
- Krauss, S., J. P. Concordet, et al. (1993). *A functionally conserved homolog of the Drosophila segment polarity gene hh is expressed in tissues with polarizing activity in zebrafish embryos*. Cell 75(7): 1431-44.
- Kriegstein, A. R. and M. Gotz (2003). *Radial glia diversity: a matter of cell fate*. Glia 43(1): 37-43.
- Kruger, M., D. Mennerich, et al. (2001). *Sonic hedgehog is a survival factor for hypaxial muscles during mouse development*. Development 128(5): 743-52.
- Kuhlbrodt, K., B. Herbarth, et al. (1998). *Sox10, a novel transcriptional modulator in glial cells*. J Neurosci 18(1): 237-50.

- Kuhn, H. G., J. Winkler, et al. (1997). *Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain.* J Neurosci 17(15): 5820-9.
- Lachapelle, F., V. Avellana-Adalid, et al. (2002). *Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) and platelet-derived growth factor AB (PDGF AB) promote adult SVZ-derived oligodendrogenesis in vivo.* Mol Cell Neurosci 20(3): 390-403.
- Lai, K., B. K. Kaspar, et al. (2003). *Sonic hedgehog regulates adult neural progenitor proliferation in vitro and in vivo.* Nat Neurosci 6(1): 21-7.
- Lam, C. W., J. Xie, et al. (1999). *A frequent activated smoothed mutation in sporadic basal cell carcinomas.* Oncogene 18(3): 833-6.
- Landis, S. H., T. Murray, et al. (1998). *Cancer statistics, 1998.* CA Cancer J Clin 48(1): 6-29.
- Laywell, E. D., P. Rakic, et al. (2000). *Identification of a multipotent astrocytic stem cell in the immature and adult mouse brain.* Proc Natl Acad Sci U S A 97(25): 13883-8.
- Lee, C. S., L. Buttitta, et al. (2001). *Evidence that the WNT-inducible growth arrest-specific gene 1 encodes an antagonist of sonic hedgehog signaling in the somite.* Proc Natl Acad Sci U S A 98(20): 11347-52.
- Lee, J., K. A. Platt, et al. (1997). *Gli1 is a target of Sonic hedgehog that induces ventral neural tube development.* Development 124(13): 2537-52.
- Lee, J., Y. Wu, et al. (2003). *Neurogenin3 participates in gliogenesis in the developing vertebrate spinal cord.* Dev Biol 253(1): 84-98.
- Lee, J. J., S. C. Ekker, et al. (1994). *Autoproteolysis in hedgehog protein biogenesis.* Science 266(5190): 1528-37.
- Lee, J. J., D. P. von Kessler, et al. (1992). *Secretion and localized transcription suggest a role in positional signaling for products of the segmentation gene hedgehog.* Cell 71(1): 33-50.
- Levanat, S., B. Pavelic, et al. (2000). *Involvement of PTCH gene in various noninflammatory cysts.* J Mol Med 78(3): 140-6.
- Levine, J. M., R. Reynolds, et al. (2001). *The oligodendrocyte precursor cell in health and disease.* Trends Neurosci 24(1): 39-47.
- Levine, J. M., F. Stincone, et al. (1993). *Development and differentiation of glial precursor cells in the rat cerebellum.* Glia 7(4): 307-21.
- Levison, S. W., G. M. Young, et al. (1999). *Cycling cells in the adult rat neocortex preferentially generate oligodendroglia.* J Neurosci Res 57(4): 435-46.
- Li, L., F. Liu, et al. (2002). *PTEN in neural precursor cells: regulation of migration, apoptosis, and proliferation.* Mol Cell Neurosci 20(1): 21-9.
- Lie, D. C., G. Dziejczapolski, et al. (2002). *The adult substantia nigra contains progenitor cells with neurogenic potential.* J Neurosci 22(15): 6639-49.
- Lim, D. A., G. J. Fishell, et al. (1997). *Postnatal mouse subventricular zone neuronal precursors can migrate and differentiate within multiple levels of the developing neuraxis.* Proc Natl Acad Sci U S A 94(26): 14832-6.
- Lim, D. A., A. D. Tramontin, et al. (2000). *Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis.* Neuron 28(3): 713-26.
- Linker, R. A., M. Maurer, et al. (2002). *CNTF is a major protective factor in demyelinating CNS disease: a neurotrophic cytokine as modulator in neuroinflammation.* Nat Med 8(6): 620-4.
- Litingtung, Y. and C. Chiang (2000). *Specification of ventral neuron types is mediated by an antagonistic interaction between Shh and Gli3.* Nat Neurosci 3(10): 979-85.
- Liu, H. X., D. K. Maccallum, et al. (2004). *Sonic hedgehog exerts distinct, stage-specific effects on tongue and taste papilla development.* Dev Biol 276(2): 280-300.
- Lois, C. and A. Alvarez-Buylla (1993). *Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia.* Proc Natl Acad Sci U S A 90(5): 2074-7.

- Lois, C. and A. Alvarez-Buylla (1994). *Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain*. Science 264(5162): 1145-8.
- Lois, C., J. M. Garcia-Verdugo, et al. (1996). *Chain migration of neuronal precursors*. Science 271(5251): 978-81.
- Lu, Q. R., L. Cai, et al. (2001). *Ectopic expression of Olig1 promotes oligodendrocyte formation and reduces neuronal survival in developing mouse cortex*. Nat Neurosci 4(10): 973-4.
- Lu, Q. R., T. Sun, et al. (2002). *Common developmental requirement for Olig function indicates a motor neuron/oligodendrocyte connection*. Cell 109(1): 75-86.
- Lu, Q. R., D. Yuk, et al. (2000). *Sonic hedgehog--regulated oligodendrocyte lineage genes encoding bHLH proteins in the mammalian central nervous system*. Neuron 25(2): 317-29.
- Lum, L. and P. A. Beachy (2004). *The Hedgehog response network: sensors, switches, and routers*. Science 304(5678): 1755-9.
- Lum, L., S. Yao, et al. (2003a). *Identification of Hedgehog pathway components by RNAi in Drosophila cultured cells*. Science 299(5615): 2039-45.
- Lum, L., C. Zhang, et al. (2003b). *Hedgehog signal transduction via Smoothed association with a cytoplasmic complex scaffolded by the atypical kinesin, Costal-2*. Mol Cell 12(5): 1261-74.
- Luskin, M. B. (1993). *Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone*. Neuron 11(1): 173-89.
- Ma, Q., Z. Chen, et al. (1998). *neurogenin1 is essential for the determination of neuronal precursors for proximal cranial sensory ganglia*. Neuron 20(3): 469-82.
- Machold, R., S. Hayashi, et al. (2003). *Sonic hedgehog is required for progenitor cell maintenance in telencephalic stem cell niches*. Neuron 39(6): 937-50.
- Maesawa, C., G. Tamura, et al. (1998). *Mutations in the human homologue of the Drosophila patched gene in esophageal squamous cell carcinoma*. Genes Chromosomes Cancer 21(3): 276-9.
- Magavi, S. S., B. R. Leavitt, et al. (2000). *Induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice*. Nature 405(6789): 951-5.
- Malatesta, P., M. A. Hack, et al. (2003). *Neuronal or glial progeny: regional differences in radial glia fate*. Neuron 37(5): 751-64.
- Mallon, B. S., H. E. Shick, et al. (2002). *Proteolipid promoter activity distinguishes two populations of NG2-positive cells throughout neonatal cortical development*. J Neurosci 22(3): 876-85.
- Marcelle, C., S. Ahlgren, et al. (1999). *In vivo regulation of somite differentiation and proliferation by Sonic Hedgehog*. Dev Biol 214(2): 277-87.
- Marigo, V., R. L. Johnson, et al. (1996a). *Sonic hedgehog differentially regulates expression of GLI and GLI3 during limb development*. Dev Biol 180(1): 273-83.
- Marigo, V., D. J. Roberts, et al. (1995). *Cloning, expression, and chromosomal location of SHH and IHH: two human homologues of the Drosophila segment polarity gene hedgehog*. Genomics 28(1): 44-51.
- Marigo, V. and C. J. Tabin (1996b). *Regulation of patched by sonic hedgehog in the developing neural tube*. Proc Natl Acad Sci U S A 93(18): 9346-51.
- Markakis, E. A., T. D. Palmer, et al. (2004). *Novel neuronal phenotypes from neural progenitor cells*. J Neurosci 24(12): 2886-97.
- Marshall, C. A., B. G. Novitsch, et al. (2005). *Olig2 directs astrocyte and oligodendrocyte formation in postnatal subventricular zone cells*. J Neurosci 25(32): 7289-98.
- Marshall, C. A., S. O. Suzuki, et al. (2003). *Gliogenic and neurogenic progenitors of the subventricular zone: who are they, where did they come from, and where are they going?* Glia 43(1): 52-61.
- Martens, D. J., R. M. Seaberg, et al. (2002). *In vivo infusions of exogenous growth factors into the fourth ventricle of the adult mouse brain increase the proliferation of neural progenitors*

- around the fourth ventricle and the central canal of the spinal cord. Eur J Neurosci 16(6): 1045-57.
- Martin, V., G. Carrillo, et al. (2001). *The sterol-sensing domain of Patched protein seems to control Smoothed activity through Patched vesicular trafficking.* Curr Biol 11(8): 601-7.
- Mastronardi, F. G., L. A. daCruz, et al. (2003). *The amount of sonic hedgehog in multiple sclerosis white matter is decreased and cleavage to the signaling peptide is deficient.* Mult Scler 9(4): 362-71.
- McCarthy, R. A., J. L. Barth, et al. (2002). *Megalin functions as an endocytic sonic hedgehog receptor.* J Biol Chem 277(28): 25660-7.
- McGarvey, T. W., Y. Maruta, et al. (1998). *PTCH gene mutations in invasive transitional cell carcinoma of the bladder.* Oncogene 17(9): 1167-72.
- McKay, R. (1997). *Stem cells in the central nervous system.* Science 276(5309): 66-71.
- McMahon, A. P., P. W. Ingham, et al. (2003). *Developmental roles and clinical significance of hedgehog signaling.* Curr Top Dev Biol 53: 1-114.
- Mehlen, P. (2003). *[Patched is a dependence receptor].* Med Sci 19(11).
- Menard, C., P. Hein, et al. (2002). *An essential role for a MEK-C/EBP pathway during growth factor-regulated cortical neurogenesis.* Neuron 36(4): 597-610.
- Methot, N. and K. Basler (2000). *Suppressor of fused opposes hedgehog signal transduction by impeding nuclear accumulation of the activator form of Cubitus interruptus.* Development 127(18): 4001-10.
- Methot, N. and K. Basler (2001). *An absolute requirement for Cubitus interruptus in Hedgehog signaling.* Development 128(5): 733-42.
- Miao, N., M. Wang, et al. (1997). *Sonic hedgehog promotes the survival of specific CNS neuron populations and protects these cells from toxic insult In vitro.* J Neurosci 17(15): 5891-9.
- Miller, M. W. and R. S. Nowakowski (1988). *Use of bromodeoxyuridine-immunohistochemistry to examine the proliferation, migration and time of origin of cells in the central nervous system.* Brain Res 457(1): 44-52.
- Ming, G. L. and H. Song (2005). *Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system.* Annu Rev Neurosci 28: 223-50.
- Ming, J. E., E. Roessler, et al. (1998). *Human developmental disorders and the Sonic hedgehog pathway.* Mol Med Today 4(8): 343-9.
- Mistretta, C. M., H. X. Liu, et al. (2003). *Cyclopamine and jervine in embryonic rat tongue cultures demonstrate a role for Shh signaling in taste papilla development and patterning: fungiform papillae double in number and form in novel locations in dorsal lingual epithelium.* Dev Biol 254(1): 1-18.
- Miura, H., Y. Kusakabe, et al. (2001). *Shh and Ptc are associated with taste bud maintenance in the adult mouse.* Mech Dev 106(1-2): 143-5.
- Miyata, T., A. Kawaguchi, et al. (2001). *Asymmetric inheritance of radial glial fibers by cortical neurons.* Neuron 31(5): 727-41.
- Miyazawa, K., T. Himi, et al. (2000). *A role for p27/Kip1 in the control of cerebellar granule cell precursor proliferation.* J Neurosci 20(15): 5756-63.
- Mo, R., A. M. Freer, et al. (1997). *Specific and redundant functions of Gli2 and Gli3 zinc finger genes in skeletal patterning and development.* Development 124(1): 113-23.
- Mohler, J. (1988). *Requirements for hedgehog, a segmental polarity gene, in patterning larval and adult cuticle of Drosophila.* Genetics 120(4): 1061-72.
- Mohler, J. and K. Vani (1992). *Molecular organization and embryonic expression of the hedgehog gene involved in cell-cell communication in segmental patterning of Drosophila.* Development 115(4): 957-71.

- Moreno-Lopez, B., C. Romero-Grimaldi, et al. (2004). *Nitric oxide is a physiological inhibitor of neurogenesis in the adult mouse subventricular zone and olfactory bulb.* J Neurosci 24(1): 85-95.
- Morrison, S. J. (2001). *Neuronal potential and lineage determination by neural stem cells.* Curr Opin Cell Biol 13(6): 666-72.
- Morrison, S. J. (2002). *Pten-uating neural growth.* Nat Med 8(1): 16-8.
- Morrow, T., M. R. Song, et al. (2001). *Sequential specification of neurons and glia by developmentally regulated extracellular factors.* Development 128(18): 3585-94.
- Morshead, C. M., B. A. Reynolds, et al. (1994). *Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells.* Neuron 13(5): 1071-82.
- Morshead, C. M. and D. van der Kooy (1992). *Postmitotic death is the fate of constitutively proliferating cells in the subependymal layer of the adult mouse brain.* J Neurosci 12(1): 249-56.
- Motoyama, J., J. Liu, et al. (1998). *Essential function of Gli2 and Gli3 in the formation of lung, trachea and oesophagus.* Nat Genet 20(1): 54-7.
- Munoz-Sanjuan, I., M. K. Cooper, et al. (2001). *Expression and regulation of chicken fibroblast growth factor homologous factor (FHF)-4 during craniofacial morphogenesis.* Dev Dyn 220(3): 238-45.
- Murone, M., A. Rosenthal, et al. (1999). *Sonic hedgehog signaling by the patched-smoothened receptor complex.* Curr Biol 9(2): 76-84.
- Nait-Oumesmar, B., L. Decker, et al. (1999). *Progenitor cells of the adult mouse subventricular zone proliferate, migrate and differentiate into oligodendrocytes after demyelination.* Eur J Neurosci 11(12): 4357-66.
- Nakashima, K., T. Takizawa, et al. (2001). *BMP2-mediated alteration in the developmental pathway of fetal mouse brain cells from neurogenesis to astrocytogenesis.* Proc Natl Acad Sci U S A 98(10): 5868-73.
- Nakatomi, H., T. Kuriu, et al. (2002). *Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors.* Cell 110(4): 429-41.
- Nakatsuji, Y. and R. H. Miller (2001). *Control of oligodendrocyte precursor proliferation mediated by density-dependent cell cycle protein expression.* Dev Neurosci 23(4-5): 356-63.
- Nery, S., H. Wichterle, et al. (2001). *Sonic hedgehog contributes to oligodendrocyte specification in the mammalian forebrain.* Development 128(4): 527-40.
- Noctor, S. C., A. C. Flint, et al. (2001). *Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex.* Nature 409(6821): 714-20.
- Nunes, M. C., N. S. Roy, et al. (2003). *Identification and isolation of multipotential neural progenitor cells from the subcortical white matter of the adult human brain.* Nat Med 9(4): 439-47.
- Nusslein-Volhard, C. and E. Wieschaus (1980). *Mutations affecting segment number and polarity in Drosophila.* Nature 287(5785): 795-801.
- Offield, M. F., T. L. Jetton, et al. (1996). *PDX-1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum.* Development 122(3): 983-95.
- Olsson, M., K. Campbell, et al. (1997). *Specification of mouse telencephalic and mid-hindbrain progenitors following heterotopic ultrasound-guided embryonic transplantation.* Neuron 19(4): 761-72.
- Oppenheim, R. W., S. Homma, et al. (1999). *Modulation of early but not later stages of programmed cell death in embryonic avian spinal cord by sonic hedgehog.* Mol Cell Neurosci 13(5): 348-61.

- Orentas, D. M., J. E. Hayes, et al. (1999). *Sonic hedgehog signaling is required during the appearance of spinal cord oligodendrocyte precursors*. Development 126(11): 2419-29.
- Pabst, O., R. Forster, et al. (2000). *NKX2.3 is required for MAdCAM-1 expression and homing of lymphocytes in spleen and mucosa-associated lymphoid tissue*. Embo J 19(9): 2015-23.
- Packer, M. A., Y. Stasiv, et al. (2003). *Nitric oxide negatively regulates mammalian adult neurogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A 100(16): 9566-71.
- Palma, V., D. A. Lim, et al. (2005). *Sonic hedgehog controls stem cell behavior in the postnatal and adult brain*. Development 132(2): 335-44.
- Palma, V. and A. Ruiz i Altaba (2004). *Hedgehog-GLI signaling regulates the behavior of cells with stem cell properties in the developing neocortex*. Development 131(2): 337-45.
- Palmer, T. D., J. Takahashi, et al. (1997). *The adult rat hippocampus contains primordial neural stem cells*. Mol Cell Neurosci 8(6): 389-404.
- Panchision, D. M. and R. D. McKay (2002). *The control of neural stem cells by morphogenic signals*. Curr Opin Genet Dev 12(4): 478-87.
- Park, H. L., C. Bai, et al. (2000). *Mouse Gli1 mutants are viable but have defects in SHH signaling in combination with a Gli2 mutation*. Development 127(8): 1593-605.
- Pasca di Magliano, M. and M. Hebrok (2003). *Hedgehog signalling in cancer formation and maintenance*. Nat Rev Cancer 3(12): 903-11.
- Pascual, O., E. Traiffort, et al. (2005). *Sonic hedgehog signalling in neurons of adult ventrolateral nucleus tractus solitarius*. Eur J Neurosci 22(2): 389-96.
- Pencea, V., K. D. Bingaman, et al. (2001). *Infusion of brain-derived neurotrophic factor into the lateral ventricle of the adult rat leads to new neurons in the parenchyma of the striatum, septum, thalamus, and hypothalamus*. J Neurosci 21(17): 6706-17.
- Pepinsky, R. B., P. Rayhorn, et al. (2000). *Mapping sonic hedgehog-receptor interactions by steric interference*. J Biol Chem 275(15): 10995-1001.
- Pepinsky, R. B., C. Zeng, et al. (1998). *Identification of a palmitic acid-modified form of human Sonic hedgehog*. J Biol Chem 273(22): 14037-45.
- Perron, M., S. Boy, et al. (2003). *A novel function for Hedgehog signalling in retinal pigment epithelium differentiation*. Development 130(8): 1565-77.
- Petersen, P. H., K. Zou, et al. (2002). *Progenitor cell maintenance requires numb and numbl like during mouse neurogenesis*. Nature 419(6910): 929-34.
- Picard-Riera, N., L. Decker, et al. (2002). *Experimental autoimmune encephalomyelitis mobilizes neural progenitors from the subventricular zone to undergo oligodendrogenesis in adult mice*. Proc Natl Acad Sci U S A 99(20): 13211-6.
- Picard-Riera, N., B. Nait-Oumesmar, et al. (2004). *Endogenous adult neural stem cells: limits and potential to repair the injured central nervous system*. J Neurosci Res 76(2): 223-31.
- Pietsch, T., A. Waha, et al. (1997). *Medulloblastomas of the desmoplastic variant carry mutations of the human homologue of Drosophila patched*. Cancer Res 57(11): 2085-8.
- Podlasek, C. A., D. H. Barnett, et al. (1999). *Prostate development requires Sonic hedgehog expressed by the urogenital sinus epithelium*. Dev Biol 209(1): 28-39.
- Porter, J. A., D. P. von Kessler, et al. (1995). *The product of hedgehog autoproteolytic cleavage active in local and long-range signalling*. Nature 374(6520): 363-6.
- Porter, J. A., K. E. Young, et al. (1996). *Cholesterol modification of hedgehog signaling proteins in animal development*. Science 274(5285): 255-9.
- Pourquie, O., M. Coltey, et al. (1993). *Control of dorsoventral patterning of somitic derivatives by notochord and floor plate*. Proc Natl Acad Sci U S A 90(11): 5242-6.
- Pownall, M. E., K. E. Strunk, et al. (1996). *Notochord signals control the transcriptional cascade of myogenic bHLH genes in somites of quail embryos*. Development 122(5): 1475-88.

- Price, M. A. and D. Kalderon (2002). *Proteolysis of the Hedgehog signaling effector Cubitus interruptus requires phosphorylation by Glycogen Synthase Kinase 3 and Casein Kinase 1*. Cell 108(6): 823-35.
- Pringle, N. P. and W. D. Richardson (1993). *A singularity of PDGF alpha-receptor expression in the dorsoventral axis of the neural tube may define the origin of the oligodendrocyte lineage*. Development 117(2): 525-33.
- Privat, A. (1977). *The ependyma and subependymal layer of the young rat: a new contribution with freeze-fracture*. Neuroscience 2(3): 447-57.
- Privat, A. and C. P. Leblond (1972). *The subependymal layer and neighboring region in the brain of the young rat*. J Comp Neurol 146(3): 277-302.
- Puelles, L., E. Kuwana, et al. (2000). *Pallial and subpallial derivatives in the embryonic chick and mouse telencephalon, traced by the expression of the genes *Dlx-2*, *Emx-1*, *Nkx-2.1*, *Pax-6*, and *Tbr-1**. J Comp Neurol 424(3): 409-38.
- Qi, Y., J. Cai, et al. (2001). *Control of oligodendrocyte differentiation by the *Nkx2.2* homeodomain transcription factor*. Development 128(14): 2723-33.
- Raff, M. C., R. H. Miller, et al. (1983). *A glial progenitor cell that develops in vitro into an astrocyte or an oligodendrocyte depending on culture medium*. Nature 303(5916): 390-6.
- Raffel, C., R. B. Jenkins, et al. (1997). *Sporadic medulloblastomas contain *PTCH* mutations*. Cancer Res 57(5): 842-5.
- Rakic, P. (2002a). *Adult neurogenesis in mammals: an identity crisis*. J Neurosci 22(3): 614-8.
- Rakic, P. (2002b). *Neurogenesis in adult primates*. Prog Brain Res 138: 3-14.
- Rallu, M., R. Machold, et al. (2002). *Dorsoventral patterning is established in the telencephalon of mutants lacking both *Gli3* and *Hedgehog* signaling*. Development 129(21): 4963-74.
- Ramalho-Santos, M., D. A. Melton, et al. (2000). *Hedgehog signals regulate multiple aspects of gastrointestinal development*. Development 127(12): 2763-72.
- Rao, M. S. (1999). *Multipotent and restricted precursors in the central nervous system*. Anat Rec 257(4): 137-48.
- Rao, M. S., M. Noble, et al. (1998). *A tripotential glial precursor cell is present in the developing spinal cord*. Proc Natl Acad Sci U S A 95(7): 3996-4001.
- Reifenberger, J., M. Wolter, et al. (1998). *Missense mutations in *SMOH* in sporadic basal cell carcinomas of the skin and primitive neuroectodermal tumors of the central nervous system*. Cancer Res 58(9): 1798-803.
- Reynolds, B. A., W. Tetzlaff, et al. (1992a). *A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes*. J Neurosci 12(11): 4565-74.
- Reynolds, B. A. and S. Weiss (1992b). *Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system*. Science 255(5052): 1707-10.
- Rice, R., E. Connor, et al. (2005). *Expression patterns of Hedgehog signalling pathway members during mouse palate development*. Gene Expr Patterns 13: 13.
- Richardson, W. D., H. K. Smith, et al. (2000). *Oligodendrocyte lineage and the motor neuron connection*. Glia 29(2): 136-42.
- Riddle, R. D., R. L. Johnson, et al. (1993). *Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA*. Cell 75(7): 1401-16.
- Rietze, R. L., H. Valcanis, et al. (2001). *Purification of a pluripotent neural stem cell from the adult mouse brain*. Nature 412(6848): 736-9.
- Robbins, D. J., K. E. Nybakken, et al. (1997). *Hedgehog elicits signal transduction by means of a large complex containing the kinesin-related protein *costal2**. Cell 90(2): 225-34.
- Roberts, D. J., D. M. Smith, et al. (1998). *Epithelial-mesenchymal signaling during the regionalization of the chick gut*. Development 125(15): 2791-801.
- Robertson, C. P., S. M. Gibbs, et al. (2001). *cGMP enhances the sonic hedgehog response in neural plate cells*. Dev Biol 238(1): 157-67.

- Roelink, H., A. Augsburger, et al. (1994). *Floor plate and motor neuron induction by vhh-1, a vertebrate homolog of hedgehog expressed by the notochord.* Cell 76(4): 761-75.
- Roessler, E. and M. Muenke (2003). *How a Hedgehog might see holoprosencephaly.* Hum Mol Genet(1): R15-25.
- Ross, S. E., M. E. Greenberg, et al. (2003). *Basic helix-loop-helix factors in cortical development.* Neuron 39(1): 13-25.
- Rowitch, D. H. (2004). *Glial specification in the vertebrate neural tube.* Nat Rev Neurosci 5(5): 409-19.
- Rowitch, D. H., S. J. B, et al. (1999). *Sonic hedgehog regulates proliferation and inhibits differentiation of CNS precursor cells.* J Neurosci 19(20): 8954-65.
- Ruiz i Altaba, A. (1999). *Gli proteins and Hedgehog signaling: development and cancer.* Trends Genet 15(10): 418-25.
- Ruiz I. Altaba, A., V. Palma, et al. (2002). *Hedgehog-Gli signalling and the growth of the brain.* Nat Rev Neurosci 3(1): 24-33.
- Ruppert, J. M., B. Vogelstein, et al. (1991). *The zinc finger protein GLI transforms primary cells in cooperation with adenovirus E1A.* Mol Cell Biol 11(3): 1724-8.
- Sanchez, P., A. M. Hernandez, et al. (2004). *Inhibition of prostate cancer proliferation by interference with SONIC HEDGEHOG-GLII signaling.* Proc Natl Acad Sci U S A 101(34): 12561-6.
- Schultze, B. and H. Korr (1981). *Cell kinetic studies of different cell types in the developing and adult brain of the rat and the mouse: a review.* Cell Tissue Kinet 14(3): 309-25.
- Schuermans, C. and F. Guillemot (2002). *Molecular mechanisms underlying cell fate specification in the developing telencephalon.* Curr Opin Neurobiol 12(1): 26-34.
- Seri, B., J. M. Garcia-Verdugo, et al. (2001). *Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus.* J Neurosci 21(18): 7153-60.
- Shen, Q., W. Zhong, et al. (2002). *Asymmetric Numb distribution is critical for asymmetric cell division of mouse cerebral cortical stem cells and neuroblasts.* Development 129(20): 4843-53.
- Shimazaki, T., T. Shingo, et al. (2001). *The ciliary neurotrophic factor/leukemia inhibitory factor/gp130 receptor complex operates in the maintenance of mammalian forebrain neural stem cells.* J Neurosci 21(19): 7642-53.
- Shimeld, S. M. (1999). *The evolution of the hedgehog gene family in chordates: insights from amphioxus hedgehog.* Dev Genes Evol 209(1): 40-7.
- Shou, J., P. C. Rim, et al. (1999). *BMPs inhibit neurogenesis by a mechanism involving degradation of a transcription factor.* Nat Neurosci 2(4): 339-45.
- Sisson, J. C., K. S. Ho, et al. (1997). *Costal2, a novel kinesin-related protein in the Hedgehog signaling pathway.* Cell 90(2): 235-45.
- Skoff, R. P. and P. E. Knapp (1991). *Division of astroblasts and oligodendroblasts in postnatal rodent brain: evidence for separate astrocyte and oligodendrocyte lineages.* Glia 4(2): 165-74.
- Smith, D. M., C. Nielsen, et al. (2000). *Roles of BMP signaling and Nkx2.5 in patterning at the chick midgut-foregut boundary.* Development 127(17): 3671-81.
- Sock, E., K. Schmidt, et al. (2001). *Idiopathic weight reduction in mice deficient in the high-mobility-group transcription factor Sox8.* Mol Cell Biol 21(20): 6951-9.
- Song, H. J., C. F. Stevens, et al. (2002). *Neural stem cells from adult hippocampus develop essential properties of functional CNS neurons.* Nat Neurosci 5(5): 438-45.
- Soula, C., C. Danesin, et al. (2001). *Distinct sites of origin of oligodendrocytes and somatic motoneurons in the chick spinal cord: oligodendrocytes arise from Nkx2.2-expressing progenitors by a Shh-dependent mechanism.* Development 128(8): 1369-79.

- Spassky, N., C. Goujet-Zalc, et al. (1998). *Multiple restricted origin of oligodendrocytes.* J Neurosci 18(20): 8331-43.
- Spassky, N., K. Heydon, et al. (2001). *Sonic hedgehog-dependent emergence of oligodendrocytes in the telencephalon: evidence for a source of oligodendrocytes in the olfactory bulb that is independent of PDGFR α signaling.* Development 128(24): 4993-5004.
- Spassky, N., C. Olivier, et al. (2000). *Single or multiple oligodendroglial lineages: a controversy.* Glia 29(2): 143-8.
- Stemple, D. L. and D. J. Anderson (1992). *Isolation of a stem cell for neurons and glia from the mammalian neural crest.* Cell 71(6): 973-85.
- Sterneck, E. and P. F. Johnson (1998). *CCAAT/enhancer binding protein beta is a neuronal transcriptional regulator activated by nerve growth factor receptor signaling.* J Neurochem 70(6): 2424-33.
- Stolt, C. C., P. Lommes, et al. (2003). *The Sox9 transcription factor determines glial fate choice in the developing spinal cord.* Genes Dev 17(13): 1677-89.
- Stolt, C. C., S. Rehberg, et al. (2002). *Terminal differentiation of myelin-forming oligodendrocytes depends on the transcription factor Sox10.* Genes Dev 16(2): 165-70.
- Stone, D. M., M. Hynes, et al. (1996). *The tumour-suppressor gene patched encodes a candidate receptor for Sonic hedgehog.* Nature 384(6605): 129-34.
- Strutt, H., C. Thomas, et al. (2001). *Mutations in the sterol-sensing domain of Patched suggest a role for vesicular trafficking in Smoothened regulation.* Curr Biol 11(8): 608-13.
- Sussel, L., O. Marin, et al. (1999). *Loss of Nkx2.1 homeobox gene function results in a ventral to dorsal molecular respecification within the basal telencephalon: evidence for a transformation of the pallidum into the striatum.* Development 126(15): 3359-70.
- Taipale, J., J. K. Chen, et al. (2000). *Effects of oncogenic mutations in Smoothened and Patched can be reversed by cyclopamine.* Nature 406(6799): 1005-9.
- Taipale, J., M. K. Cooper, et al. (2002). *Patched acts catalytically to suppress the activity of Smoothened.* Nature 418(6900): 892-7.
- Takata, Y., N. J. Webster, et al. (1992). *Intracellular signaling by a mutant human insulin receptor lacking the carboxyl-terminal tyrosine autophosphorylation sites.* J Biol Chem 267(13): 9065-70.
- Takebayashi, H., T. Ohtsuki, et al. (2002). *Non-overlapping expression of Olig3 and Olig2 in the embryonic neural tube.* Mech Dev 113(2): 169-74.
- Tanigaki, K., F. Nogaki, et al. (2001). *Notch1 and Notch3 instructively restrict bFGF-responsive multipotent neural progenitor cells to an astroglial fate.* Neuron 29(1): 45-55.
- Tashiro, S., T. Michiue, et al. (1993). *Structure and expression of hedgehog, a Drosophila segment-polarity gene required for cell-cell communication.* Gene 124(2): 183-9.
- Taylor, M. D., L. Liu, et al. (2002). *Mutations in SUFU predispose to medulloblastoma.* Nat Genet 31(3): 306-10.
- Teillet, M., Y. Watanabe, et al. (1998). *Sonic hedgehog is required for survival of both myogenic and chondrogenic somitic lineages.* Development 125(11): 2019-30.
- Tekki-Kessarlis, N., R. Woodruff, et al. (2001). *Hedgehog-dependent oligodendrocyte lineage specification in the telencephalon.* Development 128(13): 2545-54.
- Temple, S. (1989). *Division and differentiation of isolated CNS blast cells in microculture.* Nature 340(6233): 471-3.
- Temple, S. (2001). *The development of neural stem cells.* Nature 414(6859): 112-7.
- Testaz, S., A. Jarov, et al. (2001). *Sonic hedgehog restricts adhesion and migration of neural crest cells independently of the Patched- Smoothened-Gli signaling pathway.* Proc Natl Acad Sci U S A 98(22): 12521-6.
- Thayer, S. P., M. P. di Magliano, et al. (2003). *Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis.* Nature 425(6960): 851-6.

- The, I., Y. Bellaïche, et al. (1999). *Hedgehog movement is regulated through tout velu-dependent synthesis of a heparan sulfate proteoglycan.* Mol Cell 4(4): 633-9.
- Theil, T., G. Alvarez-Bolado, et al. (1999). *Gli3 is required for Emx gene expression during dorsal telencephalon development.* Development 126(16): 3561-71.
- Theodosiou, N. A., S. Zhang, et al. (1998). *slimb coordinates wg and dpp expression in the dorsal-ventral and anterior-posterior axes during limb development.* Development 125(17): 3411-6.
- Thibert, C., M. A. Teillet, et al. (2003). *Inhibition of neuroepithelial patched-induced apoptosis by sonic hedgehog.* Science 301(5634): 843-6.
- Thomaidou, D., M. C. Mione, et al. (1997). *Apoptosis and its relation to the cell cycle in the developing cerebral cortex.* J Neurosci 17(3): 1075-85.
- Thomas, J. L., N. Spassky, et al. (2000). *Spatiotemporal development of oligodendrocytes in the embryonic brain.* J Neurosci Res 59(4): 471-6.
- Tian, H., J. Jeong, et al. (2005). *Mouse Displ1 is required in sonic hedgehog-expressing cells for paracrine activity of the cholesterol-modified ligand.* Development 132(1): 133-42.
- Timsit, S., S. Martinez, et al. (1995). *Oligodendrocytes originate in a restricted zone of the embryonic ventral neural tube defined by DM-20 mRNA expression.* J Neurosci 15(2): 1012-24.
- Tole, S., C. W. Ragsdale, et al. (2000). *Dorsoventral patterning of the telencephalon is disrupted in the mouse mutant extra-toes(J).* Dev Biol 217(2): 254-65.
- Toma, J. G., H. El-Bizri, et al. (2000). *Evidence that helix-loop-helix proteins collaborate with retinoblastoma tumor suppressor protein to regulate cortical neurogenesis.* J Neurosci 20(20): 7648-56.
- Traiffort, E., D. Charytoniuk, et al. (1999). *Discrete localizations of hedgehog signalling components in the developing and adult rat nervous system.* Eur J Neurosci 11(9): 3199-214.
- Traiffort, E., D. A. Charytoniuk, et al. (1998). *Regional distribution of Sonic Hedgehog, patched, and smoothed mRNA in the adult rat brain.* J Neurochem 70(3): 1327-30.
- Traiffort, E., C. Dubourg, et al. (2004). *Functional characterization of sonic hedgehog mutations associated with holoprosencephaly.* J Biol Chem 279(41): 42889-97.
- Traiffort, E., K. L. Moya, et al. (2001). *High expression and anterograde axonal transport of aminoterminal sonic hedgehog in the adult hamster brain.* Eur J Neurosci 14(5): 839-50.
- Treier, M., S. O'Connell, et al. (2001). *Hedgehog signaling is required for pituitary gland development.* Development 128(3): 377-86.
- Tropepe, V., C. G. Craig, et al. (1997). *Transforming growth factor-alpha null and senescent mice show decreased neural progenitor cell proliferation in the forebrain subependyma.* J Neurosci 17(20): 7850-9.
- Tropepe, V., M. Sibilica, et al. (1999). *Distinct neural stem cells proliferate in response to EGF and FGF in the developing mouse telencephalon.* Dev Biol 208(1): 166-88.
- Trousse, F., E. Marti, et al. (2001). *Control of retinal ganglion cell axon growth: a new role for Sonic hedgehog.* Development 128(20): 3927-36.
- Uchida, N., D. W. Buck, et al. (2000). *Direct isolation of human central nervous system stem cells.* Proc Natl Acad Sci U S A 97(26): 14720-5.
- Uden, A. B., P. G. Zaphiropoulos, et al. (1997). *Human patched (PTCH) mRNA is overexpressed consistently in tumor cells of both familial and sporadic basal cell carcinoma.* Cancer Res 57(12): 2336-40.
- Vallstedt, A., J. M. Klos, et al. (2005). *Multiple dorsoventral origins of oligodendrocyte generation in the spinal cord and hindbrain.* Neuron 45(1): 55-67.
- van Den Brink, G. R., P. de Santa Barbara, et al. (2001). *Development. Epithelial cell differentiation--a Mather of choice.* Science 294(5549): 2115-6.

- van den Heuvel, M. and P. W. Ingham (1996). *smoothed encodes a receptor-like serpentine protein required for hedgehog signalling*. Nature 382(6591): 547-51.
- Villa, A., B. Navarro, et al. (2002). *Genetic perpetuation of in vitro expanded human neural stem cells: cellular properties and therapeutic potential*. Brain Res Bull 57(6): 789-94.
- Vogt, A., P. T. Chuang, et al. (2004). *Immunoprevention of basal cell carcinomas with recombinant hedgehog-interacting protein*. J Exp Med 199(6): 753-61.
- von Mering, C. and K. Basler (1999). *Distinct and regulated activities of human Gli proteins in Drosophila*. Curr Biol 9(22): 1319-22.
- Vorechovsky, I., O. Tingby, et al. (1997). *Somatic mutations in the human homologue of Drosophila patched in primitive neuroectodermal tumours*. Oncogene 15(3): 361-6.
- Wakamatsu, Y., T. M. Maynard, et al. (1999). *NUMB localizes in the basal cortex of mitotic avian neuroepithelial cells and modulates neuronal differentiation by binding to NOTCH-1*. Neuron 23(1): 71-81.
- Wallace, V. A. (1999). *Purkinje-cell-derived Sonic hedgehog regulates granule neuron precursor cell proliferation in the developing mouse cerebellum*. Curr Biol 9(8): 445-8.
- Wallace, V. A. and M. C. Raff (1999). *A role for Sonic hedgehog in axon-to-astrocyte signalling in the rodent optic nerve*. Development 126(13): 2901-9.
- Wallin, J., J. Wilting, et al. (1994). *The role of Pax-1 in axial skeleton development*. Development 120(5): 1109-21.
- Wang, S., A. Sdrulla, et al. (2001). *A role for the helix-loop-helix protein Id2 in the control of oligodendrocyte development*. Neuron 29(3): 603-14.
- Watkins, D. N., D. M. Berman, et al. (2003). *Hedgehog signalling within airway epithelial progenitors and in small-cell lung cancer*. Nature 422(6929): 313-7.
- Wechsler-Reya, R. J. and M. P. Scott (1999). *Control of neuronal precursor proliferation in the cerebellum by Sonic Hedgehog*. Neuron 22(1): 103-14.
- Wichterle, H., J. M. Garcia-Verdugo, et al. (1997). *Direct evidence for homotypic, glia-independent neuronal migration*. Neuron 18(5): 779-91.
- Williams, Z., V. Tse, et al. (2000). *Sonic hedgehog promotes proliferation and tyrosine hydroxylase induction of postnatal sympathetic cells in vitro*. Neuroreport 11(15): 3315-9.
- Wolpert, L. (1994). *Positional information and pattern formation in development*. Dev Genet 15(6): 485-90.
- Wolter, M., J. Reifemberger, et al. (1997). *Mutations in the human homologue of the Drosophila segment polarity gene patched (PTCH) in sporadic basal cell carcinomas of the skin and primitive neuroectodermal tumors of the central nervous system*. Cancer Res 57(13): 2581-5.
- Xie, J., R. L. Johnson, et al. (1997). *Mutations of the PATCHED gene in several types of sporadic extracutaneous tumors*. Cancer Res 57(12): 2369-72.
- Xie, J., M. Murone, et al. (1998). *Activating Smoothed mutations in sporadic basal-cell carcinoma*. Nature 391(6662): 90-2.
- Xu, Q., C. P. Wonders, et al. (2005). *Sonic hedgehog maintains the identity of cortical interneuron progenitors in the ventral telencephalon*. Development 132: 12.
- Ye, P., R. Bagnell, et al. (2003). *Mouse NG2+ oligodendrocyte precursors express mRNA for proteolipid protein but not its DM-20 variant: a study of laser microdissection-captured NG2+ cells*. J Neurosci 23(11): 4401-5.
- Ye, W., K. Shimamura, et al. (1998). *FGF and Shh signals control dopaminergic and serotonergic cell fate in the anterior neural plate*. Cell 93(5): 755-66.
- Yool, D. A., J. M. Edgar, et al. (2000). *The proteolipid protein gene and myelin disorders in man and animal models*. Hum Mol Genet 9(6): 987-92.

- Zappone, M. V., R. Galli, et al. (2000). *Sox2 regulatory sequences direct expression of a (beta)-geo transgene to telencephalic neural stem cells and precursors of the mouse embryo, revealing regionalization of gene expression in CNS stem cells*. Development 127(11): 2367-82.
- Zeng, X., J. A. Goetz, et al. (2001). *A freely diffusible form of Sonic hedgehog mediates long-range signalling*. Nature 411(6838): 716-20.
- Zhang, H. and R. H. Miller (1996). *Density-dependent feedback inhibition of oligodendrocyte precursor expansion*. J Neurosci 16(21): 6886-95.
- Zhang, L., V. L. Dawson, et al. (2005). *Role of nitric oxide in Parkinson's disease*. Pharmacol Ther 6: 6.
- Zhang, X. M., M. Ramalho-Santos, et al. (2001a). *Smoothed mutants reveal redundant roles for Shh and Ihh signaling including regulation of L/R symmetry by the mouse node*. Cell 106(2): 781-92.
- Zhang, X. M. and X. J. Yang (2001b). *Regulation of retinal ganglion cell production by Sonic hedgehog*. Development 128(6): 943-57.
- Zhong, W., M. M. Jiang, et al. (2000). *Mouse numb is an essential gene involved in cortical neurogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A 97(12): 6844-9.
- Zhou, Q. and D. J. Anderson (2002). *The bHLH transcription factors OLIG2 and OLIG1 couple neuronal and glial subtype specification*. Cell 109(1): 61-73.
- Zhou, Q., G. Choi, et al. (2001). *The bHLH transcription factor Olig2 promotes oligodendrocyte differentiation in collaboration with Nkx2.2*. Neuron 31(5): 791-807.
- Zhou, Q., S. Wang, et al. (2000). *Identification of a novel family of oligodendrocyte lineage-specific basic helix-loop-helix transcription factors*. Neuron 25(2): 331-43.
- Ziegler, A., D. J. Leffell, et al. (1993). *Mutation hotspots due to sunlight in the p53 gene of nonmelanoma skin cancers*. Proc Natl Acad Sci U S A 90(9): 4216-20.
- Zigova, T., V. Pencea, et al. (1998). *Intraventricular administration of BDNF increases the number of newly generated neurons in the adult olfactory bulb*. Mol Cell Neurosci 11(4): 234-45.

RESUME

ETUDE DE LA VOIE DE SIGNALISATION SONIC HEDGEHOG ET DU CONTROLE DE LA PROLIFERATION CELLULAIRE DANS LE CERVEAU MATURE DE RONGEURS

La voie de signalisation du morphogène **Sonic Hedgehog (Shh)** met en jeu des processus complexes étudiés, jusque là principalement, au cours du développement embryonnaire, où Shh est primordial pour le développement du tissu nerveux. Shh transmet son action via le complexe-récepteur Patched/Smoothed (Ptc/Smo) et le facteur de transcription Gli1, et interagit avec la glycoprotéine **Hip (Hedgehog interacting protein)** proposée comme antagoniste des protéines Hedgehog.

Des analyses biochimiques ont permis de montrer qu'en plus de la forme membranaire, une forme soluble de Hip existe, notamment dans le cerveau adulte, et inhibe la voie de signalisation Shh *in vitro*. Par ailleurs, une cartographie de Hip dans le cerveau de souris embryonnaire (E13.5) et adulte supporte l'hypothèse que Hip interviendrait dans la régulation négative de la voie Shh. Enfin l'expression de Hip dans des cellules exprimant l'enzyme de synthèse de l'oxide nitrique (NO) dans le cerveau mature suggère des interactions entre les voies de signalisation impliquant respectivement Hip et le neuromédiateur gazeux NO.

Pour étudier le rôle de Shh *in vivo* sur les progéniteurs neuraux du cerveau mature, la protéine recombinante ShhN a été injectée par stéréotaxie dans le ventricule latéral (VL) de souris adultes. En plus d'une forte activation de la voie Shh, reflétée par l'augmentation de la transcription de Ptc et Gli1 dans plusieurs régions cérébrales, telles que la zone sous ventriculaire (ZSV), le striatum, le septum latéral, le corps calleux et le cortex cérébral, le nombre de cellules ayant incorporé le marqueur de prolifération Bromodésoxyuridine (BrdU), est augmenté d'un facteur 3-4 dans le corps calleux et le cortex cérébral des souris ayant reçu la protéine Shh en comparaison avec des souris contrôles. Une telle augmentation n'a pas été observée dans la ZSV, une aire de neurogenèse majeure chez l'adulte. Par ailleurs, deux jours après l'injection de ShhN, un nombre significativement plus important de cellules en prolifération exprimant le protéoglycan membranaire NG2, marqueur des précurseurs oligodendrocytaires, est observé dans le cortex cérébral des souris ayant reçu la protéine ShhN.

Afin d'analyser l'effet à long terme de la surexpression continue de la protéine Shh, un vecteur adénoviral Ad5-hShh-ires-eGFP destiné à exprimer la forme humaine de la protéine Shh a été développé puis caractérisé *in vitro*. Ce vecteur a ensuite été délivré dans le VL de cerveau de souris adultes et quatre jours après, la protéine Shh a été détectée dans les régions épendymaire et subépendymaire. Vingt-six jours après l'injection du vecteur Ad5-hShh-ires-eGFP, la voie Shh est toujours active comme révélé par la présence de nombreuses cellules exprimant le transcrit Gli1 dans plusieurs aires cérébrales. Une augmentation de 50% du nombre de cellules BrdU+ exprimant le marqueur oligodendrogial dm20+ est détectée dans le cortex cérébral et le corps calleux des souris ayant reçu le vecteur adénoviral Ad5-hShh-ires-eGFP par rapport aux souris ayant reçu le vecteur contrôle Ad5-eGFP. Dans leur ensemble, ces résultats suggèrent la capacité de la voie Shh à stimuler les cellules oligodendrocytaires pré-matures dans plusieurs régions du cerveau de rongeurs adultes. La modulation de cette voie apparaît donc potentiellement intéressante pour le traitement des maladies affectant le lignage oligodendrocytaire.

Mots-clés : *Hedgehog interacting protein, oxide nitrique, transfert adénoviral oligodendrocytes, neurogenèse adulte*