



HAL
open science

Impacts des oxystérols par le biais des LXRs et du AhR dans la myélinisation

Ghjuvan'Ghjacumu Shackelford

► **To cite this version:**

Ghjuvan'Ghjacumu Shackelford. Impacts des oxystérols par le biais des LXRs et du AhR dans la myélinisation. Neurosciences [q-bio.NC]. Université René Descartes - Paris V, 2014. Français. NNT : 2014PA05P638 . tel-01470132

HAL Id: tel-01470132

<https://theses.hal.science/tel-01470132>

Submitted on 17 Feb 2017

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.

THESE

Pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université Paris Descartes

Spécialité : Neurosciences

Ecole Doctorale Médicament, Toxicologie, Chimie et Imageries (MTCI)

**Impacts des oxystérols par le biais des LXRs
et du AhR dans la myélinisation**

Présentée et soutenue publiquement le 17 juin 2014 par

Ghjuvan'Ghjacumu SHACKLEFORD

Equipe nouvelles thérapies de la myélinisation

INSERM UMR-S 1124

JURY :

Président : Pr Xavier COUMOUL
Rapporteur : Dr Brahim NAIT-OUMESMAR
Rapporteur : Dr Nicolas TRICAUD
Examineur : Dr Michaël SCHUMACHER
Directeur de Thèse : Pr Charbel MASSAAD

| | |
|--------------------------|----------|
| AVANT-PROPOS..... | 1 |
|--------------------------|----------|

| | |
|---------------------------|----------|
| INTRODUCTION | 5 |
|---------------------------|----------|

| | |
|--|-----------|
| <i>I. Le système nerveux</i> | <i>6</i> |
| 1. Les neurones | 6 |
| 2. Les cellules gliales | 9 |
| 2.1. Les cellules gliales du SNC | 9 |
| 2.2. Les cellules gliales du SNP | 13 |
| 3. La myélinisation | 16 |
| 3.1. Développement et différenciation des cellules de Schwann | 16 |
| 3.2. Les marqueurs exprimés au cours de chaque stade du développement glial..... | 18 |
| 3.2.1. De la crête neurale aux CS immatures..... | 18 |
| 3.2.2. Des CS immatures aux CS matures | 19 |
| 3.3. Les facteurs contrôlant le développement de la lignée schwannienne | 20 |
| 3.3.1. Le contrôle du développement de la glie à partir de la crête neurale | 21 |
| 3.3.2. Le contrôle de la survie des CS embryonnaires | 24 |
| 3.3.3. La régulation de la myélinisation | 25 |
| 4. Elaboration de la gaine de myéline par les cellules de Schwann..... | 27 |
| 5. Démyélinisation à la suite d'une lésion nerveuse..... | 28 |
| 6. Les pathologies du système nerveux périphérique | 30 |
| 6.1. La maladie de Charcot-Marie-Tooth..... | 30 |
| 6.1.1. Classification | 31 |
| 6.1.2. La maladie de Charcot-Marie-Tooth de type 1..... | 34 |
| 6.1.3. Symptômes | 35 |
| 6.1.4. Evolution de la maladie | 36 |
| 6.1.5. Pistes thérapeutiques | 37 |
| 6.2. Fragilité héréditaire des nerfs périphériques à la pression | 38 |
| <i>II. Régulation de la myélinisation :</i> | <i>39</i> |
| 1. La voie Wnt/ β -caténine | 40 |
| 1.1. La voie Wnt canonique | 41 |
| 1.2. Rôles de la voie Wnt/ β -caténine dans les oligodendrocytes | 42 |
| 1.2.1. Les ligands Wnt..... | 42 |
| 1.2.2. La β -caténine | 44 |
| 1.2.3. Les constituants de la voie Wnt/ β -caténine | 45 |
| Les constituants du complexe de dégradation de la β -caténine..... | 45 |
| LRP6, Dvl et TCF3..... | 47 |
| TCF4..... | 47 |
| 1.2.4. Les HDACs | 49 |
| 1.2.5. Contrôle du cycle cellulaire..... | 51 |
| 1.2.6. La spécification | 52 |
| 1.2.7. Le Lithium et autres inhibiteurs de la GSK3 β | 54 |
| 1.3. Rôles de la voie Wnt/ β -caténine dans les cellules de Schwann | 55 |
| 1.3.1. Expression des composants et activité de la voie Wnt/ β -caténine | 55 |
| 1.3.2. La voie Wnt/ β -caténine est essentielle à la myélinisation | 56 |
| 2. Les oxystérols..... | 57 |

| | | |
|--------|---|----|
| 2.1. | Formation des oxystérols | 58 |
| 2.1.1. | Les oxystérols de la chaîne latérale | 59 |
| 2.1.2. | Le 7 ketocholestérol | 59 |
| 2.2. | Rôle des oxystérols dans le système nerveux | 60 |
| 2.2.1. | Homéostasie du cholestérol | 60 |
| 2.2.2. | Effets toxiques des oxystérols | 61 |
| 2.2.3. | Effets bénéfiques des oxystérols | 62 |
| 2.3. | Implication des oxystérols dans les maladies neurodégénératives | 62 |
| 2.3.1. | Maladie d'Alzheimer | 62 |
| 2.3.2. | Sclérose en plaques | 64 |
| 2.3.3. | L'adrénoleucodystrophie | 65 |
| 2.4. | Les Liver X Receptors (LXRs) | 65 |
| 2.4.1. | Expression | 66 |
| 2.4.2. | Mode d'action..... | 66 |
| 2.4.3. | Rôles des LXRs..... | 67 |
| | Dans les tissus périphériques | 67 |
| | Dans le système nerveux central..... | 69 |
| | Rôle des LXR et du métabolisme du cholestérol dans le système nerveux périphérique..... | 70 |
| 3. | RIP140 | 71 |
| 3.1. | Historique | 71 |
| 3.2. | Le gène RIP140 | 72 |
| 3.3. | Structure protéique de RIP140..... | 73 |
| 3.3.1. | Les domaines répresseurs | 73 |
| 3.3.2. | Motifs de liaisons aux récepteurs nucléaires..... | 74 |
| 3.3.3. | Séquences de localisation nucléaire | 74 |
| 3.3.4. | Expression et localisation cellulaire | 75 |
| 3.4. | Régulation de l'expression de RIP140 | 76 |
| 3.4.1. | Régulation transcriptionnelle | 76 |
| 3.4.2. | Modifications post-traductionnelles | 76 |
| | La phosphorylation..... | 76 |
| | L'acétylation | 77 |
| | Méthylation | 77 |
| | La SUMOylation..... | 77 |
| | Conjugaison avec la Vitamine B6 | 77 |
| 3.5. | Rôle de RIP140 dans le contrôle de la transcription..... | 78 |
| 3.5.1. | Mécanismes transrépresseurs..... | 78 |
| | Les HDACs..... | 78 |
| | Les CtBPs | 79 |
| | Effecteurs inconnus..... | 79 |
| 3.5.2. | Mécanismes transactivateurs..... | 80 |
| 3.6. | Rôles biologiques de RIP140..... | 81 |
| 3.6.1. | Fertilité..... | 81 |
| 3.6.2. | Le tissu adipeux | 81 |
| 3.6.3. | Le muscle | 82 |
| 3.6.4. | Le foie | 82 |

| | | |
|---|--|-----|
| 3.6.5. | Absorption du glucose | 82 |
| 3.6.6. | Système nerveux central | 83 |
| 4. | AHR..... | 84 |
| 4.1. | Préambule | 84 |
| 4.2. | Les ligands d’AhR..... | 86 |
| 4.2.1. | Les ligands exogènes..... | 86 |
| 4.2.2. | Les ligands endogènes | 87 |
| 4.3. | Expression et régulation du AhR | 89 |
| 4.3.1. | Patron d’expression du AhR | 89 |
| 4.3.2. | Régulation de l’expression du AhR | 90 |
| 4.4. | Structure protéique du AhR | 91 |
| 4.4.1. | Le domaine bHLH..... | 91 |
| 4.4.2. | Le domaine PAS | 92 |
| 4.4.3. | Le domaine de transactivation (TAD) | 93 |
| 4.5. | Mécanisme d’action de AhR..... | 93 |
| 4.5.1. | Le complexe cytoplasmique | 94 |
| Les HSP90 | 94 | |
| XAP2 | 94 | |
| P23..... | 94 | |
| 4.5.2. | Le complexe nucléaire: interaction avec l’ARNT..... | 95 |
| 4.5.3. | L’activation par les ligands..... | 95 |
| 4.5.4. | XRE et séquences associées..... | 96 |
| 4.5.5. | Modifications post-traductionnelle | 97 |
| 4.5.6. | Inhibition du signal AhR | 97 |
| Le protéasome..... | 97 | |
| Le AhRR | 98 | |
| Présentation générale | 98 | |
| Mécanismes d’action..... | 99 | |
| 4.6. | Rôle du AhR dans le système nerveux..... | 100 |
| 4.6.1. | Phylogénie | 101 |
| Nematode..... | 102 | |
| Drosophile | 103 | |
| 4.6.2. | Effets de la TCDD sur le système nerveux des mammifères..... | 105 |
| Etudes comportementales | 105 | |
| Etudes épidémiologiques | 106 | |
| Effets de la TCDD sur les oligodendrocytes..... | 106 | |
| Effets de la TCDD sur le système nerveux périphérique | 107 | |

RESULTATS 110

| | |
|---|------------|
| <i>Interplay between LXR and Wnt/β-Catenin Signaling in the Negative Regulation of Peripheral Myelin Genes by Oxysterols</i> | <i>114</i> |
| <i>Liver X Receptors promote myelination and remyelination in the cerebellum.</i> | <i>116</i> |
| <i>Differential regulation of Wnt/beta-catenin signaling by Liver X Receptors in Schwann cells and oligodendrocytes.....</i> | <i>118</i> |
| <i>Implication du corégulateur RIP140 dans la myélinisation.....</i> | <i>120</i> |
| <i>I- Introduction</i> | <i>121</i> |
| <i>II. Matériels et Méthodes.....</i> | <i>122</i> |

| | |
|---|------------|
| <i>III. Résultats</i> | 126 |
| A. nRIP1a active l'expression des gènes de la myéline dans le poisson zèbre | 126 |
| B. nRIP1a n'influe pas sur la mise en place des axones et des CS | 127 |
| C. nRIP1a est important pour la formation de la gaine de myéline dans le SNP | 128 |
| D. Implication de RIP140 dans la répression des gènes de la myéline périphérique P0 et PMP22 dans les cellules de Schwann de souris <i>in vitro</i> | 129 |
| E. Implication de RIP140 dans l'activité des promoteurs de P0 et PMP22 <i>in vitro</i> | 130 |
| F. RIP140 ne participe pas à l'action répressive du 25OH exogène sur l'activité des promoteurs de P0 et PMP22 <i>in vitro</i> | 132 |
| <i>IV. Conclusions</i> | 133 |
| <i>Aryl Hydrocarbon Receptor is crucial for myelination process</i> | 134 |
| <i>Abstract</i> | 139 |
| <i>Introduction</i> | 140 |
| <i>Materials and Methods</i> | 142 |
| <i>Results</i> | 151 |
| DISCUSSION | 169 |
| 1- <i>Rôle des oxystérols oxydés sur la chaîne latérale dans le processus de myélinisation</i> : | 171 |
| 1.1- Dans le système nerveux périphérique | 171 |
| 1.2- Dans le système nerveux central..... | 173 |
| 2- <i>La β-caténine, un carrefour incontournable dans l'expression des gènes de la myéline : dialogue entre la voie Wnt/β-caténine et les oxystérols dans la myélinisation</i> :..... | 177 |
| 3- <i>Rôle de RIP140 dans la myélinisation</i> :..... | 181 |
| 3.1- Dans les cellules de Schwann de souris..... | 181 |
| 3.2- Chez le poisson zèbre | 182 |
| 4- <i>Rôle du AhR dans la myélinisation</i> | 184 |
| 5- <i>Conclusion générale</i> | 189 |
| Perspectives | 193 |
| ANNEXE | 200 |
| <i>The Activation of the WNT Signaling Pathway Is a Hallmark in Neurofibromatosis Type 1 Tumorigenesis</i> | 204 |
| BIBLIOGRAPHIE | 206 |

Liste des abréviations

AVANT-PROPOS

La gaine de myéline est essentielle pour le bon fonctionnement du système nerveux et surtout pour la propagation rapide, par un mode saltatoire, de l'influx nerveux. Cette gaine est apparue avec les vertébrés à mâchoires articulées (Zalc et al., 2008). Elle constitue une adaptation évolutive majeure du règne animal ayant permis un accroissement de la taille des individus et la mise en place du comportement de prédation.

La gaine de myéline est synthétisée par des cellules gliales hautement spécialisées : les oligodendrocytes dans le système nerveux central (SNC) et les cellules de Schwann dans le système nerveux périphérique. La formation de la gaine de myéline est un processus très complexe et finement régulé. Il démarre par une prolifération des cellules progénitrices, puis se poursuit par différentes étapes de différenciation aboutissant aux cellules myélinisantes. Les membranes plasmiques de ces cellules s'enroulent autour des axones. De par son origine membranaire, cette gaine est très riche en lipide, dont le cholestérol, et en protéines structurales spécifiques. L'expression de ces dernières est étroitement régulée. La moindre variation dans leur expression provoque des pathologies neurologiques invalidantes. En effet, dans le SNP, une altération dans les gènes codant pour PO ou PMP22 (les deux protéines majeurs de la myéline du SNP) entraîne des neuropathies sensitivomotrices comme la maladie de Charcot-Matje-Tooth (CMT). La forme la plus fréquente, la CMT1A est causée par la surexpression de la PMP22. Cela affecte la gaine de myéline provoquant un ralentissement de la conduction nerveuse et par la suite, un affaiblissement des nerfs et des muscles des extrémités des membres occasionnant des pertes de fonctions et un handicap d'aggravation

progressif. Malgré plusieurs essais cliniques, il n'existe actuellement aucun traitement permettant de guérir cette pathologie.

L'objectif de notre équipe est donc d'identifier de nouvelles voies de signalisation gouvernant la régulation de l'expression des protéines de la myéline P0 et PMP22 dans le SNP ainsi que MBP et PLP dans le SNC.

La gaine de myéline est richement pourvue en cholestérol. Les dérivés oxydés de ce composé, les oxystérols, sont d'importantes molécules de signalisation notamment impliquées dans plusieurs maladies neurodégénératives du SNC, comme la maladie d'Alzheimer (Papassotiropoulos et al., 2002) ou la sclérose en plaque (Leoni et al., 2002). Le dosage, par spectrométrie de masse, a révélé une grande quantité de ces composés oxydés dans les CS et les oligodendrocytes. Nous avons eu pour but de déterminer si ces oxystérols participaient aux processus de myélinisation du SNP et du SNC.

Afin de comprendre le rôle des oxystérols dans les processus de myélinisation du SNP et du SNC, nous nous sommes posés plusieurs questions :

-Quels sont les effets des oxystérols sur la régulation des gènes de la myéline périphérique et centrale ?

-Quels sont leurs mécanismes d'actions dans les CS et les oligodendrocytes ?

-Sont-ils capables d'induire la remyélinisation des axones des cellules de Purkinje après lésion par la lysolécithine ?

Au cours de ma thèse, notre équipe a démontré le rôle central joué par la voie Wnt/ β -caténine dans l'expression des gènes de la myéline du SNC et du SNP.

Nous sommes alors interrogés :

-Existe-t-il un dialogue entre la voie des oxystérols et la voie Wnt ?

-Ce dialogue est-il différent entre le SNP et le SNC ?

Nous avons démontré que le mécanisme d'action des oxystérols dans le SNP est inhabituel. En effet, classiquement lorsque les LXRs sont activés par les oxystérols, ils relarguent leurs corépresseurs, recrutent des coactivateurs afin de permettre l'expression de leurs gènes cibles. Or, dans le SNP, les LXRs liés par les oxystérols répriment l'expression des gènes de la myéline P0 et PMP22. RIP140 est un corégulateur capable de réprimer ou d'activer la transcription des gènes cibles quand le ligand se lie à son récepteur.

Nous nous sommes donc demandés :

-Est-ce que RIP140 joue un rôle dans l'expression des gènes de la myéline périphérique ?

-Est-ce que RIP140 est responsable du mécanisme d'action inédit du complexe LXR/oxystérols dans le SNP ?

Les oxystérols peuvent être classés en deux sous-groupe : ceux oxydés sur la chaîne carbonée latérale du cholestérol (par exemple le 25-hydroxycholestérol) et ceux oxydés sur les cycles A ou B (par exemple le 7-kétocholestérol (7KC)). Le 7KC est l'oxystérol majoritairement présent

dans le SNP et la CS. Il est connu pour moduler l'action du récepteur aux dioxines : le AhR. Ce récepteur a été très largement étudié dans un cadre toxicologique. Cependant ses rôles et ses ligands endogènes restent à ce jour encore assez méconnus. Chez les invertébrés, pourtant, il a été montré comme étant un élément important de l'arborisation dendritique des neurones du SNP.

Nous nous sommes donc posé plusieurs questions :

- Est-ce que l'AhR participe au processus de myélinisation du SNP ?

- Quel est son mécanisme d'action ?

- Y-a-t-il un dialogue entre le AhR et la voie Wnt/ β -caténine ?

- Quel est l'effet de la TCDD (dioxine la plus affine pour le AhR) sur l'expression des gènes de la myéline périphérique ?

INTRODUCTION

I. Le système nerveux

Le système nerveux est composé de deux parties :

- le système nerveux central (SNC) qui comprend le cerveau, le tronc cérébral, le cervelet et la moelle épinière
- le système nerveux périphérique (SNP) qui comprend les nerfs et les ganglions périphériques.

Les nerfs périphériques sont constitués par un regroupement de fibres nerveuses (axones), myélinisées ou amyéliniques, en fascicules (ou faisceaux). Chaque fascicule nerveux est entouré par le périnèvre qui est formé par une dizaine de couches de cellules périneurales aplaties et solidarisées par des jonctions intercellulaires. A l'intérieur de chaque fascicule, entre les fibres nerveuses, se trouve l'endonèvre, un tissu conjonctif lâche. L'ensemble des fascicules est maintenu par l'épinèvre, un tissu conjonctif dense (Figure 1).

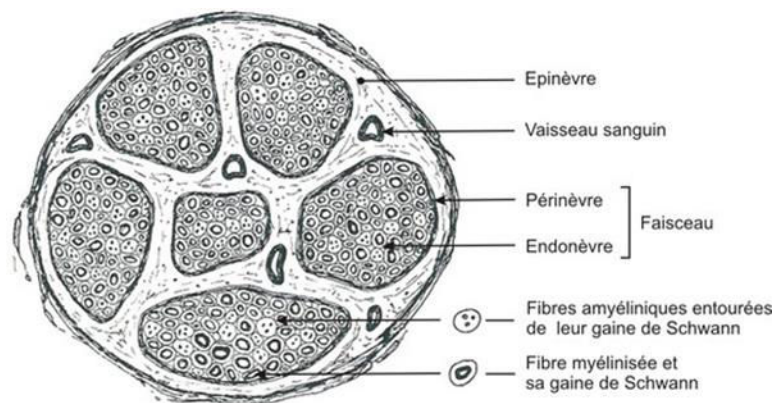


Figure 1 : Structure d'un nerf en coupe transversale (d'après <http://passeport.univ-lille1.fr>).

Le système nerveux est constitué de deux types cellulaires : les neurones et les cellules gliales (il est à noter que les cellules formant le tissu conjonctif sont également présentes dans le SNP).

1. Les neurones

Les neurones (cellules nerveuses) sont spécialisés dans la création et la propagation du potentiel d'action, impulsion électrique qui résulte de l'ouverture et de la fermeture de

certaines canaux ioniques (sodium (Na^+) et potassium (K^+)) voltages dépendants. Ces cellules peuvent synthétiser des neurotransmetteurs et des hormones.

Les neurones sont constitués de quatre régions ayant chacune des rôles bien spécifiques:

- un corps cellulaire ou péricaryon qui contient le noyau et qui est le site préférentiel de synthèse des protéines et des membranes neuronales
- les dendrites qui sont les prolongements du péricaryon convertissant les signaux chimiques provenant de terminaisons axonales d'autres neurones en impulsions électriques
- une longue extension cytoplasmique, l'axone, qui est le prolongement efférent spécialisé dans la conduction des potentiels d'action
- la terminaison axonale qui est une petite ramification de l'axone forme une synapse avec d'autres cellules.

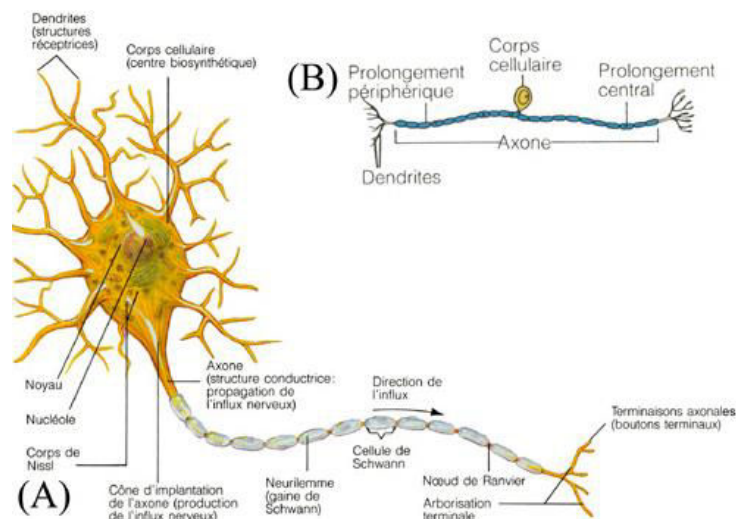


Figure 2 : Structure d'un neurone. En (A) est représenté un neurone multipolaire, en (B), un neurone bipolaire. (d'après <http://theses.ulaval.ca>)

Cette structure générale peut présenter des variations d'un neurone à l'autre. On distingue ainsi d'importantes variabilités de formes (étoilée, fusiforme, conique, polyédrique, sphérique, pyramidale) et de tailles (petit, moyen, grand ou géant) du corps cellulaire. Les prolongements sont de nombres et de tailles variables. Ainsi, les neurones du SNC ont des dendrites extrêmement longues avec des ramifications complexes pour leur permettre de

former des synapses avec un grand nombre d'autres neurones et d'en recevoir les signaux. Certains axones peuvent, par exemple, faire leurs synapses directement sur le corps cellulaire ou même sur l'axone d'un autre neurone.

Le dialogue entre les neurones se fait par l'intermédiaire des synapses. Il en existe 2 sortes. Les synapses électriques et les synapses chimiques. Dans le premier type, les neurones adjacents sont reliés par des jonctions communicantes (GAP jonctions) permettant la propagation directe du potentiel d'action. Ces synapses sont surtout présentes chez les invertébrés. Chez les vertébrés, la majorité des synapses sont de type chimique. L'information sera transmise par des neurotransmetteurs qui sont sécrétés par l'extrémité axonale (axone présynaptique) dans la fente synaptique et qui interagissent avec leurs récepteurs spécifiques, situés sur la membrane postsynaptique. La fixation du neurotransmetteur sur son récepteur induit une dépolarisation de la membrane du neurone postsynaptique qui va s'étendre le long de la dendrite vers le péricaryon puis de ce dernier vers l'axone et induire au niveau d'une autre synapse la sécrétion de neurotransmetteurs. En fonction de la nature du neurotransmetteur (excitateur ou inhibiteur), il y aura une dépolarisation ou une hyperpolarisation membranaire.

On distingue différents types de neurones selon que l'on choisisse le critère fonctionnel ou morphologique.

D'un point de vue fonctionnel :

- les neurones sensoriels reçoivent les messages des récepteurs sensoriels et les transmettent au SNC
- les neurones moteurs conduisent la commande motrice du cortex à la moelle épinière ou de la moelle aux muscles
- des interneurones connectent entre eux différents neurones.

Selon le critère morphologique, basé sur le nombre de prolongements qui partent du corps cellulaire, on distingue :

- les neurones pseudo-unipolaires qui ont un court prolongement qui se subdivise rapidement en deux, l'un faisant office de dendrite, l'autre d'axone
- les neurones multipolaires qui ont de courtes dendrites émanant du corps cellulaire et un long axone

- les neurones bipolaires qui ont deux prolongements principaux de longueur similaire.

2. Les cellules gliales

Les cellules gliales sont bien plus que des cellules de soutien (rôle qui leur a longtemps été dévolu) car elles participent au développement et au fonctionnement physiologique du système nerveux. Les cellules gliales sont très fortement majoritaires au sein du système nerveux (90%) et peuvent être classées en deux sous-parties : la microglie et la macroglie. Les cellules microgliales sont spécifiques du SNC, elles représentent 5 à 25% des cellules du cerveau. Elles participent à la défense immunitaire du cerveau, d'une part en éliminant par phagocytose les débris cellulaires, d'autre part en permettant la présentation de l'antigène et la sécrétion de différents facteurs trophiques ou toxiques comme les cytokines, les facteurs de croissance ou les radicaux libres. Leur rôle va bien au-delà de celui de sentinelles immunitaires du SNC, elles participent à la neuroprotection et influencent également la régénération et la neurogénèse. Les cellules macrogliales, quant à elles, sont présentes à la fois dans le SNC (astrocytes, oligodendrocytes et épendymocytes) et le SNP (cellules de Schwann et cellules satellites).

2.1. Les cellules gliales du SNC

Les **épendymocytes** forment un pseudo-épithélium simple délimitant les différentes cavités du SNC. Ces cellules sont aussi responsables de la synthèse et de la circulation du liquide céphalo-rachidien (LCR).

Les **astrocytes** sont de loin les cellules les plus nombreuses. De forme étoilée, ils assurent un support mécanique et trophique aux neurones. Ils jouent un rôle nourricier, assurent l'homéostasie du milieu extracellulaire, contrôlent le pH et la concentration en neurotransmetteurs.

On distingue les astrocytes de type I en contact avec les capillaires sanguins et les astrocytes de type II qui sont étroitement associés aux synapses empêchant ainsi toute fuite de neurotransmetteur. Par ailleurs, ils participent à l'élimination de déchets de toutes sortes en les reversant dans les capillaires sanguins.

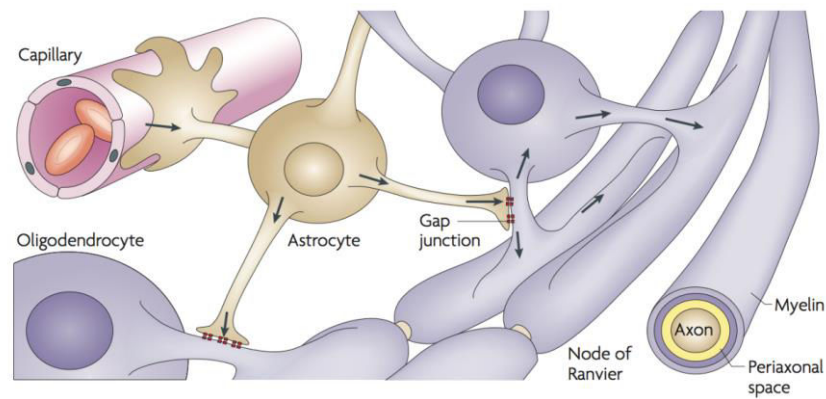


Figure 3 : Partenaires gliaux du SNC. Les oligodendrocytes myélinisent les axones. Ils sont en contact étroit avec les astrocytes par l'intermédiaire de jonctions gap. Ces derniers établissent le contact avec la barrière hémato-encéphalique (Nave, 2010).

Les **oligodendrocytes** synthétisent la gaine de myéline entourant les axones de nombreux neurones. La gaine de myéline est formée par l'enroulement en spirale des extensions plasmiques des cellules gliales autour d'un axone, suivi de l'extrusion du cytoplasme et de la compaction des différentes couches membranaires. Cette structure est une évolution majeure car elle permet d'augmenter la vitesse de conduction de l'influx nerveux sans pour autant augmenter le diamètre axonal comme chez les céphalopodes. La gaine de myéline recouvre et isole des segments d'axones concentrant ainsi les canaux sodiques voltage dépendant dans des régions discontinues de l'axone : les nœuds de Ranvier. Ceci permet une propagation dite « saltatoire » du potentiel d'action d'un nœud de Ranvier à l'autre. D'un point de vue fonctionnel, cette propagation équivaut à augmenter le diamètre axonal d'un facteur 100. Sans cette évolution, notre colonne vertébrale aurait donc fait 1 mètre de diamètre (Oguievetskaia et al., 2005). La gaine de myéline est riche en lipides, particulièrement en glycosphingolipides et en cholestérol. Ce dernier est essentiel à la myélinisation. En effet, les souris dont les oligodendrocytes ne synthétisent pas de cholestérol présentent un retard de myélinisation qui peut être en partie compensé par un apport de cholestérol exogène (Saher et al., 2005).

Les différentes protéines de la myéline présentent des localisations et des proportions différentes dans le SNC et le SNP.

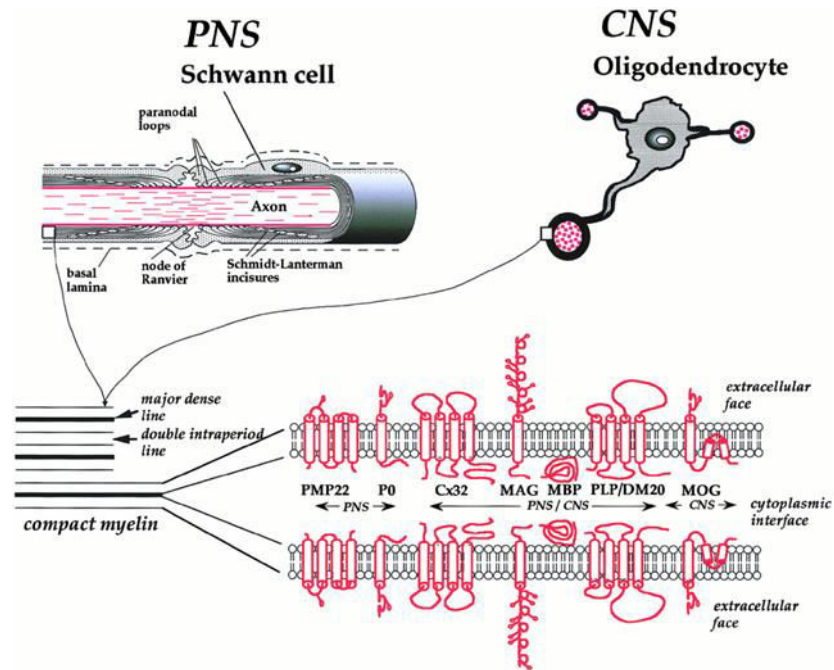


Figure 4 : Les protéines majeures de la gaine de myéline synthétisée par les oligodendrocytes et les cellules de Schwann. Ces protéines sont fondamentales pour le maintien de l'architecture et de la compaction de la gaine de myéline du SNC et du SNP (Baumann and Pham-Dinh, 2001).

Dans le SNC, les principales protéines de la myéline synthétisées par les oligodendrocytes sont la Myelin Proteolipid Protein (PLP/DM-20) et la Myelin Basic Protein (MBP). Elles constituent à elles seules 80% des protéines totales (Figure 4). Dans des proportions nettement moins abondantes, on retrouve la Myelin-Associated Glycoprotein (MAG), la Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein (MOG) ou encore 2':3'-Cyclic Nucleotide 3'-Phosphodiesterase (CNP) et la connexine 32 (Cx32). Leurs localisations sub-cellulaires montrent des répartitions très spécifiques.

La **PLP** représente près de la moitié de la myéline du SNC. L'épissage alternatif est responsable de deux formes de la protéine. La plus longue, PLP, est exprimée majoritairement dans le SNC. La plus courte, DM-20, est tronquée d'une boucle de 35 acides aminés (AA) normalement exposée à la face cytoplasmique et indispensable aux bonnes compaction et stabilité de l'architecture multilamellaire. DM-20 semble être la forme ancestrale de la PLP et l'apparition de cette boucle de 35 AA pourrait dater de 300 millions d'années et être apparue chez les amphibiens (Stecca et al., 2000). Elle est aussi exprimée dans les tubes séminifères, les cellules myocardiques, le thymus et la rate. Ces deux isoformes ne semblent pas être interchangeables

car l'invalidation par transgénèse de l'isoforme spécifique de PLP chez la souris n'est pas entièrement compensée (Spörkel et al., 2002).

Le gène codant ces protéines est localisé sur le chromosome X chez l'homme et la souris. Il mesure 45kb et est composé de 7 exons. La PLP est une protéine hautement conservée chez les mammifères (pas plus d'un ou deux résidus différents entre les espèces). Ainsi, les formes humaines et murines présentent une homologie de séquence de 100%. La protéine PLP est formée de 4 hélices α hydrophobes formant des domaines transmembranaires, de 2 domaines extracellulaires et de 3 domaines cytoplasmiques (comprenant les extrémités NH₂ et COOH). De plus, elle possède des modifications covalentes puisque 6 acides gras (seulement 4 pour DM-20) lui sont ajoutés sur des résidus de cystéine par un mécanisme autocatalytique post-transcriptionnel (Bizzozero et al., 1987).

L'invalidation de la PLP chez la souris démontre la formation d'une myéline compacte par les oligodendrocytes. Cependant, l'ultrastructure de la myéline montre une « condensation des lignes intrapériodiques » corrélée avec une réduction de sa stabilité (Boison et al., 1995). Ainsi, la PLP et sa boucle cytoplasmique de 35 AA permettent de stabiliser les jonctions membranaires après compaction de la myéline (Klugmann et al., 1997).

Des mutations dans le gène PLP provoquent chez l'homme la maladie de Pelizaeus-Merzbacher (PMD), une pathologie du SNC qui affecte la coordination, les fonctions motrices et intellectuelles. La PMD fait partie d'un groupe de maladies génétiques, appelées les leucodystrophies, qui affectent la myéline. La cause la plus courante de la PMD est la surexpression de la PLP par duplication du gène mais elle peut aussi être due à une perte totale de l'expression de la PLP (délétion entière du gène ou mutation non sens au début de la séquence codante) ou encore à des mutations ponctuelles (Garbern, 2007).

La **MBP** représente 30% des protéines de la myéline du SNC. Les deux isoformes majeures de la MBP chez l'Homme font respectivement 18,5 et 17,2 kDa contre 18,5 et 14 kDa chez la souris, constituant 95% des MBPs. Le gène codant les protéines MBP est localisé en 18q22 et mesure 45 kb dans l'espèce humaine. Celui de la souris est également localisé sur le chromosome 18 et mesure 32 kb. Les isoformes de MBP proviennent d'un épissage alternatif du gène de la MBP qui contient 7 exons. Chez la souris, il existe au moins 7 transcrits et d'autres variants d'épissage sont aussi exprimés pendant l'embryogenèse. Elle est la seule protéine fondamentale à la structuration de l'architecture de la myéline du SNC. Le modèle

de souris Shiverer qui présente une délétion naturelle d'une grande part du gène codant pour la protéine MBP, ne possède pratiquement pas de myéline compacte dans le SNC (Readhead et al., 1990). Le rat Long Evans Shaker, portant une mutation de MBP entraînant une transcription aberrante, ne possède pas non plus de myéline compacte dans le SNC (Carré et al., 2002). La protéine MBP est également exprimée dans le SNP, mais en plus faible proportion. Toutefois, elle n'est pas nécessaire à la constitution de la gaine de myéline du fait de l'action des autres protéines de la myéline périphérique telles que Myelin Protein Zero (MPZ ou P0) et Peripheral Myelin Protein 22 kD (PMP22) (Martini and Schachner, 1997).

2.2. Les cellules gliales du SNP

Les **cellules satellites** entourent le soma des neurones sensoriels et autonomes au niveau des ganglions. Ces cellules assurent la fonction de "charpente" et également de nutrition des neurones.

Les **cellules de Schwann (CS)** sont les cellules myélinisantes. A la différence des oligodendrocytes du SNC qui myélinisent plusieurs axones, une cellule de Schwann ne synthétise qu'une gaine par axone (Figure 4 et 5).

Les CS entretiennent des relations étroites avec les neurones en participant à leur développement et à leur fonctionnement. Elles établissent un dialogue avec les neurones en développement par l'intermédiaire de facteurs neurotrophiques et en constituant un support, la matrice extracellulaire. A la manière des oligodendrocytes du SNC, les CS synthétisent la gaine de myéline indispensable à la conduction saltatoire et rapide de l'influx nerveux.

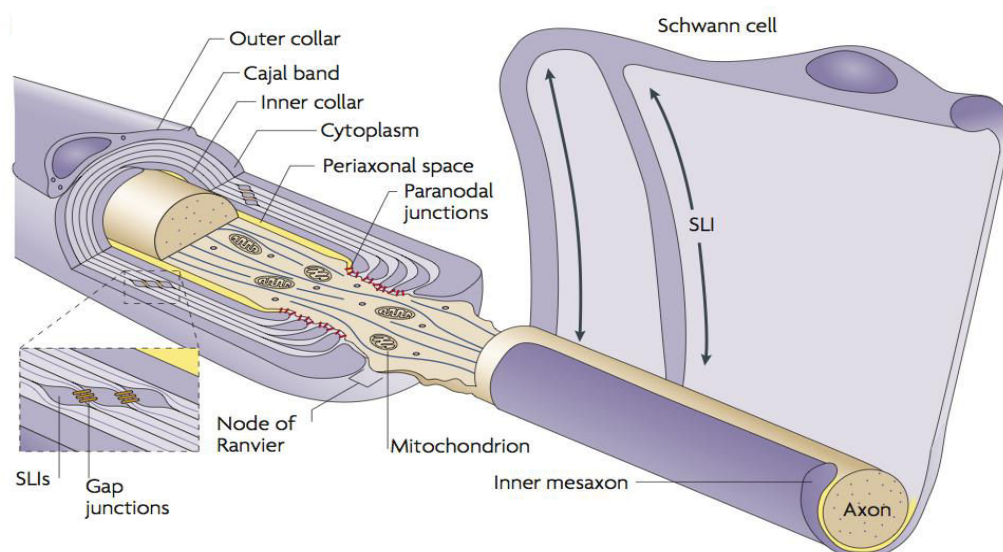


Figure 5 : Cellule de Schwann formant une gaine de myéline. La myéline compacte (en violet clair) sert d'isolant tandis que la partie non compacte (violet foncé) est en continuité avec le cytoplasme de la cellule gliale permettant d'amener les nutriments au plus près du périaxone (jaune). Les incisions de Schmidt-Lanterman (SLI) sont liées par des jonction gap quand elles sont superposées (Nave, 2010).

Enfin, les CS favorisent la repousse axonale à la suite d'une lésion. Après s'être différenciées, elles peuvent se multiplier et créer un environnement favorable et adapté à la repousse puis à la remyélinisation.

La myéline du SNP comme celle du SNC possède certaines protéines spécifiques telles la myelin protein zero (P0 ou MPZ) et la peripheral myelin protein 22 (PMP22).

La **P0** représente 50% des protéines de la myéline périphérique. Le gène codant pour P0 est localisé sur le chromosome 1 en position 1q22-q23 chez l'Homme. Il comporte 6 exons répartis sur 7kb. Son expression est spécifique des CS matures. Sa séquence présente 95% d'homologie entre l'Homme et le rat (Hayasaka et al., 1993). Ce gène code pour une protéine de 219 AA, qui possède un domaine extracellulaire, un domaine transmembranaire unique et un domaine cytoplasmique (Uyemura et al., 1995). Elle fait partie d'une large famille de protéines d'adhésion ayant des domaines immunoglobines (Ig)-like (Lemke and Axel, 1985). De très nombreuses expériences ont montré l'implication de la protéine P0 dans le maintien de l'architecture, l'adhérence et la compaction de la gaine de myéline. Les recombinaisons homologues effectuées chez la souris en vue d'inactiver le gène P0 provoquent l'hypomyélinisation des axones et d'importants troubles de la coordination motrice (Giese et al., 1992). Des études sur les cellules CHO (Chinese Hamster Ovary) ont montré que P0 peut agir comme une molécule d'adhésion homophile par l'intermédiaire de son domaine extracellulaire (Filbin et al., 1999), comme les autres membres de la superfamille des immunoglobulines. La délétion d'une séquence de 14 AA dans le domaine cytoplasmique de P0 abolit sa fonction adhésive. Cette séquence contient un motif cible (RSTK) de la Protéine Kinase C (PKC). Cette dernière et sa protéine associée: le récepteur de la kinase C activée (RACK1) sont co-immunoprécipitées dans les cellules exprimant P0 sauvage mais pas dans celles où P0 est mutée dans cette séquence de 14 AA. Un patient atteint de Charcot-Marie-Tooth (CMT) portant une mutation de P0 au niveau du domaine cible de la phosphorylation par la PKC a été identifié. L'ensemble de ces résultats suggère que la phosphorylation par PKC

est importante pour la régulation de l'adhésion de PO et donc pour la bonne conformation de la gaine de myéline (Xu et al., 2001).

La **PMP22** représente environ 5% des protéines de la myéline périphérique. C'est une petite glycoprotéine hydrophobe qui est principalement exprimée dans les CS comme composant de la myéline du SNP. De nombreux travaux de génétique moléculaire ont révélé que les mutations, délétions et duplications touchant la PMP22 sont responsables de la forme la plus courante de la maladie démyélinisante de Charcot-Marie-Tooth, la CMT1A (Berger et al., 2002) mais aussi d'autres neuropathies héréditaires telles que le syndrome Dejerine-Sottas et HNPP (Hereditary Neuropathy with liability to Pressure Palsies). Chez l'Homme, le gène est localisé sur le chromosome 17 (sur le chromosome 11 chez la souris) et code pour une protéine de AA et de 22kDa composée de 4 domaines transmembranaires et 2 domaines extracellulaires. L'ARNm de PMP22 est majoritairement exprimé dans le SNP, au niveau des nerfs sciatiques, mais également, dans de faibles proportions, dans le SNC. Les séquences humaines et murines présentent 86% d'homologie.

A la suite d'une lésion nerveuse, l'expression de PMP22 décroît très rapidement dans la partie distale et est fortement induite lors de la régénération. La fonction de la protéine est assez mal connue. Plusieurs études ont suggéré un rôle de PMP22 dans le contrôle de la prolifération et de l'apoptose des CS (Jetten and Suter, 2000). La majeure partie des connaissances concernant la fonction de PMP22 est issue de son implication dans les maladies dégénératives. Comme souvent, l'étude de souris mutantes, les souris Trembler (Tr), a permis de déterminer la fonction de la protéine. La mutation Tr affecte un résidu localisé dans le dernier domaine hydrophobe de la protéine et engendre un défaut dans le trafic cellulaire de la protéine qui entraîne une hypomyélinisation ainsi qu'une prolifération des CS et une réduction de la conduction nerveuse (Suter et al., 1992a). La mutation Tr-J concerne, elle, un résidu du premier domaine hydrophobe et affecte aussi le trafic cellulaire de la protéine. Les symptômes sont les mêmes que ceux de la souris Tr mais ils sont moins prononcés (Suter et al., 1992b). Des souris (Perea et al., 2001) et des rats (Sereda et al., 1996) possédant des copies supplémentaires de PMP22 ont été générés. Ces animaux développent des phénotypes très proches de la CMT1A. Ceci prouve qu'une augmentation de l'expression de PMP22 est suffisante pour causer un défaut de myéline dans le SNP. Les souris PMP22^{-/-}, quant à elles, se développent normalement jusqu'à la deuxième semaine où elles présentent alors des

difficultés de déplacement associées avec une hypermyélinisation du SNP (Adlkofer et al., 1995).

3. La myélinisation

3.1. Développement et différenciation des cellules de Schwann

Les CS sont originaires des cellules souches multipotentes de la crête neurale également à l'origine des neurones et des mélanocytes (Jessen and Mirsky, 2005a). Au cours de la neurulation, la plaque neurale se situant sur la face dorsale de l'embryon s'invagine et forme le tube neural par fusion des bordures. Les cellules de la crête neurale débutent leur migration dans deux directions distinctes. Latéralement, elles donneront naissance aux mélanocytes (Figure 6, flèche 1) et ventralement, elles donneront les neurones des ganglions sensitifs (Figure 6, flèche 2), les neurones autonomes et la glie (Figure 6, flèche 3).

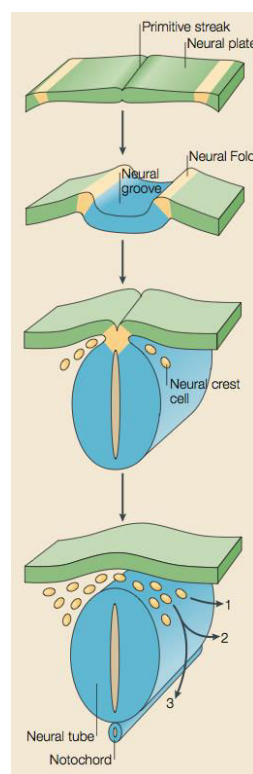


Figure 6 : Schéma de migration des cellules de la crête neurale. Au cours de la neurulation, la plaque neurale s'invagine, forme un sillon, les bordures fusionnent pour donner le tube neural. Puis, les cellules de la crête neurale se détachent et débutent leur migration (Jessen and Mirsky, 2005).

A chaque étape de leur développement, les cellules de la lignée schwannienne nouent des relations spécifiques avec les cellules environnantes et en particulier les neurones. Ainsi, les cellules de la crête neurale migrent tout le long de la matrice extracellulaire, puis les précurseurs des CS et les CS immatures établissent des contacts étroits avec les neurones (axones). Les relations entre ces différentes composantes se font par l'intermédiaire de protéines de signalisation qui varient au fil du développement.

Ces cellules souches subissent des maturations et des différenciations successives pour donner des cellules myélinisantes matures. Les cellules souches de la crête neurale entrent en différenciation et donnent après 12 à 13 jours de vie embryonnaire (E) chez la souris (E14-15 chez le rat) des précurseurs de CS. A ce stade, les cellules nerveuses sont indispensables à la survie des précurseurs. Ces derniers migrent le long des neurones et se différencient ensuite, entre E13 et E15 (E15-E17 chez le rat), en CS immature. Elles dépendent des neurones pour poursuivre leur différenciation. À la naissance, et en fonction du diamètre de l'axone associé, les CS embryonnaires s'engagent dans deux voies de différenciation distinctes. Pour un diamètre axonal de 0,8 à 1 μm , les CS embryonnaires s'orientent vers le phénotype myélinisant pour former une gaine de myéline en passant par un stade intermédiaire de maturation, celui des CS prémyélinisantes. Pour un diamètre inférieur, les CS embryonnaires deviennent des CS non-myélinisantes dont les extensions cytoplasmiques entourent plusieurs axones de manière individuelle (les axones sont ainsi isolés les uns des autres) et forment les fibres de Remak. Les CS myélinisantes matures sont désormais autonomes pour leur survie cellulaire et cessent leur prolifération (Sherman and Brophy, 2005). Les CS sont douées d'une forte plasticité. A la suite d'une lésion, les CS matures peuvent se dédifférencier jusqu'à un stade CS pseudo immatures puis proliférer de nouveau (Figure 7).

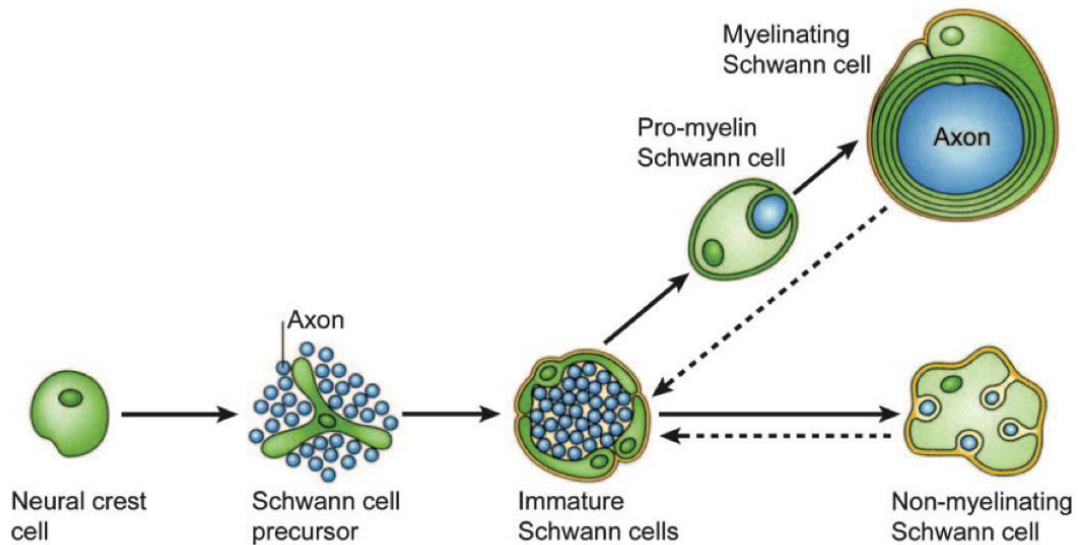


Figure 7 : Schéma du processus de maturation des cellules de Schwann. Le développement embryonnaire des CS comprend plusieurs stades : les cellules de la crête neurale, les précurseurs de CS et enfin les CS immatures. Le destin de ces cellules dépend du diamètre de l'axone à laquelle elles sont associées et de facteurs neuronaux. La différenciation est réversible lorsque l'interaction neurone/Schwann est perdue (flèches en pointillé) (Jessen and Mirsky, 2005).

3.2. Les marqueurs exprimés au cours de chaque stade du développement glial

3.2.1. De la crête neurale aux CS immatures

Chaque stade du développement de la lignée schwannienne se caractérise par l'expression des marqueurs de différenciation (Jessen and Mirsky, 2005) qui peuvent être regroupés en 5 catégories (Figure 8) :

- Les marqueurs dont l'expression est maintenue à chaque stade du développement de la glie, comme SRY (Sex Determining Region Y) box 10 (Sox10).
- Les marqueurs exprimés transitoirement au cours des premiers stades. Ainsi, Activator Protein 2 α (AP2 α) est exprimé dans les cellules de la crête neurale et les précurseurs des CS, mais inhibé dans les CS immatures.
- Un gène exprimé uniquement par les précurseurs des CS, cadherin 19.

- Les marqueurs présents dans les précurseurs des CS et dans les CS immatures, mais absents dans les cellules de la crête neurale, comme brain fatty acid-binding protein (BFABP), l'ARNm de P0 et desert hedgehog (DHH). Ces marqueurs indiquent le passage du premier stade du lignage schwannien, qui voit les cellules de la crête neurale se différencier en précurseurs de CS.
- Les marqueurs spécifiques aux CS embryonnaires, comme la GFAP (Glial fibrillary acidic protein), S100 et GAO4 (glycolipid antigen O4).

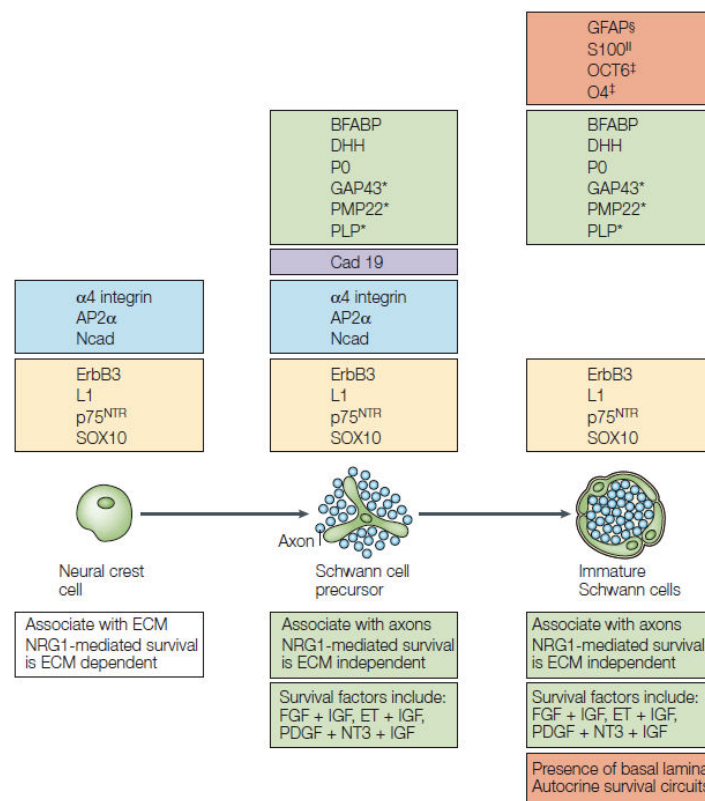


Figure 8 : Les marqueurs moléculaires exprimés au cours du développement de la lignée schwannienne jusqu'au stade CS embryonnaires. Les encadrés du haut indiquent l'évolution de l'expression de différents facteurs. Ceux du bas, précisent les relations des cellules du lignage schwannien avec son environnement (Jessen and Mirsky, 2005).

3.2.2. Des CS immatures aux CS matures

Durant la myélinisation, les protéines Krox-20, MAG, Periaxin (PRX), P0, MBP, PMP22, plasmolipin and galactocerebroside (GalC) sont fortement exprimées par les CS matures myélinisantes.

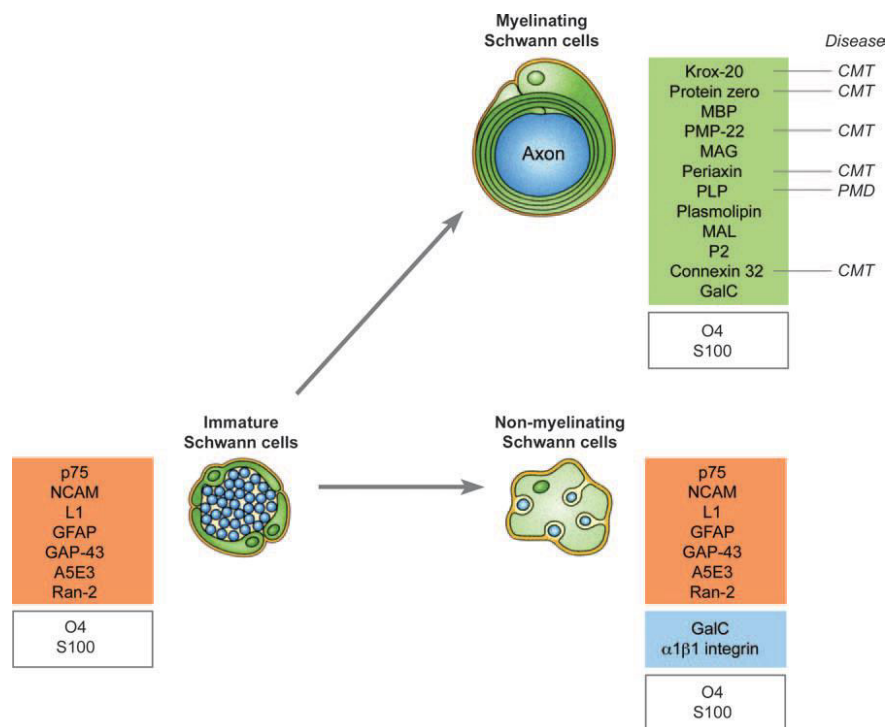


Figure 9 : Les marqueurs moléculaires exprimés au cours du passage des CS embryonnaires en CS matures. L'encadré vert indique les marqueurs des CS myélinisantes, l'orange présente ceux des CS non myélinisantes, le bleu, les facteurs spécifiques aux CS non myélinisantes. Le passage du stade CS immature à CS myélinisante se fait grâce à un équilibre dans la régulation des facteurs (Mirsky et al., 2008).

Le passage au dernier stade de différenciation est aussi caractérisé par l'inhibition de l'expression des molécules exprimées au stade CS immatures, telles que L1, NCAM (Neural Cell Adhesion Molecule) et le récepteur des neurotrophines p75. Ces molécules demeurent cependant exprimées dans les CS matures non-myélinisantes. De plus, ces dernières expriment au moins deux molécules, $\alpha 1\beta 1$ integrin et GalC (GalactoCerebroside), qui ne sont pas exprimées par les CS immatures (Figure 9).

3.3. Les facteurs contrôlant le développement de la lignée schwannienne

L'engagement des CS dans un des stades de maturation du développement du lignage glial est une balance entre différents signaux. Il dépend essentiellement de facteurs de survie, de facteurs mitogènes et de signaux de différenciation provenant des axones. En effet, *in vivo*, les cellules souches multipotentes de la crête neurale sont à la fois à l'origine des cellules gliales mais aussi des neurones et des mélanocytes. A un stade plus avancé, les précurseurs

des CS donnent naissance aux CS immatures et aux fibroblastes. Enfin, les CS immatures s'engagent dans deux voies de différenciation distinctes, pour générer les CS myélinisantes ou non-myélinisantes, selon le type d'axone avec lequel elles sont associées. Ainsi, à chaque stade du développement des CS, il existe une régulation fine, un équilibre délicat entre des voies de signalisation, des marqueurs moléculaires qui engagent ou non les cellules dans le processus de myélinisation.

3.3.1. Le contrôle du développement de la glie à partir de la crête neurale

Les facteurs et voies de signalisation impliqués dans le développement de la glie à partir des cellules de la crête neurale sont nombreux et bien recensés. Parmi ceux-ci, le facteur de transcription Sox10 est indispensable pour l'entrée des cellules de la crête neurale dans le lignage schwannien. La voie de la Neuréguline 1 (NRG1) est elle aussi déterminante au cours de la myélinisation et met en lumière l'importance de l'interaction avec l'axone. Enfin, les voies Notch, BMP (Bone morphogenetic proteins) 2/4, l'endothéline et le facteur de transcription AP2 α font aussi partie de ces facteurs nécessaires au cours du lignage glial (Figure 11).

- Le facteur de transcription Sox10 est indispensable pour le développement du lignage glial à partir des cellules souches de la crête neurale (Bhatheja and Field, 2006). Son expression persiste tout au long du développement de la lignée gliale aussi bien dans le SNP que dans le SNC. A l'inverse, il est réprimé dans les cellules nerveuses. Son invalidation chez la souris conduit à l'absence de précurseurs de CS bien que les neurones soient présents en quantité normale chez ces souris mutantes. Cependant ces neurones dégèrent rapidement par la suite (Britsch et al., 2001). Par ailleurs, Sox10 contrôle l'expression du récepteur de NRG1, ErbB3 (Erythroblastic leukemia viral oncogene homolog) dans les cellules de la crête neurale. Des expériences *in vitro* montrent aussi le rôle prépondérant de Sox10 dans l'initiation et le maintien du phénotype glial (Paratore et al., 2001).
- La mise en place du SNP passe entre autre par l'établissement de contacts, de relations entre les cellules nerveuses et gliales. La survie, la migration et la différenciation des

cellules gliales dépendent directement de l'interaction de ces cellules avec les neurones. Les signaux existants entre les deux populations cellulaires passent en partie par l'intermédiaire d'une famille de facteurs trophiques : les neurégulines (NRG) qui agissent comme la plupart des facteurs trophiques sur des récepteurs tyrosine-kinases de la famille ErbB. Dès la phase de détermination, l'isoforme III de la NRG1 agit en induisant l'engagement des cellules progénitrices des crêtes neurales vers la lignée gliale. Ce processus peut être accéléré par FGF2 (fibroblast growth factor 2) (Leimeroth et al., 2002). Chez la souris, ces cellules progénitrices donnent naissance, à E12-E13, à des précurseurs de CS qui dépendent de signaux axonaux pour survivre, proliférer et se différencier. Il se met alors en place une véritable interdépendance permettant d'adapter la population gliale à celle des neurones : seules les cellules en contact avec les neurones survivent. L'effet trophique des CS sur les neurones est mis en évidence par l'étude de souris mutantes ErbB2/3 chez lesquelles la mutation empêche l'engagement des cellules souches de la crête neurale dans la voie de différenciation des CS. Il en résulte d'abord une absence de précurseur schwannien le long des nerfs périphériques embryonnaires. Par la suite, l'absence de cellules gliales prive les neurones de leur soutien trophique, la majorité d'entre eux meurt et les survivants sont incapables de produire des neurites innervant leurs organes cibles (Riethmacher et al., 1997). De plus, les NRG1 fournissent un nombre approprié de CS pour assurer le processus de myélinisation. Chez les souris invalidées pour l'isoforme III de la NRG1, les précurseurs de CS sont initialement formés, mais leur nombre diminue considérablement à E14, montrant le rôle essentiel de cette isoforme III dans la survie des précurseurs de CS *in vivo* (Wolpowitz et al., 2000). Les effets de la NRG1 sont modulés par la sheddase tumor necrosis factor α converting enzyme (TACE ou ADAM17). Cette enzyme clive l'isoforme de type III, en contrôle ainsi sa quantité et de fait, la myélinisation dans les CS (La Marca et al., 2011). Une fois la myélinisation accomplie, la signalisation NRG-erbB est abolie pour n'être réactivée que lors de traumatismes nerveux pour assurer la régénération de la myéline (Fricker et al., 2011). Les deux facteurs Sox10 et NRG1 participent à une voie de signalisation commune en vue de développer le lignage schwannien et réguler les gènes de la myéline périphérique (Figure 10).

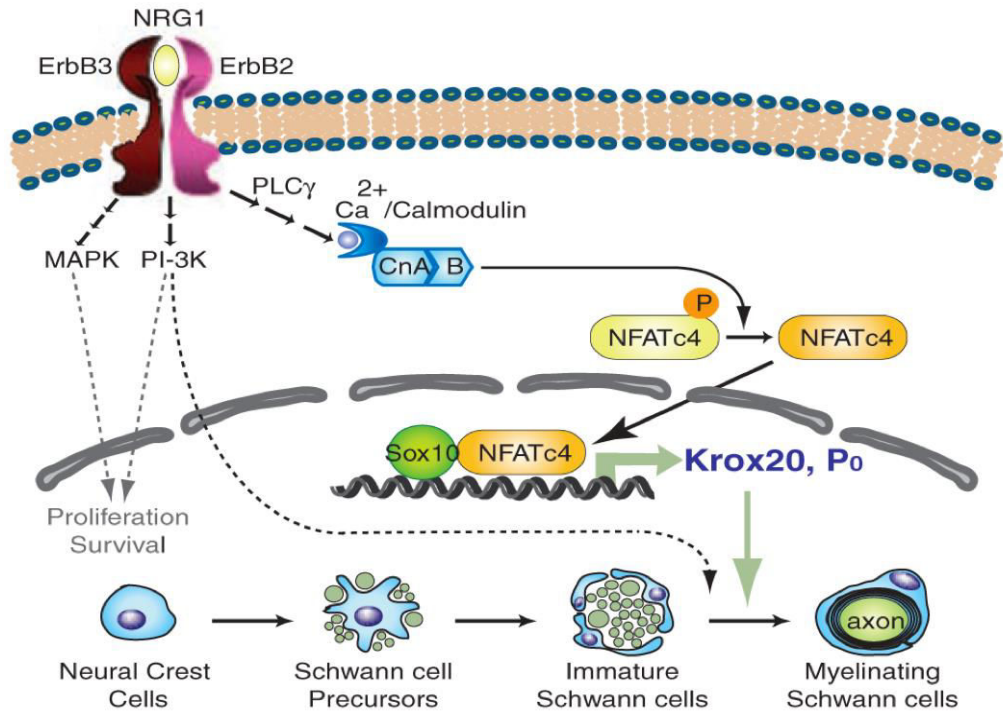


Figure 10 : Effets synergiques de NFATc4 et Sox10 sur l'expression de Krox 20 et P0. NRG1 indirectement active NFATc4 qui avec Sox10 va induire l'expression de Krox20 et de P0, permettant le passage des CS immature en CS myélinisante (Kao et al., 2009).

La fixation de la NRG1 d'origine axonale sur ses récepteurs schwanniens ErbB2/3 entraîne une augmentation du calcium intracellulaire et par l'intermédiaire de la calmoduline, la déphosphorylation du facteur de transcription NFATc4 (Nuclear factor of activated T-cells cytoplasmic 4) qui est ainsi transloqué au noyau où il forme un complexe protéique avec Sox10 pour activer Krox20 au cours de l'étape CS prémyélinisante. Les deux partenaires interagissent également au stade CS myélinisante pour réguler le gène P0 (Kao et al., 2009).

- La signalisation Notch, de la même façon que la voie NRG1, inhibe la différenciation neuronale et favorise la destinée schwannienne (Wakamatsu et al., 2000).
- Les facteurs BMP 2/4 (Bone morphogenetic protein) inhibent, *in vitro*, la différenciation des cellules gliales à partir des cellules de la crête neurale (Shah et al., 1996).
- Les endothélines et le facteur de transcription AP2α participent à la survie et à la progression du lignage glial. Des études *in vitro* montrent que les endothélines

stimulent la survie des précurseurs de CS chez le rat, mais retardent le passage des précurseurs de CS en CS matures (Brennan et al., 2000).

3.3.2. Le contrôle de la survie des CS embryonnaires

Chez la souris, la conversion des précurseurs des CS en CS immatures se déroule aux alentours de E13-E15. Ce moment coïncide avec le début de « l'organogénèse » du SNP. Le nerf commence à être délimité par le perineurium et un système vasculaire propre à celui-ci se met en place. A la différence des précurseurs des CS, les CS immatures peuvent survivre malgré une perte de contact axonal, grâce à l'action autocrine d'un cocktail de facteurs de survie comme l'insuline-like growth factor 2 (IGF2), la neurotrophine 3 (NT3), le platelet-derived growth factor- β (PDGF β), la leukaemia inhibitory factor (LIF) et l'acide lysophosphatidique (LPA) (Meier et al., 1999) (Dowsing et al., 1999) (Weiner and Chun, 1999). Ce changement entre survie paracrine et autocrine est physiologiquement compréhensible. La dépendance des précurseurs des CS aux axones est importante pour contrôler en masse le nombre de CS par rapport au nombre d'axones. En revanche, l'indépendance des CS par rapport aux axones mises en place à partir des CS immatures est fondamentale pour la réparation du nerf lésé.

Lors des tout derniers jours de la vie embryonnaire et des premiers jours de la vie post-natale se déroule le processus de ségrégation unitaire (radial sorting). Les CS immatures associées avec des axones de large diamètre ($>1\mu\text{m}$) établiront une relation stœchiométrique de 1/1 avec les axones et passeront au stade de CS pro-myélinisantes. A l'inverse les CS immatures associées avec des axones de diamètre inférieur à $1\mu\text{m}$ ne seront pas myélinisantes et n'établiront pas la relation 1/1. Le ratio CS/axone doit donc être finement régulé. Le nombre de CS immatures peut être contrôlé par des mécanismes prolifératifs, apoptotiques ou de survies. Le signal axonal NRG1 est le principal facteur stimulant la prolifération de CS (Lyons et al., 2005). La division cellulaire des CS est également régulée positivement par le transforming growth factor- β (TGF β). En effet, l'inactivation du récepteur TGF β de type II diminue la prolifération des CS immatures du nerf sciatique de souris à E19 et P2 (D'Antonio et al., 2006). Les facteurs de transcription Notch (Woodhoo et al., 2004), PAX3 (Paired box 3), Sox2 et c-Jun (Parkinson et al., 2008) sont eux aussi impliqués dans la prolifération des CS immatures. Ils inhibent également la différenciation de ces cellules en CS myélinisantes (Le et al., 2005) (Kioussi et al., 1995). La survie des CS immatures est contrôlée par un équilibre entre

les facteurs pro- et anti- apoptotiques. Outre les signaux de survie autocrines cités en début de ce paragraphe, nous pouvons compléter cette liste par une glycoprotéine synthétisée par les CS : la laminine. Celle-ci favorise la survie des CS grâce à son dialogue avec la voie Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)/Protéine Kinase B (AKT). L'invalidation de la laminine provoque un défaut majeur dans la ségrégation unitaire et dans la prolifération des CS à E19 (Yu et al., 2005). NRG1 se place encore une fois au centre de la régulation schwannienne grâce à son effet anti apoptotique (Lyons et al., 2005). Le signal de mort cellulaire programmé est ici, contrairement aux précurseurs CS ou il est passif, activement relayé par le récepteurs à la neurotrophine P75, peut être après son activation par NGF (Nerve Growth Factor) (Syroid et al., 2000). L'action du TGF β est paradoxale. Nous avons cité précédemment son action proliférative sur les CS. Dans ce même article, D'Antonio *et al* montrent également que l'invalidation du récepteur au TGF β de type II empêche l'apoptose des CS dans le nerf sciatique de souris à E18 à P2. Si bien, qu'au final, ces souris mutantes n'ont pas d'altération du nombre de CS, car les effets prolifératifs et apoptotiques se compensent parfaitement, ainsi le phénotype myélinique est semblable à celui des souris sauvages (D'Antonio et al., 2006).

3.3.3. La régulation de la myélinisation

La dernière étape de la différenciation des CS, aboutissant aux CS myélinisantes, ne fait pas exception aux autres stades de développement. Il est finement régulé par un ensemble de signaux. Les facteurs pro-myélinisants sont exprimés au cours du développement à l'état physiologique. On recense entre autres, Krox20, Oct6 (Octamer-binding transcription factor 6), BRN2 (Brain 2 class III POU-domain protein) ou bien encore NRG1. Lors de la lésion d'un nerf ou de neuropathies, la balance de facteurs s'inverse afin d'entamer un processus de dé-différenciation grâce à la grande plasticité dont font preuve les CS. Ces facteurs sont aussi importants au cours du développement physiologique, car ils contrôlent l'initiation de la myélinisation ainsi que sa vitesse (Figure 11).

Parmi les facteurs pro-myélinisants, le facteur de transcription Krox20 est essentiel. Dans le modèle de souris Krox20 $^{-/-}$, les CS entourent les axones, mais sont incapables de former la gaine de myéline, attestant son rôle fondamental dans le processus de myélinisation (Topilko et al., 1994). Par ailleurs, il est également impliqué dans la régulation de la myéline au stade adulte. L'invalidation de Krox20 dans les CS de souris adulte conduit à une

démyélinisation, une dédifférenciation des CS et à une augmentation de la prolifération suivie d'un blocage au stade promyélinisant (Decker et al., 2006). De plus, il a été montré que Krox20 inhibe la prolifération des CS en culture suite au traitement par la NRG1 d'origine axonale et inhibe la mort des CS suite au traitement par TGF β , deux situations caractéristiques des CS immatures (Parkinson et al., 2004).

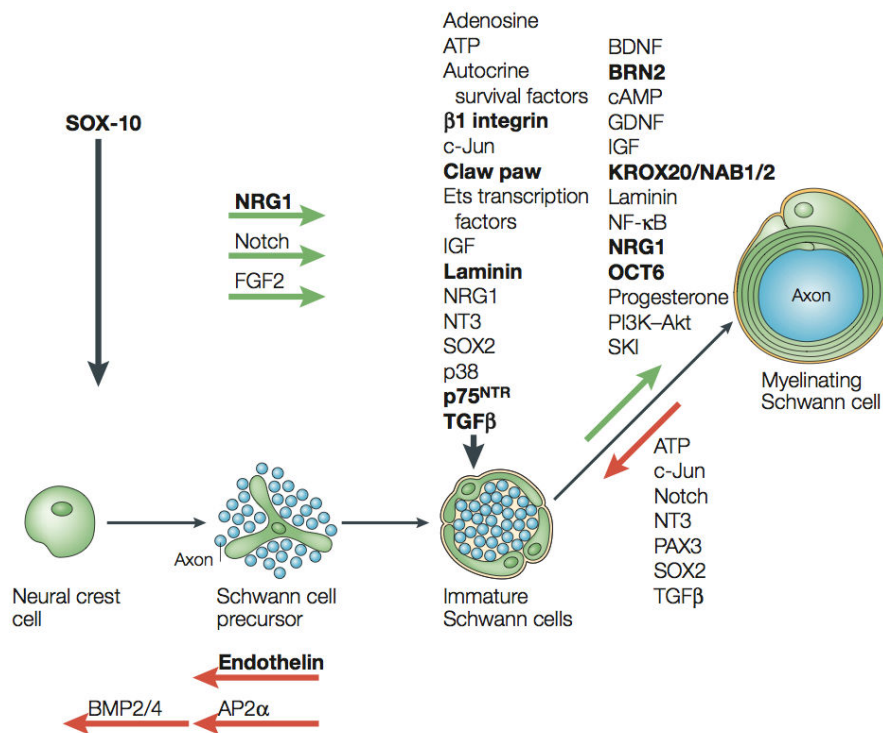


Figure 11 : Les facteurs contrôlant le développement des CS myélinisantes (Jessen and Mirsky, 2005a). l'équilibre entre de nombreux facteurs positifs et négatifs sont nécessaire à la synchronisation du processus myélinique.

D'autres signaux tiennent un rôle important en vue du passage au dernier stade de développement. NRG1 1 tient encore un rôle prépondérant. Son isoforme de type III participe à la régulation de l'épaisseur de la gaine. La souris présentant une haploinsuffisance pour *Nrg1* possède une gaine plus fine que la souris sauvage (Michailov et al., 2004). Les facteurs de transcription OCT6 (Octamer-binding transcription factor 6) et BRN2 (Brain 2 class III POU-domain protein) possèdent des fonctions partiellement redondantes mais sont essentiels pour le bon déroulement de la myélinisation (Jaegle et al., 2003). Des études *in vitro* montrent aussi que NF- κ B (Nuclear Factor- κ B) contrôle l'expression de OCT6 ; il est donc probablement impliqué lui aussi dans l'initiation de la myélinisation (Mirsky et al., 2001).

De plus, le coreprésenseur NAB1/2 (NGFI-A-binding proteins 1 and 2), grâce à son interaction avec Krox20, la voie PI3K et le proto-oncogène SKI (v-ski sarcoma viral oncogène homologue) qui est un inhibiteur de la voie TGF β , participent au développement et régulent la myélinisation (Atanasoski et al., 2004) (Maurel and Salzer, 2000).

4. Elaboration de la gaine de myéline par les cellules de Schwann

L'élaboration de la gaine de myéline par les CS nécessite l'invagination de l'axone dans une dépression de la cellule gliale. Une fois entouré, il ne subsiste qu'une fente reliée à la surface : le mésaxone (Sherman and Brophy, 2005). La cellule de Schwann produit alors une quantité considérable de membranes qui s'enroulent autour de l'axone (>100 fois). Dans un premier temps, la CS est remplie de cytoplasme, puis, l'accolement des membranes élimine le cytoplasme intermédiaire et forme un complexe lipoprotéique, la gaine de myéline compacte (Figure 12).

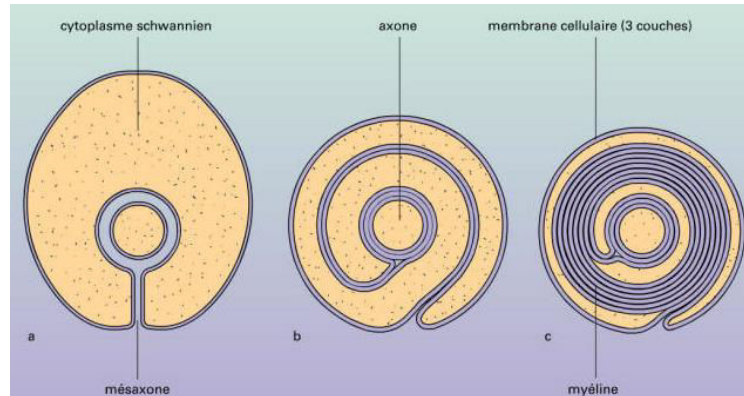


Figure 12 : Formation de la gaine de myéline . La gaine de myéline se forme par enroulements successifs et le cytoplasme est progressivement éliminé (Sherman and Brophy, 2005).

Chez l'Homme, la myélinisation n'est pas complète à la naissance, son développement le plus intense se fait au cours du premier semestre postnatal. Elle se poursuit toutefois jusqu'à la puberté, voire au-delà à un rythme moins marqué. La myélinisation des faisceaux reliant le cerveau à la moelle (faisceaux cortico-spinaux) se poursuit jusqu'à la fin de la 2^{ème}

année postnatale. Chez la souris, la myélinisation se déroule durant les 21 premiers jours après la naissance.

5. Démyélinisation à la suite d'une lésion nerveuse

Lors d'un traumatisme (pincement, section, étirement) du nerf périphérique on observe un processus connu sous le nom de dégénérescence wallérienne (Figure 13).

La dégénérescence wallérienne est un phénomène qui suit une lésion du nerf et qui implique une dégénérescence axonale et une dégradation de la gaine de myéline. La démyélinisation des CS débute mécaniquement par une fragmentation de la gaine en de petites structures ovoïdes et, moléculairement par une diminution de l'expression des gènes de la myéline (Jessen and Mirsky, 2008). La fragmentation de la gaine de myéline a lieu à proximité d'une structure appelée incision de Schmidt-Lantermann. Cette région présente un enroulement de myéline de moindre compaction avec des jonctions adhérentes atypiques. En parallèle, à proximité de la lésion, la fibre nerveuse bourgeonne pour former plusieurs cônes de croissance par axone. Les CS de la région distale survivent au traumatisme malgré la perte de contact avec l'axone sous-jacent (Fu and Gordon, 1997).

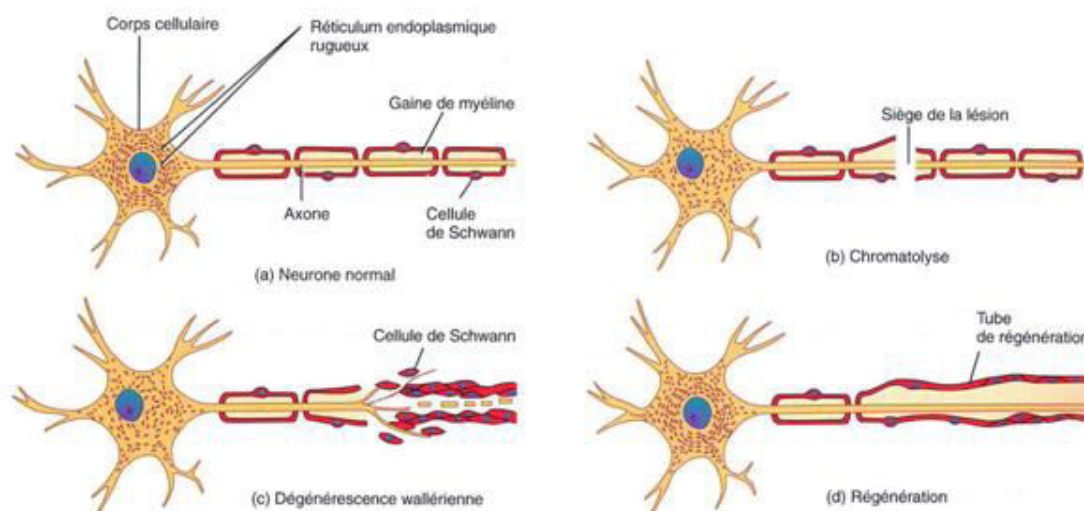


Figure 13 : La dégénérescence Wallérienne et la repousse axonale. L'axone et la gaine de myéline dégèrent à proximité de la lésion. Puis l'axone bourgeonne, les CS se différencient, prolifèrent puis reforment une gaine de myéline compacte autour du nouvel axone (d'après <http://theses.ulaval.ca>).

C'est dans ce contexte lésionnel, que l'on observe l'importance du phénomène de plasticité des CS. De nombreuses équipes se sont penchées sur l'explication moléculaire de cette plasticité. Est-t-elle le fruit d'une diminution des signaux promyélinisants ou bien nécessite-t-elle une activation de voies de signalisation spécifiques ? Les différentes étapes de différenciation sont réversibles. Ainsi, lorsque le contact entre la CS et le neurone est perdu, comme c'est le cas dans les lésions du nerf, les CS se dédifférencient vers un phénotype proche de celui des CS immaures et retournent dans le cycle prolifératif. La synthèse des protéines de la myéline (PMP22, MAG, PO, MBP...) est arrêtée, la myéline est dégradée et ses débris sont d'abord phagocytés par les CS puis par les macrophages. Ces derniers sont recrutés à la lésion dans un délai de 48 heures. Les travaux de Walter au milieu du XIX^{ème} siècle ont posé les bases de la compréhension de l'enchaînement de ces événements.

Une fois dénervées et dédifférenciées, les CS entrent dans un cycle de prolifération pour favoriser la réparation du nerf lésé. Cet événement se déroule grâce à la stimulation des débris axonaux et des facteurs sécrétés par les macrophages. Les CS acquièrent un phénotype proche de celui des cellules non-myélinisantes et immatures en activant la synthèse de diverses protéines dont des facteurs de croissance et leurs récepteurs (GDNF, NRG1, BDNF, IGFs, progestérone...), des protéines d'adhésion (NgCAM, L1, N-cadhérine) et des protéines de la lame basale (la laminine, fibronectine, collagènes, protéoglycanes...) (Höke et al., 2003) (Koenig et al., 1995) (Stewart et al., 1996).

Toutes ces modifications concourent à créer un environnement propice à stimuler la neuritogenèse post-lésionnelle et à garantir la survie des CS. Les CS terminent leur processus de redifférenciation une fois la repousse axonale achevée en resynthétisant la gaine de myéline compacte. La dédifférenciation qui se produit dépend de voies de signalisation qui s'opposent à l'effet pro-myélinisant des voies telles que Krox20, AMP cyclique et NRG1. La plupart des voies de signalisation qui régulent négativement le processus de myélinisation, sont activées au stade CS immature, et leur activité cesse au cours de la myélinisation.

Par exemple, le facteur de transcription c-Jun, un des effecteurs de la voie de signalisation JNK (c-Jun-amino (N)-terminal kinase), est activé dans les CS immatures d'E18 jusqu'à la naissance, alors qu'il est désactivé dans les CS qui commencent à myéliniser. En effet, si la voie JNK reste active, il en résulte l'arrêt de la myélinisation et l'inhibition de l'expression des gènes de la myéline qui est normalement induite par des signaux pro-

myélinisants comme Krox20 ou l'élévation de la quantité d'AMP cyclique (Parkinson et al., 2008).

De même, la voie Notch, qui stimule la prolifération des CS embryonnaires, est désactivée par Krox20 quand les CS commencent à myéliniser. Elle est réactivée uniquement en cas de lésion du nerf chez l'adulte pour stimuler la dédifférenciation des CS myélinisantes en CS embryonnaires. La démyélinisation et la dédifférenciation des CS sont contrôlées par l'activation d'un groupe de facteurs de transcription comprenant entre autres c-Jun, Sox2, Pax3 et Id2 (Jessen and Mirsky, 2008) (Woodhoo et al., 2009). Ces facteurs sont exprimés au cours de la prolifération cellulaire puis selon un système de balance, inhibés dans les cellules myélinisantes. De plus, il a été montré que l'ATP, NT3 et TGF β retardent la myélinisation (Fields and Stevens, 2000) (Chan et al., 2001) (Einheber et al., 1995).

Le processus de remyélinisation dans le SNC est bien moins connu. Les facteurs intervenants ne sont pas tous identifiés et la cinétique d'action de ces facteurs semble beaucoup influencer leur potentiel promyélinisant (Aldskogius, 2005). Il apparaît que les astrocytes sont impliqués dans le processus de remyélinisation (Talbot et al., 2005). De plus, bien que les astrocytes activés soient souvent associés aux processus neurodégénératifs (notamment *via* la sécrétion de facteurs inhibant la repousse axonale, comme la protéine MAG et le marqueur de surface Nogo (Sandvig et al., 2004), Liberto *et al.* ont démontré que ces astrocytes activés pouvaient créer un environnement permissif pour la réparation neuronale (en produisant des substrats énergétiques et des facteurs pour les neurones et les oligodendrocytes, en chélatant les excès de glutamate et de radicaux libres et en restaurant la barrière hématoencéphalique entre autres (Liberto et al., 2004).

6. Les pathologies du système nerveux périphérique

6.1. La maladie de Charcot-Marie-Tooth

La maladie de Charcot-Marie-Tooth (CMT) aussi connue sous le nom Hereditary Sensory and Motor Neuropathy (HSMN) a été décrite par trois cliniciens en 1886, les français Charcot et Marie ainsi que l'anglais Tooth. Elle comprend plusieurs groupes de troubles génétiquement et cliniquement hétérogènes caractérisés par une atteinte des nerfs périphériques, une atrophie musculaire, une faiblesse et une perte de sensibilité des

membres. La maladie héréditaire de Charcot-Marie-Tooth est la plus fréquente parmi les pathologies du SNP. Sa prévalence est de 1/2500 et elle touche indifféremment les deux sexes.

6.1.1. Classification

Le mode de transmission, le phénotype et la sévérité des différents types de CMT sont variables. En effet, les différentes formes sont classées selon la nature de l'atteinte du nerf ou le mode de transmission génétique ainsi que selon les anomalies génétiques en cause et les protéines déficitaires :

- la nature de l'atteinte du nerf (14) :
 - formes axonales (vitesse de conduction nerveuse > 40 m/sec) ;
 - formes démyélinisantes (vitesse de conduction nerveuse < 35 m/sec) ;
 - formes intermédiaires mixtes (vitesse de conduction nerveuse intermédiaire entre 25 m/sec et 45 m/sec).

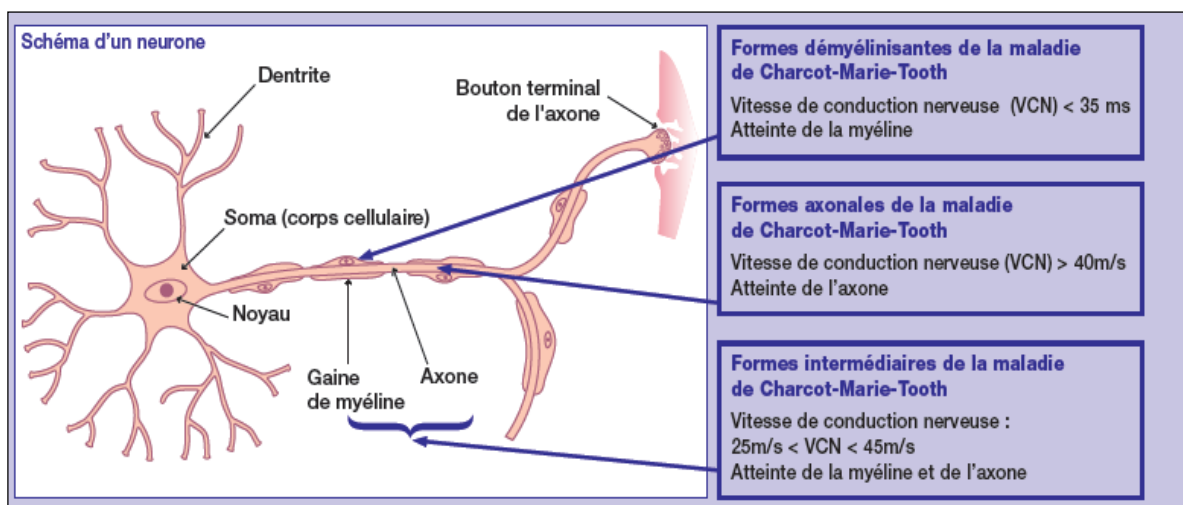


Figure 14 : Etiologie des différentes formes de la maladie de Charcot-Marie-Tooth (d'après Odile Dubourg, 2009). L'altération de la vitesse de la conduction nerveuse dépend de l'étiologie de la maladie.

- le mode de transmission génétique ainsi que les anomalies génétiques en cause et les protéines déficitaires (Reilly et al., 2011):
 - Pour les formes autosomiques dominantes (ad), la maladie de Charcot-Marie-Tooth de type 1 (CMT1) correspond à la forme démyélinisante et la maladie de type 2 (CMT2) à la forme axonale. Par la suite, la nomenclature associe une lettre qui

correspond au gène ou locus identifié. Ainsi, la CMT1A correspond à la forme autosomique dominante, démyélinisante, liée au gène PMP22, tandis que la CMT1B correspond à la forme autosomique dominante, démyélinisante, liée au gène MPZ.

- Pour les formes autosomiques récessives, la maladie de type 4 (CMT4) correspond à la forme démyélinisante et la maladie autosomique récessive de type AR-CMT à la forme axonale.

- Les formes dominantes liées au chromosome X (CMTX) et les formes intermédiaires (DI-CMT).

Nous nous limiterons à l'étude de la forme la plus répandue de neuropathie démyélinisante de transmission autosomique dominante, la CMT1.

| Type | Gene | Specific phenotype |
|--|---|--|
| Autosomal dominant CMT1 (AD CMT1) | | |
| CMT1A | <i>Dup 17p (PMP22)</i> <i>PMP22</i> (point mutation) | Classic CMT1 Classic CMT1/DSD/CHN CMT1/DSD/CHN/CMT2 |
| CMT1B | <i>MPZ</i> | Classic CMT1 |
| CMT1C | <i>LITAF</i> | Classic CMT1/DSD/CHN |
| CMT1D | <i>EGR2</i> | CMT2 but can have slow MCVs in CMT1 range +/- early-onset severe disease |
| CMT1F | <i>NEFL</i> | |
| Hereditary neuropathy with liability to pressure palsies (HNPPs) | | |
| HNPP | <i>Del 17p (PMP22)</i> <i>PMP22</i> (point mutation) | Typical HNPP Typical HNPP |
| Autosomal recessive CMT1 (AR CMT1/CMT4) | | |
| CMT4A | <i>GDAP1</i> | CMT1 or CMT2 usually early-onset and severe/vocal cord and diaphragm paralysis described/rare AD CMT2 families described |
| CMT4B1 | <i>MTMR2</i> | Severe CMT1/facial/bulbar/focally folded myelin |
| CMT4B2 | <i>MTMR13</i> | Severe CMT1/glaucoma/focally folded myelin |
| CMT4C | <i>SH3TC2</i> | Severe CMT1/scoliosis/cytoplasmic expansions |
| CMT4D (HMSNL) | <i>NDRG1</i> | Severe CMT1/gypsy/deafness/tongue atrophy |
| CMT4E | <i>EGR2</i> | CMT1/DSD/CHN phenotype |
| CMT4F | <i>PRX</i> | CMT1/more sensory/focally folded myelin |
| CMT4G (HMSN Russe) | <i>HK1</i> | Severe early-onset CMT1 |
| CMT4H | <i>FGD4</i> | CMT1 |
| CMT4J | <i>FIG4</i> | CMT1/predominantly motor/progressive |
| CCFDN | <i>CTDP1</i> | CMT1/gypsy/cataracts/dysmorphic features |
| AR CMT1 | <i>PMP22</i> (point mutation) | Classic CMT1/DSD/CHN |
| AR CMT1 | <i>MPZ</i> | CMT1/DSD/CHN/CMT2 |
| Autosomal dominant CMT2 (AD CMT2) | | |
| CMT2A1 | <i>KIF1Bβ</i> | Classic CMT2 |
| CMT2A2 | <i>MFN2</i> | CMT2/more progressive/optic atrophy |
| CMT2B | <i>RAB7</i> | CMT2 with predominant sensory involvement and sensory complications (similar phenotype to HSN1 secondary to SPTLC1 mutation) |
| CMT2C | <i>TRPV4</i> | CMT2 with vocal cord and respiratory involvement/congenital distal SMA/scapulo-peroneal syndrome |
| CMT2D | <i>GARS</i> | CMT2 with predominant hand wasting/weakness or dHMN-V |
| CMT2E | <i>NEFL</i> | CMT2 but can have slow MCVs in CMT1 range +/- early-onset severe disease |
| CMT2F | <i>HSPB1</i> | Classic CMT2 or dHMN-II |
| CMT2I | <i>MPZ</i> | Classic CMT2 |
| CMT2J | <i>MPZ</i> | CMT2 with hearing loss and pupillary abnormalities |
| CMT2K | <i>GDAP1</i> | Late-onset CMT2 |
| CMT2L | <i>HSPB8</i> | Classic CMT2 or dHMN-II |
| CMT2N | <i>AARS</i> | Classic CMT2 |
| Autosomal recessive CMT2 (AR CMT2) | | |
| CMT2B1 | <i>LMNA</i> | CMT2 proximal involvement and rapid progression described/also causes muscular dystrophy/cardiomyopathy/lipodystrophy |
| CMT2B2 | <i>MED25</i> | Classic CMT2 |
| CMT2H | <i>GDAP1</i> | CMT2/pyramidal features |
| X-linked CMT | | |
| CMT 1X | <i>GJB1</i> | Males CMT1 (+/- patchy MCVs)/females CMT2 |
| CMTX5 | <i>PRPS1</i> | CMT2 and early-onset deafness/optic neuropathy |
| Dominant intermediate CMT (DI-CMT) | | |
| DI-CMTB (CMT2M) | <i>DNM2</i> | Classic CMT |
| DI-CMTC | <i>YARS</i> | Classic CMT |

Tableau 1 : Classification des maladies de Charcot-Marie-Tooth (Reilly et al., 2011).

6.1.2. La maladie de Charcot-Marie-Tooth de type 1

On distingue quatre formes de CMT1 :

- la CMT1A, la plus fréquente (entre 70 et 80% des cas), est associée à une duplication d'une séquence de 1,5 Mb sur le chromosome 17 en position 17p11.2±12, entraînant la présence d'une copie supplémentaire du gène PMP22 (Lupski et al., 1991). Cette duplication entraîne une neuropathie périphérique qui se manifeste généralement avant l'âge de 20 ans et produit des faiblesses musculaires distales. Histopathologiquement, cette neuropathie est caractérisée par une hypermyélinisation (Gabreëls-Festen et al., 1995), suivie d'une démyélinisation, une perte des fibres nerveuses myélinisées et une hypertrophie concentrique des CS ("bulbe d'oignon", signe d'une répétition de cycles de démyélinisation et de remyélinisation) (Figure 15).

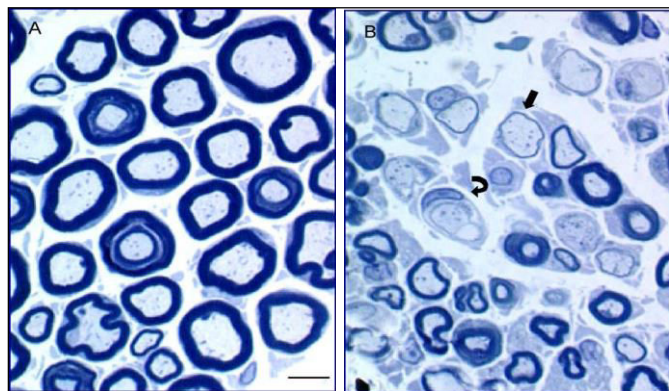


Figure 15 : Coupes semi-fines de nerf sciatique coloré au bleu de toluidine. (A) Rat sauvage. (B) Rat transgénique CMT1A. On observe la présence de plusieurs fibres nerveuses entourées par une gaine de myéline très fine (flèche) et une hypertrophie concentrique des CS en forme de bulbe d'oignon (flèche courbée). Barre = 2.5 µm (Grandis et al., 2004).

- la CMT1B représente moins de 10% des CMT1 et se caractérise par des anomalies du gène PO qui est sur le chromosome 1 en position 1q22.
- la CMT1C représente entre 5 et 10% des CMT1. Cette maladie est causée par des anomalies de la région 16p13.1-p12.3 codant pour le gène Lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha factor (LITAF).
- la CMT1D, forme représentant moins de 1% des CMT1 non A et non B.

6.1.3. Symptômes

En règle générale, ces maladies débutent avant l'âge de 20 ans. Les premiers symptômes peuvent apparaître avant l'âge de 10 ans pour 50% des cas de CMT1A. À l'opposé, certains patients CMT1A (porteurs de la mutation) restent asymptomatiques sur le plan clinique. Les premiers signes sont le plus souvent des troubles de la marche (retard à l'acquisition de la marche, chutes, déficit des muscles releveurs des pieds qui entraînent un *steppage* - impossibilité de relever la pointe du pied qui oblige à soulever le pied à chaque pas comme si on montait un escalier 'step') et des déformations des pieds (pieds creux)(Figure 16). Ces troubles sont dus à une faiblesse musculaire distale, c'est-à-dire des extrémités des membres et une atrophie progressive, plus marquée aux jambes (atrophie musculaire péronière). Fatigabilité, troubles de l'équilibre et pénibilité de la station debout ou à la montée des escaliers sont des symptômes fréquents. L'atteinte des mains est en général tardive, n'apparaissant qu'après plusieurs années d'évolution. Les fonctions vitales (dont le système cardiovasculaire) et intellectuelles ne sont généralement pas atteintes. Les patients présentent aussi des troubles sensitifs qui peuvent entraîner des douleurs.

Dans certaines formes, d'autres symptômes peuvent être présents : atteinte respiratoire, atteinte des cordes vocales, surdité et ulcères aux pieds.



Figure 16 : Atrophies musculaires péronières et déformations des pieds chez des patients atteints de CMT 1A (Pareyson and Marchesi, 2009).

6.1.4. Evolution de la maladie

L'évolution reste extrêmement variable entre les différents types de CMT, y compris au sein d'une même famille : certaines personnes présentent peu ou pas de symptômes alors que d'autres ont un handicap fonctionnel important. L'évolution est en général lente et progressive, mais elle peut aussi se faire par poussées (notamment à l'adolescence).

Les formes sévères sont rares. En règle générale, la gêne fonctionnelle est modérée et la marche reste le plus souvent possible. La longévité n'est pas affectée et il est possible de conserver une activité socio-professionnelle normale ou quasi-normale dans la plupart des cas. La forme CMT1B peut cependant conduire à un handicap sévère chez certaines personnes, entre 20 et 40 ans.

6.1.5. Pistes thérapeutiques

A l'heure actuelle, il n'existe pas de traitement médicamenteux efficace contre la CMT et les moyens de luttés se concentrent sur l'activité physique et les interventions chirurgicales contre des problèmes osseux. Plusieurs essais ont été réalisés en vue de soigner la CMT ou du moins d'atténuer ses symptômes. Ainsi, l'antagoniste de la progestérone, l'onaprisone se trouve être efficace dans le modèle de rat CMT1A (Sereda et al., 1996). Il diminue la surexpression du gène PMP22, tout en améliorant la masse et la force musculaire de ces rats. Cette amélioration des fonctions motrices peut être expliquée par une diminution de la perte axonale (Meyer zu Horste et al., 2007). Le traitement de souris CMT1A par l'acide ascorbique améliore les symptômes cliniques et neuropathologiques probablement en inhibant la PMP22 en entrant en compétition avec l'AMPc (Passage et al., 2004). Plusieurs essais cliniques randomisés ont débuté dans différents pays (Australie, Hollande, Etats-Unis d'Amérique, Italie, Royaume-Uni et France) impliquant 280 patients atteints de CMT1A dont 190 reçoivent le traitement actif. Trois essais d'une durée d'un an ont été publiés (Micallef et al., 2009) (Burns et al., 2009) (Verhamme et al., 2009). Toutefois, aucun d'eux ne démontre un effet bénéfique de l'acide ascorbique.

Les pistes thérapeutiques pour traiter la CMT1A consistent à agir au niveau des différentes étapes de la maladie : diminuer l'expression de PMP22, limiter l'accumulation toxique de la protéine PMP22 anormale dans les CS et empêcher la dégénérescence des nerfs périphériques.

De plus, des équipes de recherche se penchent depuis quelques années sur les effets favorables possibles d'une substance naturelle, la curcumine, sur les maladies génétiques rares. La curcumine est l'une des composantes du curry indien et est déjà largement utilisée dans les médecines traditionnelles en Inde et en Chine. L'équipe de Nakagawa a démontré que des suppléments en curcumine administrés à des souris atteintes de maladies neurologiques proches de cette neuropathie héréditaire humaine entraînent une diminution des lésions des nerfs visibles au microscope (Nakagawa, 2011). D'un point de vue fonctionnel, ce traitement s'est traduit par une amélioration des possibilités motrices chez ces animaux.

L'altération de la protéine PMP22 entraîne ainsi une dégénérescence des axones périphériques des membres et une diminution du nombre de CS. La régénération des nerfs implique des interactions complexes entre les axones, les CS et la matrice extracellulaire. Une absence prolongée de contact entre les axones et les CS, conduit à une diminution progressive du nombre de ces dernières et à une perte de l'aptitude à la régénération. Il a été montré que les CS peuvent cependant survivre en l'absence d'axone grâce à la sécrétion de divers facteurs de croissance dont fait partie la Neurotrophine-3 (NT-3). Des chercheurs ont testé l'efficacité d'un traitement par la NT-3 sur deux modèles murins de la CMT1A (Sahenk et al., 2005). Après une période de huit à douze semaines, ce traitement a permis d'améliorer de façon significative la régénération axonale et les processus de myélinisation associés dans les deux modèles. A la suite de ces résultats encourageants, les auteurs ont conduit un essai clinique NT-3/placebo randomisé en double-aveugle pour évaluer l'efficacité d'une administration sous-cutanée de la NT-3 chez huit patients atteints de CMT1A. Après six mois de traitement, des améliorations significatives ont été notées chez les patients ayant reçu la NT-3, au niveau de la régénération des fibres myélinisées dans le nerf sural. Le modèle murin Trembler qui présente une mutation de la PMP22 périphérique voit ses capacités de force musculaire et de remyélinisation grandement améliorées après traitement NT3 (Sahenk et al., 2010).

6.2. Fragilité héréditaire des nerfs périphériques à la pression

L'HNPP (Hereditary Neuropathy with liability to Pressure Palsies) est une neuropathie appelée aussi "fragilité héréditaire des nerfs périphériques à la pression" ou "neuropathie tomaculaire". C'est une neuropathie sensitivomotrice héréditaire, à transmission autosomique dominante, caractérisée par la survenue d'accès transitoires et récidivants de paralysie dans le territoire bien défini d'un tronc nerveux. Ces accès sont souvent consécutifs à un traumatisme minime ou à une compression prolongée de la région. Cette neuropathie est due à un défaut de synthèse de la protéine PMP22. Ce défaut de synthèse est lui-même dû, dans près de 90% des cas, à une délétion de 1,5 Mb dans la région 17p11.2±12 incluant le gène PMP22 (Chance et al., 1993) (Chance, 2006) (Tyson et al., 1996). La région délétée est la même que celle dupliquée dans la maladie CMT1A. Ce phénomène de duplication/délétion d'une séquence génomique identique est dû à un crossing-over inégal favorisé par la présence de part et d'autre de la région en cause de séquences partageant une forte homologie, appelées CMT1A-REP (REP pour repeat). Des mutations ponctuelles du gène PMP22 ont pu

être mises en évidence dans de rares cas de HNPP. La biopsie nerveuse met en évidence des renflements focalisés de certains segments de la gaine de myéline (tomacules) (Figure 17). Le mécanisme de constitution des tomacules est considéré comme consécutif à une hypermyélinisation, en relation avec une anomalie de fonctionnement de la CS (Madrid et al., 1975).

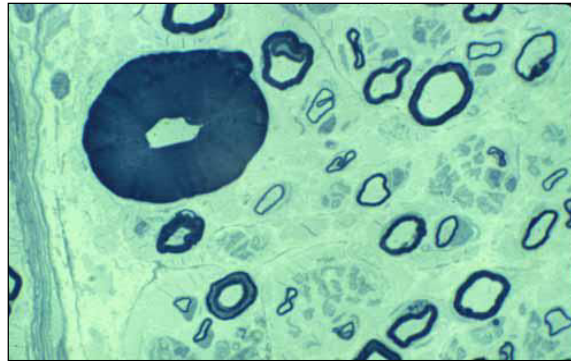


Figure 17 : Coupe d'une biopsie nerveuse d'un patient atteint de HNPP. Cette coupe de nerf prise en microscopie électronique montre une zone d'épaississement de la myéline très important (tomacula) et des axones entourés ou non de myéline (Chance, 2006).

Le nombre de personnes souffrant d'HNPP n'est pas défini de manière précise. On estime actuellement que 2 à 5 personnes sur 100 000 sont atteintes.

II. Régulation de la myélinisation :

Le processus de myélinisation est finement régulé lors du développement et au cours de la vie d'un individu. La moindre dérégulation conduit à l'apparition de pathologies gravement invalidantes. Plusieurs voies de signalisation contrôlent la myélinisation. Je décrirai dans les chapitres suivants celles qui ont fait l'objet de mon travail de recherche : la voie Wnt, la voie des Oxystérols/LXR et la voie AhR.

1. La voie Wnt/ β -caténine

Les protéines Wnt (ou Wingless (Wg) chez la drosophile) appartiennent à une famille de glycoprotéines morphogènes secrétées. Leurs effets autocrines et paracrines contrôlent de multiples processus biologiques comme la prolifération, la différenciation, l'apoptose, la survie, la migration et la polarisation cellulaire. A ce jour, 19 membres de la famille Wnt ont été identifiés chez l'homme et la souris. Par ailleurs, dans l'espèce humaine, 11 protéines Frizzled (Fz ou Fzd) différentes ont été répertoriées (Figure 18).

| HUMAN | | MOUSE | | FLY | |
|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|----------------|----------------|
| Wnt | Fz | Wnt | Fz | Wnt | Fz |
| WNT1 | FZD1 | Wnt1 | Fzd1 | wg | Fz |
| WNT2 | FZD2 | Wnt2 | Fzd2 | DWnt2 | Fz2 |
| WNT2B/13 | FZD3 | Wnt2b/13 | Fzd2-rs1 | DWnt3/5 | Fz3 |
| WNT3 | FZD4 | Wnt3 | Fzd2-rs2 | DWnt4 | Fz4 |
| WNT3A | FZD5 | Wnt3a | Fzd3 | DWnt6 | smo |
| WNT4 | FZD6 | Wnt4 | Fzd4 | WntD/DWnt8 | |
| WNT5A | FZD7 | Wnt5a | Fzd5 | DWnt10 | |
| WNT5B | FZD8 | Wnt5b | Fzd6 | 7 Total | 5 Total |
| WNT6 | FZD9 | Wnt6 | Fzd7 | | |
| WNT7A | FZD10 | Wnt7a | Fzd8 | | |
| WNT7B | SMOH | Wnt7b | Fz9 | | |
| WNT8A | | Wnt8a | Fzd10 | | |
| WNT8B | | Wnt8b | smo | | |
| WNT9A | | Wnt9a | | | |
| WNT9B | | Wnt9b | | | |
| WNT10A | | Wnt10a | | | |
| WNT10B | | Wnt10b | | | |
| WNT11 | | Wnt11 | | | |
| WNT16 | | Wnt16 | | | |
| 19 Total | 11 Total | 19 Total | 13 Total | | |

| WORM | |
|----------------|----------------|
| Wnt | Fz |
| Cwn-1 | Lin-17 |
| Cwn-2 | Mom-5 |
| Lin-44 | Mig-1 |
| Mom-2 | |
| Egl-20 | |
| 5 Total | 3 Total |

Figure 18 : Désignation des protéines Wnts et Frizzled chez quatre espèces différentes. Liste des protéines Wnt et Fz présentes chez l'homme, la souris, la drosophile et le nématodes. Ces informations ont été recueillies sur le site d'information Wnt Homepage (www.stanford.edu/group/nusselab) du Dr. Nusse (Speese and Budnik, 2007).

La classification physiologique fut établie selon l'induction ou non d'un axe dorso-ventral au cours de l'embryogénèse du xénope. Si la protéine Wnt provoque cette induction, elle sera qualifiée de ligand canonique. Dans le cas contraire, de non canonique.

Les ligands Wnts se fixent au récepteur à 7 domaines transmembranaires Fz qui se dimérise avec son corécepteur Low-Density Lipoprotein (LDL) receptor-related protein 5/6 (LRP5/6). Le complexe ainsi formé active la protéine Dishevelled (Dvl) qui est un carrefour de trois voies de signalisation :

- la **voie canonique ou Wnt/ β -caténine** stabilise la β -caténine permettant son accumulation au noyau et la régulation transcriptionnelle de gènes cibles (Figure 19) ;
- la **voie PCP** (Planar Cell Polarity) aboutit à l'activation de GTPases (comme RhoA) et de kinases (comme JNK). Cette voie est surtout impliquée dans la migration et la polarisation cellulaire ;
- la **voie calcique**, passe par les protéines G, active la PLC et augmente ainsi la concentration intracellulaire en calcium

Je me concentrerai ici uniquement sur la **voie canonique ou Wnt/ β -caténine**.

1.1. La voie Wnt canonique

En l'absence du ligand Wnt, le complexe Axine composé des protéines Axine, du suppresseur de tumeur *adenomatous polyposis coli* (APC), de la caséine kinase 1 (CK1) et de la Glycogen Synthase Kinase 3 β (GSK3 β), phosphoryle la β -caténine. Cette phosphorylation qui a lieu dans la partie N-terminale entraîne la reconnaissance de la β -caténine par une ubiquitine ligase β -Transducing Repeat-Containing Protein (β -Trcp) et provoque son adressage et sa dégradation dans le protéasome (Figure 19 A).

Au sein de la voie canonique, en présence de ligands Wnts, le récepteur Fz se dimérise avec son co-récepteur LRP5/6 qui est phosphorylé par Dvl. Il recrute le complexe Axine à la membrane qui, ainsi séquestré, ne peut plus phosphoryler la β -caténine. Celle-ci peut désormais s'accumuler dans le cytoplasme puis passer dans le noyau où elle se fixe à ses éléments de réponse T Cell Factor (TCF) et Lymphoid Enhancer binding Factor 1 (LEF). La fixation sur les TCF/LEF entraîne la transcription des gènes cibles comme la cycline D1 ou la connexine 43 (Figure 19 B).

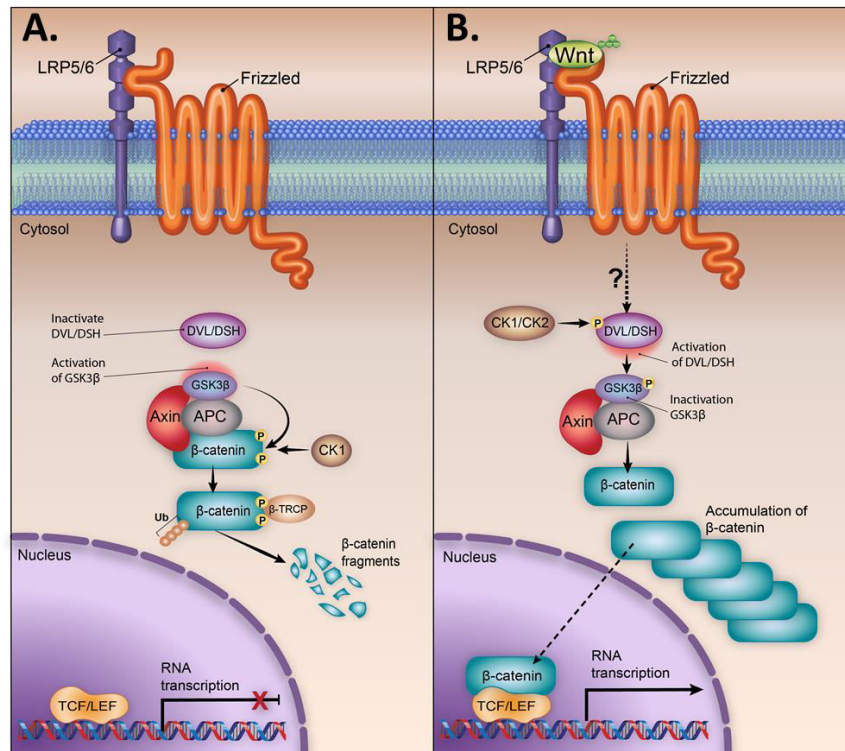


Figure 19 : La voie Wnt/ β -caténine canonique. A) L'absence de ligand Wnt sur le récepteur FZ conduit à la dégradation de la β -caténine. La voie Wnt/ β -caténine est inactive. B) La liaison du ligand Wnt sur son récepteur FZ augmente la durée de vie de la β -caténine (d'après <https://mutagenetix.utsouthwestern.edu>)

1.2. Rôles de la voie Wnt/ β -caténine dans les oligodendrocytes

| Oligodendrocyte Progenitor (OPC) | Immature Oligodendrocyte | Mature oligodendrocyte |
|----------------------------------|--------------------------|------------------------|
| PDGFR α | O4 | MBP |
| A2B5 | CNP | ASPA |
| Olig1 nucléaire | Galc | PLP |
| Sox10 | NG2 | CC1 |
| NG2 | olig2 | CNP |
| Olig2 | | Galc |
| | | olig2 |

Tableau 2 : Liste des principaux marqueurs de différenciation oligodendrocytaire cités dans la suite de ce chapitre.

1.2.1. Les ligands Wnt

Lors de la période embryonnaire précoce, les précurseurs d'oligodendrocytes (OPC) sont situés dans la région ventrale de la moelle épinière (Lu et al., 2000)(Zhou et al., 2000),.

Cette disposition spatiale est régulée par des gradients de signaux positifs et négatifs. Sonic hedgehog (Shh), une protéine sécrétée par la notochorde et le plancher de la moelle épinière (Orentas et al., 1999), est importante pour la survie des OPC. En effet, l'inhibition de la voie Sonic hedgehog (Shh) provoque leur mort (Nery et al., 2001). A la même période, la région dorsale de la moelle épinière est pauvre en OPC. Le toit de la moelle épinière et ses régions limitrophes expriment à E11 les ARNm des ligands Wnts canoniques: Wnt 1, Wnt 3 et Wnt 3a. Ces ligands bloquent la différenciation des OPC en oligodendrocytes immature O4+ afin de maintenir leur pouvoir prolifératif et migratoire. A E13, l'expression des ligands Wnts a fortement diminué. A E14, des cellules O4+ sont détectées dans la région dorsale de la moelle épinière (Shimizu et al., 2005). En 2009, Feigenson *et al* (Feigenson et al., 2009) aboutissent aux mêmes conclusions en utilisant des cultures primaires de cerveau de rat P1 traitées par Wnt 3a. Ce ligand diminue la quantité d'oligodendrocytes myélinisants (MBP) sans pour autant provoquer de variation du nombre d'OPC (A2B5+) (Figure 20). L'effet de Wnt3a est indépendant de processus apoptotiques ou prolifératifs.

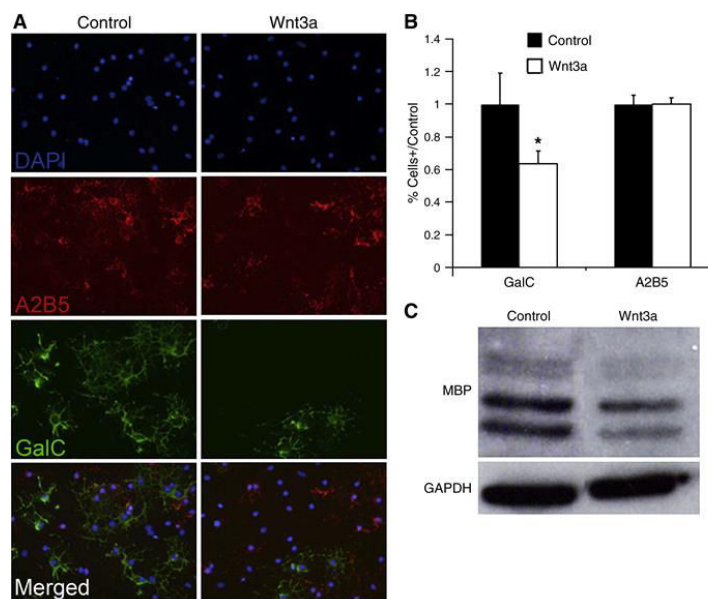


Figure 20 : Wnt3a ralentit la différenciation des oligodendrocytes. A et B) Wnt3a (50 ng/ml) diminue le nombre de cellules marquées par GalC sans changer celles marquées par A2B5 (Immunohistochimique) dans une culture primaire de cerveau de rat P1. C) Wnt3a (50 ng/ml) diminue l'expression de MBP dans une culture primaire de cerveau de rat P1 (Feigenson et al., 2009).

Le traitement par Wnt 1 ou par Wnt 3a de cultures primaires de cellules gliales de souris enrichies en OPC ne stimule pas l'expression de PLP. En revanche, le même traitement sur une culture primaire de cellule gliale de souris enrichie en oligodendrocytes provoque une augmentation de l'expression de PLP. Des résultats similaires à ceux observés sur cultures primaires de cellules gliales de souris enrichie en oligodendrocytes sont constatés sur la lignée 158N après traitement par Wnt1 (Tawk et al., 2011). Cette lignée oligodendrocytaire exprime les marqueurs spécifiques des oligodendrocytes ainsi que les protéines (PLP, MBP) et les lipides de la myéline (Feutz et al., 2001).

Ces constatations suggèrent que les ligands Wnts exercent un effet différentiel selon le stade de développement oligodendrocytaire. Ils pourraient ralentir la différenciation des OPC, mais renforcer l'expression des gènes de la myéline dans les oligodendrocytes matures.

1.2.2. La β -caténine

Les souris dont la β -caténine est mutée pour être constitutivement active (β -Cat-CA) spécifiquement dans les cellules olig2+ (Fancy et al., 2009) ou les cellules CNPase+ (Feigenson et al., 2009) présentent également un retard dans la différenciation des oligodendrocytes et des cellules de Schwann. A P9/P15, le nombre de cellules PLP+ est réduit malgré une densité de cellules olig2+ équivalentes au WT. Ces animaux souffrent d'ataxie, de tremblements et d'hypomyélinisation. Mais ce phénotype est transitoire. En effet, ces souris rattrapent leur retard de différenciation au cours du développement. A l'âge adulte, le nombre d'oligodendrocytes matures (Aspartoacylase+ (ASPA) et PLP+) et d'axones myélinisés dans la moelle épinière est pratiquement identique à celui des WT (Figure 21). La surexpression de la β -caténine ralentit donc la différenciation oligodendrocytaire mais ne l'abolit pas. A l'inverse, les souris dont la β -caténine est invalidée spécifiquement dans les cellules olig1+ connaissent, dans la moelle épinière, une présence précoce d'oligodendrocytes matures durant l'embryogenèse (Ye et al., 2009). Cependant, il est à noter que la β -caténine intervient dans plusieurs voies de signalisation (avec Akt par exemple). Il est donc hasardeux de relier ces observations à la voie Wnt uniquement.

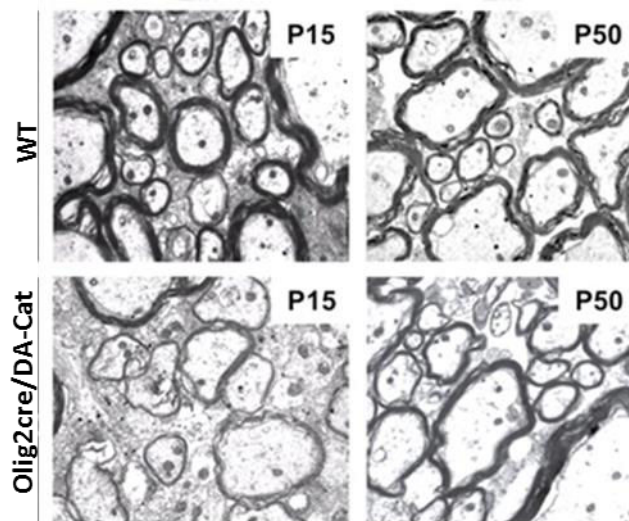


Figure 21 : Les souris β Cat-CA souffrent d'hypomyélinisation durant leur développement mais rattrapent leur déficit à l'âge adulte. Image en microscopie électronique de coupes transversales de moelle épinière de souris WT ou surexprimant le β -caténine spécifiquement dans les cellules olig2+, à P15 et P50 (Fancy et al., 2009).

En revanche, dans les 158N la surexpression de la β -caténine constitutivement active, grâce au vecteur d'expression NL- β -caténine (NL : Nuclear Localization), provoque une augmentation de l'activité transcriptionnelle de PLP. L'effet contraire est mis en évidence lors de la réduction de l'expression de la β -caténine par siRNA (Tawk et al., 2011).

Ici encore, comme dans le cas des ligands Wnts, nous pouvons penser à un impact biphasique de la β -caténine lors du processus de différenciation oligodendrocytaire.

1.2.3. Les constituants de la voie Wnt/ β -caténine

Les constituants du complexe de dégradation de la β -caténine

L'Axine 2 fait partie du complexe protéique impliqué dans la dégradation de la β -caténine. Cette dernière régule directement l'expression de l'Axine 2 afin d'assurer une boucle de rétrocontrôle. L'ARNm codant pour l'Axine 2 est détecté uniquement dans les OPC (Nkx2.2+) alors que la protéine Axine 2 est présente dans les oligodendrocytes (CC1+). Ceci pourrait indiquer que la voie Wnt/ β -caténine est active dans les OPC et éteinte dans les oligodendrocytes. L'inactivation de l'Axine 2 chez la souris (Axine2KO) provoque un retard dans la différenciation des OPC en oligodendrocytes.

Dans le cerveau sain humain et murin, l'ARNm Axine 2 n'est pas détectée. Cependant, en cas de lésions ou dans la pathologie de la sclérose en plaques, cet ARNm est détecté dans les OPC, suggérant une remise en marche de la voie Wnt/ β -caténine. Cette réactivation peut-elle être les prémisses d'une tentative de réparation, ou bien d'un blocage de la différenciation ?

Les souris invalidées pour l'Axine2 et lésées par la lysolecithine présentent un retard dans la remyélinisation, retard provoqué par un délai plus important dans la différenciation des OPC (Nkx2.2+). La tankyrase est une enzyme qui promeut la dégradation de l'Axine 2 par le protéasome. Après lésions, l'inhibition de cette enzyme par XAV939 accélère la remyélinisation (Figure 22). XAV939 n'a pas d'effet toxique sur les OPC. Il ne modifie ni leur prolifération ni leur recrutement. Il ne fait qu'accélérer leur différenciation en oligodendrocytes (Fancy et al., 2011).

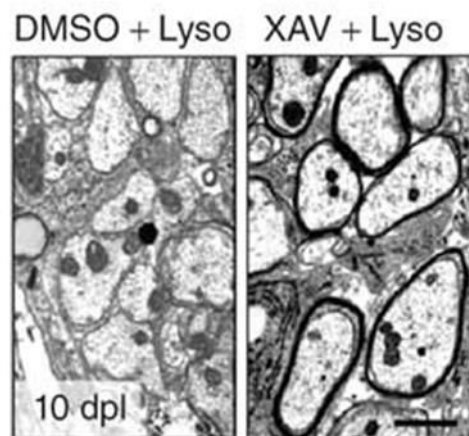


Figure 22 : XAV39 accélère la remyélinisation après lésion de la moelle épinière par la lysolecithine. Image en microscopie électronique, à 10dpl (jour post lésion), de coupes transversales de moelle épinière de souris lésée par la lysolecithine et traité ou non par XAV39 (Fancy et al., 2011).

L'APC, comme Axine2, fait partie du complexe de dégradation de la β -caténine. Les souris dont l'expression d'APC a été diminuée génétiquement (une seule copie fonctionnelle d'APC) présentent une expression accrue de la β -caténine. Comme attendu, ces animaux ont une remyélinisation post-lésionnelle plus lente que les souris WT (Fancy et al., 2011).

LRP6, Dvl et TCF3

LRP6 et Dvl sont deux constituants clés de la voie Wnt/ β -caténine. La transfection des dominants négatifs de LRP6 (LRP6 Δ C) et de Dvl (Dvl-dn) inhibe fortement le signal Wnt (Tamai et al., 2000). L'expression de ces dominants négatifs, dans les 158N, provoque une diminution de l'activité transcriptionnelle du promoteur PLP. La même réponse est observée après l'inactivation partielle de chacun des quatre facteurs de transcription (TCF1, LEF1, TCF3 et TCF4) dans les 158N. Chez le poisson zèbre, la mutation de TCF3 ou de LRP6 au démarrage de l'expression des gènes de la myéline (2 day post fécondation (dpf)) empêche la mise en place de l'expression de *MPZ* et *PLP* (Figure 23).

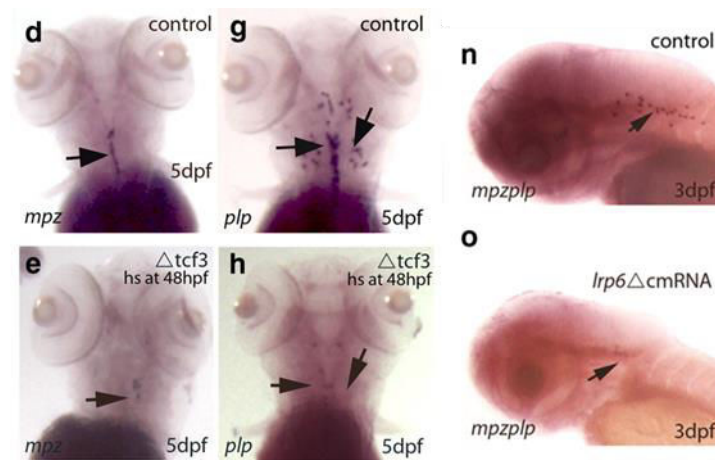


Figure 23 : Effets de la perturbation de la voie Wnt/ β -caténine sur l'expression du gène de la myéline centrale *mbp* et *mpz*. La mutation de TCF3 et l'injection du dominant négatif LRP6 Δ C provoque une inhibition de l'expression de *mbp* et *mpz* (visualisé par hybridation in situ) chez le poisson zèbre à 3 et 5 dpf (Tawk et al., 2011).

TCF4

L'étude du rôle de TCF4 dans la différenciation oligodendrocytaire est très intéressante. Elle montre la complexité d'interprétation de ces mécanismes.

Hui Fu *et al*, en 2009, caractérisent l'expression de TCF4 dans la zone ventrale de la moelle épinière de souris. A E13.5, ils détectent les ARNm codant pour TCF4. La protéine ne commence à être exprimée que plus tardivement, à E18.5. L'expression maximale de TCF4 se situe entre P10 et P14. A l'âge adulte, seule la substance grise exprime encore TCF4. Mais il est de nouveau exprimé dans la substance blanche à la périphérie d'une lésion, lieu de la

remyélinisation (Fu et al., 2009). Ce profil d'expression est remarquable car il se superpose à celui d'Olig1 (ARN à E9, protéine à E18.5) (Lu et al., 2000).

Fancy *et al* s'accordent avec Hu *et al* sur cette cinétique d'expression. Ils indiquent que chez l'homme et la souris, TCF4 est exprimé pendant la phase juvénile et est absent à l'âge adulte. Il ne sera réexprimé que lors du processus de remyélinisation post-lésionnel (Fancy et al., 2009).

Les deux auteurs indiquent également que l'expression de ce facteur de transcription est strictement limitée aux cellules olig2+. En revanche, ils sont en désaccord sur les stades de différenciation de ces cellules. Hui Fu *et al* indiquent que 90% des cellules olig2+ exprimant TCF4 sont CNPase+. Les marqueurs de différenciation se recoupant, 30 à 50% de ces cellules sont NG2+ et 30 à 50% sont aussi MBP+. Donc TCF4 est majoritairement exprimé dans des oligodendrocytes prémyélinisants post-mitotiques (pas de colocalisation de TCF4 et de Ki67) (Fu et al., 2009). Fancy *et al* montrent que TCF4 n'est exprimé que par les OPC puisqu'il colocalise avec Olig1 nucléaire et PDGFR α , contrairement aux cellules olig2+ exprimant les marqueurs oligodendrocytaires plus tardifs (PLP exon3b et Olig1 cytoplasmique) (Fancy et al., 2009).

La même année, Ye et al adoptent un point de vue intermédiaire. Cette étude montre que TCF4 n'est exprimé que dans les cellules de la lignée oligodendrocytaire Olig2+. Aucun signal TCF4 n'est détecté ni dans les astrocytes ni dans les neurones. TCF4 est présent dans les OPC PDGFR α +. Mais il est aussi exprimé, de façon encore plus importante, dans les oligodendrocytes différenciés CC1+ (Figure 24) (Ye et al., 2009).

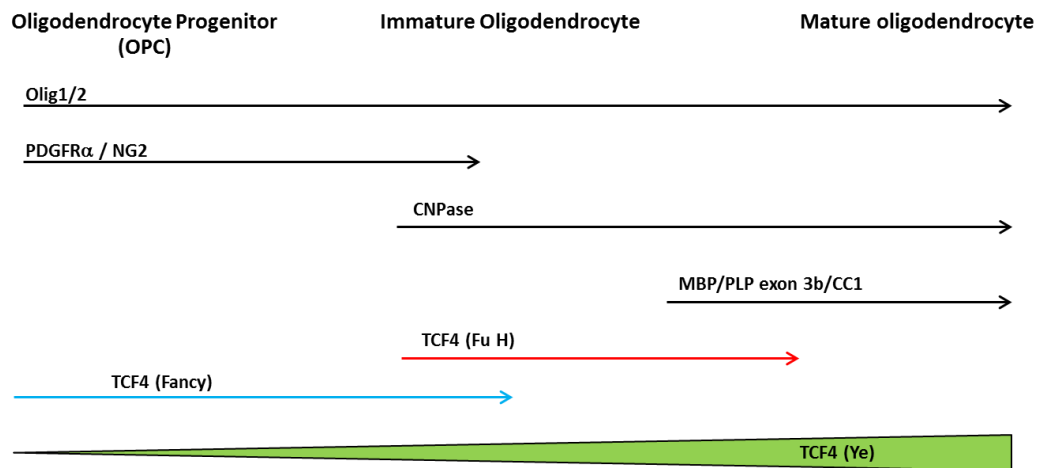


Figure 24 : Représentation schématique de la temporalité d'expression de TCF4 dans le lignage oligodendrocytaire selon les différents auteurs. Le niveau d'expression de TCF4 en fonction du stade de différenciation des oligodendrocytes reste encore controversé.

Ye *et al* et Hui Fu *et al* ont étudié les conséquences de l'inactivation de TCF4 (TCF4KO) dans le lignage oligodendrocytaire de la moelle épinière respectivement à E17, 5 et à P0. Ces souris meurent rapidement après leur naissance. Les deux auteurs publient des résultats similaires. Cette inactivation n'a aucun impact sur la spécification des oligodendrocytes. La quantité de cellules Olig2+ et OPC PDGFR α + est identique à celle observée chez le WT. En revanche chez la souris TCF4KO, il est impossible de détecter des oligodendrocytes pré-myélinisants (CNP+) et myélinisants (MBP+ et PLP+). TCF4 est donc un facteur de transcription essentiel pour la différenciation des oligodendrocytes (Ye *et al.*, 2009) (Fu *et al.*, 2009).

Hui Fu *et al* ont également montré que l'ensemble des cellules TCF4+ de moelle épinière de souriceaux P5 et de culture mixte de cellules gliales présentaient un marquage nucléaire β -caténine intense. TCF4 serait, dans ce cas, un facteur de transcription positif (interaction avec la β -caténine) pour la différenciation des OPC (Fu *et al.*, 2009).

1.2.4. Les HDACs

Les histones deacetylases (HDACs) se liant à l'histone H3 sont indispensables à l'expression des gènes de la myéline (Shen *et al.*, 2005). Les souris spécifiquement invalidées pour les HDAC1 et HDAC2 (dCKO) dans les oligodendrocytes (Cre: Olig1) souffrent de

tremblements sévères causés par une hypomyélinisation du SNC. Elles meurent vers leur 12^{ème} jour post natal. A E12.5, des cellules Olig2+ sont présentes dans la zone ventrale de la moelle épinière. En revanche à E16.5, on ne détecte aucun OPC PDGFR α +, NG2+ ou d'oligodendrocytes exprimant les ARNm de PLP ou MBP. Ce déficit persiste chez ces souris même pendant la vie post natale. A partir de cultures primaires de cortex embryonnaire dCKO, il est possible d'obtenir une quantité d'OPC PDGFR α + identique à celle des WT. Mais ces OPC sont incapables de poursuivre leur différenciation.

Les dCKO n'ont aucune anomalie touchant les motoneurones ou les astrocytes. HDAC1 et 2 sont donc importantes pour la spécification et la différenciation des oligodendrocytes (Ye et al., 2009).

Yin Yang 1 (YY1) est un facteur de transcription interagissant avec HDAC1 et 2 spécifiquement dans les oligodendrocytes. Les souris KO YY1 (Cre: CNP) souffrent à P14 de tremblements et d'ataxie. Ceci est causé par un défaut de différenciation oligodendrocytaire. Ces animaux ont une expression d'ID4 (protéine inhibant l'expression des gènes de MBP (Gokhan et al., 2005)) et de TCF4 supérieure à celle observée chez les WT. Les promoteurs de ces 2 gènes contiennent des sites de liaisons pour YY1. Les expériences d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) montrent que la liaison de HDAC1 sur ces sites augmente au cours de la différenciation, ce qui provoque une diminution de l'expression de TCF4 et d'ID4, permettant ainsi l'expression de MBP (Figure 25) (He et al., 2007).

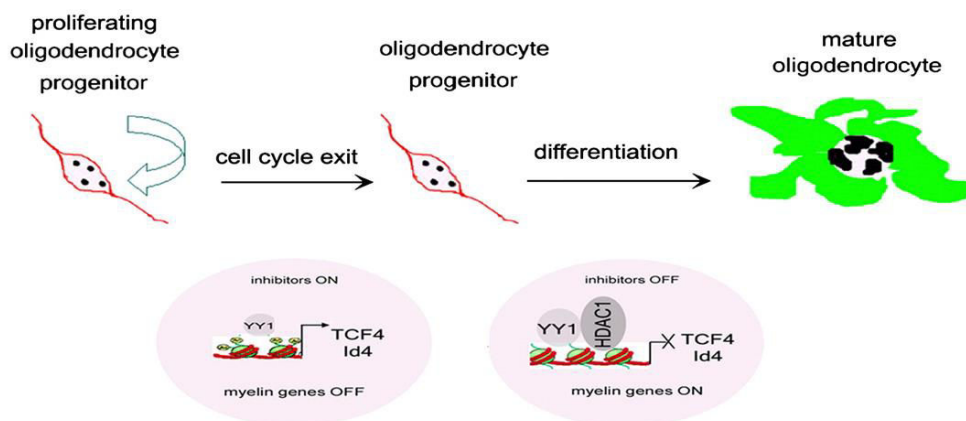


Figure 25 : YY1 et HDAC1/2 permettent l'expression de MBP en réprimant celle d'Id4 et de TCF4 (He et al., 2007). Id4 et TCF4 répriment la différenciation des OPC en inhibant l'expression de MBP.

Les HDAC1/2 régulent négativement la voie Wnt/ β -caténine. En effet, les cultures primaires de cortex embryonnaire dCKO présentent une quantité élevée de β -caténine nucléaire active en comparaison des WT. Le traitement de ce type de culture primaire par Wnt3a augmente l'expression d'ID4 et ID2. De même, la transfection des cellules Human Cortical Neuronal (HCN) (cellules reconnues comme modèles d'études pour étudier la différenciation des oligodendrocytes (Hsieh et al., 2004)) par le vecteur d'expression de la β -caténine constitutivement active (Δ N98 β -caténine) augmente l'activité transcriptionnelle des promoteurs ID4 et ID2; et elle diminue celle de MBP. La cotransfection de HDAC1 ou 2 empêche les effets de la β -caténine sur ces promoteurs. Mais ces protéines sont incapables d'interagir directement ensemble. Ye *et al* proposent un modèle où la β -caténine et les HDAC1 et 2 sont en compétition afin d'interagir avec TCF4. Si l'équilibre est en faveur de la β -caténine, la différenciation oligodendrocytaire est alors inhibée par l'expression d'ID2 et ID4. Si les HDAC1 et 2 dissocient ou diminuent le complexe TCF4/ β -caténine, les oligodendrocytes peuvent poursuivre leur différenciation (Figure 26) (Ye et al., 2009).

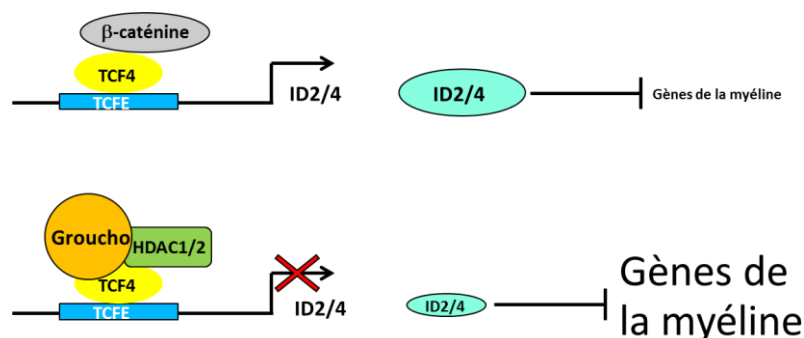


Figure 26 : Compétition entre la β -caténine et les HDAC1/2 pour la liaison avec TCF4. Inspiré de (Li and Richardson, 2009). L'expression des gènes de la myéline dépend de la quantité d'ID2/4, modulée par la balance entre la β -caténine et Groucho/HDACs.

1.2.5. Contrôle du cycle cellulaire

Deux évènements sont nécessaires au processus de différenciation oligodendrocytaire. Le premier est l'expression des facteurs de transcription positifs et négatifs impliqués dans ce mécanisme. Le second est une sortie du cycle cellulaire afin d'arrêter la prolifération des OPC (Durand et al., 1998). Wnt semble impliqué dans ces deux évènements (le premier étant abordé dans la partie ci-dessus). Bien que certaines études indiquent que Wnt n'a aucun effet

sur la prolifération de ces progéniteurs (Shimizu et al., 2005) (Feigenson et al., 2009), d'autres articles prouvent le contraire.

Dans les OPC, les ligands Wnt ainsi que PDGFR α (grâce à la phosphorylation de LRP6 et de GSK3 β) augmentent la quantité de β -caténine active. Celle-ci favorise alors l'expression de la cycline D1 permettant ainsi leur prolifération.

Le facteur de transcription Sox17, dont le pic d'expression dans le corps calleux de rat se situe à P18, promeut l'arrêt du cycle cellulaire des OPC et stimule l'activité transcriptionnelle du promoteur du gène MBP (Sohn et al., 2006). Pour ce faire Sox17 inhibe la β -caténine en:

- augmentant l'expression de SFRP1 (Secreted Frizzled-related protein 1), antagoniste des ligands Wnt sur le récepteur Frizzled
- activant la GSK3 β , phosphorylant ainsi la β -caténine
- se complexant à la β -caténine afin d'empêcher l'expression de la cycline D1

En conséquence, l'expression de la cycline D1 est diminuée, le cycle cellulaire est arrêté annonçant la fin de la phase proliférative et le début de la phase de différenciation (Chew et al., 2011).

Les cellules NG2+ de la substance blanche du cervelet de souris se divisent et se différencient plus rapidement en oligodendrocytes que les cellules NG2+ de la substance grise corticale. Ceci est dû à une sensibilité plus importante à l'action proliférative du facteur de croissance PDGF grâce, entre autre à la voie Wnt/ β -caténine (Hill et al., 2013). La voie Wnt/ β -caténine exerce également un effet prolifératif intense sur les cellules NG2+ de la zone sub épendymaire (ZSE) (Ortega et al., 2013).

1.2.6. La spécification

Les NPC (Neural Precursor Cell) sont des cellules souches pouvant se différencier en neurones, astrocytes et oligodendrocytes. L'infection de ces précurseurs par un rétrovirus codant pour la forme active de la β -caténine, favorise leur différenciation en neurones (Tubuline III+). Ces derniers expriment des ligands de la famille des TGF β : les BMPs. Grâce à

son action paracrine, ce facteur de croissance permet la différenciation des NPCs en astrocytes (GFAP+). En revanche, il inhibe la différenciation de ces précurseurs en oligodendrocytes (PLP+, MBP+). La β -caténine, par un mécanisme d'action indirect faisant intervenir les BMPs, empêche la différenciation des NPCs en oligodendrocytes (Figure 27) (Kasai et al., 2005).

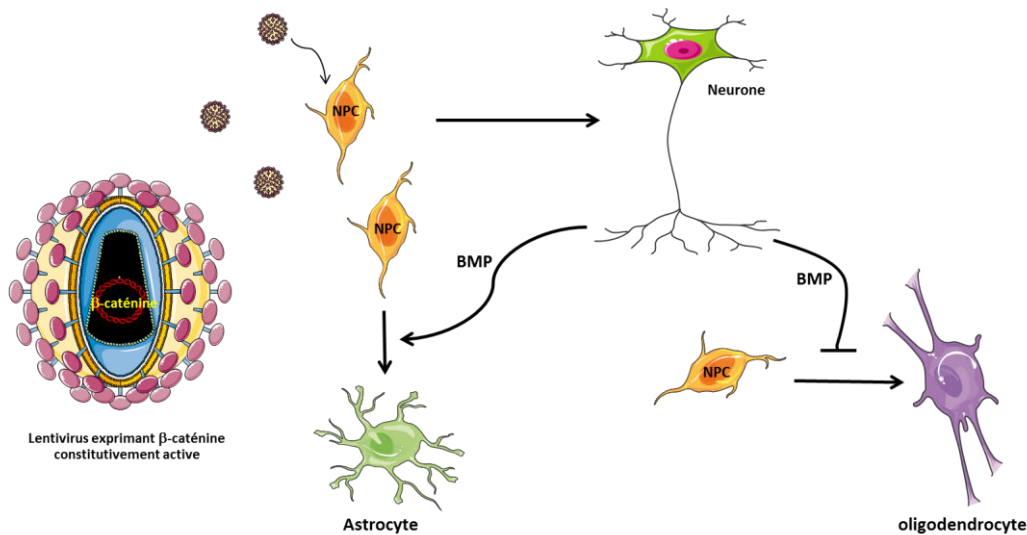


Figure 27 : La surexpression de la β -caténine constitutivement active influe sur le devenir des NPCs. La suractivation de la β -caténine dans les NPCs induit leur différenciation en neurones. Par la sécrétion de BMP, ces derniers favorisent la différenciation des NPCs en astrocytes et inhibent la différenciation des NPCs en oligodendrocytes.

Chez la souris adulte, la ZSE est connue pour être une région riche en NPCs. Les NPCs de sa région ventro-latérale, exprimant un niveau élevé de BMP, sont à l'origine des neurones et des astrocytes du bulbe olfactif. La région dorsale exprime quant à elle les constituants de la voie Wnt ainsi que ses ligands canoniques comme Wnt3. Les NPCs de cette région sont à l'origine des oligodendrocytes et des astrocytes du corps calleux, de la substance blanche du striatum et du fornix chez l'adulte.

Le traitement par Wnt3a de cultures primaires issues de la région dorso-latérale de la ZSE ou la surexpression de Wnt3 grâce à un lentivirus injecté dans la ZSE augmente la quantité de précurseurs d'oligodendrocytes (NG2+, Olig2+ et PDGFR α +). Cet effet pro oligodendrocytaire est causé par un raccourcissement de leur cycle cellulaire grâce à l'expression de la cycline D1. Les ligands Wnts canoniques ont donc un effet prolifératif sur les cellules NG2+ de la ZSE.

Par contre, l'adressage du lentivirus codant pour TCF4 dans la région dorsale de la ZSE provoque une baisse du nombre d'oligodendrocyte Olig2+, PDGFR α + (Ortega et al., 2013).

Chez le poisson zèbre, les pMN (précurseurs de motoneurones) sont des cellules gliales radiales exprimant Olig2+. Dans la zone ventrale de la moelle épinière ces cellules sont à l'origine des motoneurones et des OPCs (Lu et al., 2000). Les pMN expriment également le récepteur Frizzled 8a (Fz8a). L'invalidation de ce récepteur par un oligomorpholino spécifique provoque une diminution de leur pouvoir prolifératif ainsi que leur désorganisation spatiale. Il en résulte une baisse du nombre d'OPCs (Sox10+) et de motoneurones secondaires SMNII. Fz8a semble donc jouer un rôle déterminant dans la spécification et la maturation des pMN en OPCs (Kim et al., 2008).

1.2.7. Le Lithium et autres inhibiteurs de la GSK3 β

La GSK3 β est une enzyme jouant un rôle clé dans la destinée cellulaire grâce à son interaction avec de nombreuses voies de signalisation contrôlant la prolifération et la différenciation. L'activité de cette enzyme peut être modulée négativement par certaines molécules comme le Lithium chloride ou ARA-014418. L'administration de ces inhibiteurs *in vivo* dans le ventricule latéral de souris ou dans le milieu de culture de tranches organotypiques de nerf optique de souris (P7-P11) provoque une multiplication du nombre d'OPCs PDGFR α + et d'oligodendrocytes myélinisants MBP+. L'inhibition de la GSK3 β stimule la prolifération et la survie des OPCs grâce notamment à une augmentation de la β -caténine nucléaire dans les OPCs Sox10+. Le ligand canonique Wnt3a empêche la différenciation des oligodendrocytes. Cet effet est l'inverse de celui observé avec les inhibiteurs de la GSK3 β . Il est important de noter que ces inhibiteurs annulent l'effet de Wnt3a sur les oligodendrocytes. Donc contrairement aux OPCs, dans les oligodendrocytes plus tardifs l'action du lithium ou de ARA-014418 serait indépendante de la voie Wnt/ β -caténine. L'inhibition de la GSK3 β augmente l'activité de CREB (C-AMP Response Element-binding protein) et diminue celle de Notch. Ces deux facteurs de transcription sont connus pour respectivement induire et réprimer la différenciation et la myélinisation des oligodendrocytes (Figure 28) (Azim and Butt, 2011).

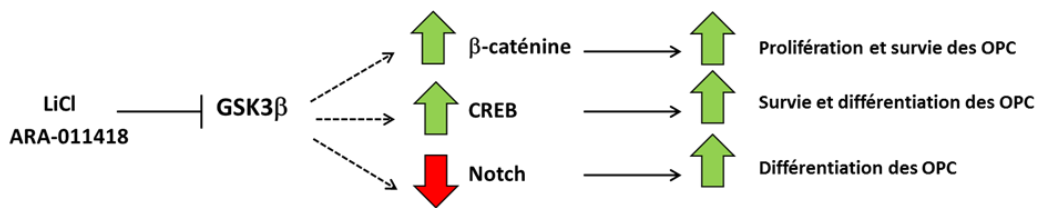


Figure 28 : Effets multiples des inhibiteurs de la GSK3 β sur la lignée oligodendrocytaire. Les inhibiteurs de la GSK3 β influencent divers processus de la myélinisation en modulant plusieurs voies de signalisations.

Chez le poisson zèbre, l'inhibition de la GSK3 β par le 6-bromoindirubin-3'-oxime (Bio) et par le lithium provoque une importante apoptose des OPCs Sox10+ de la moelle épinière entraînant *in fine* une réduction du nombre d'oligodendrocytes myélinisants DM20+ (Kim et al., 2008).

1.3. Rôles de la voie Wnt/ β -caténine dans les cellules de Schwann

1.3.1. Expression des composants et activité de la voie Wnt/ β -caténine

Les constituants ainsi que les ligands de la voie Wnt/ β -caténine sont exprimés par les CS du nerf sciatique de souris. Cette expression débute précocement (E12.5) et se poursuit au cours du développement.

Grâce à la souche de souris transgéniques Axin2-lacZ, il a été montré que la voie Wnt/ β -caténine endogène avait un pic d'activité, dans la CS, durant la période fœtale tardive (E15.5-E17.5)(Grigoryan et al., 2013). De plus, les niveaux d'expression des ARNm des ligands Wnts, dans le nerf sciatique, sont directement corrélés avec ceux des gènes de la myéline périphérique (Tawk et al., 2011).

1.3.2. La voie Wnt/ β -caténine est essentielle à la myélinisation

Le rôle clé de la voie Wnt/ β -caténine dans la myélinisation du SNP a été démontré pour la première fois chez le poisson zèbre. La perturbation de cette voie lors de l'initiation de la myélinisation à 2dpf, grâce à la construction du mutant transgénique *hs Δ TCF3-GFP* (où la β -caténine est incapable d'interagir avec le TCF3 muté après un choc thermique) ou par l'injection du dominant négatif *LRP6 Δ C*, provoque une inhibition de l'expression du gène de la myéline périphérique MBP et un arrêt de la formation de la gaine de myéline autour de l'axone, aboutissant à une gaine décompactée (Figure 29) (Tawk et al., 2011).

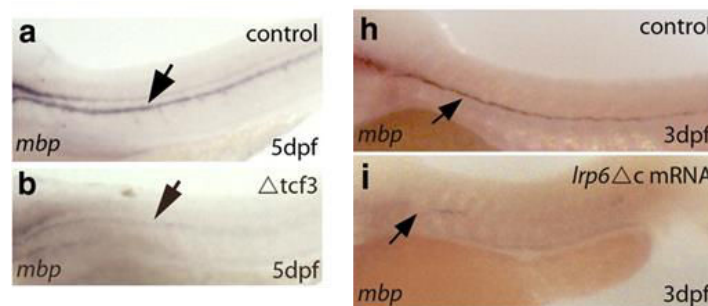


Figure 29 : Effets de la perturbation de la voie Wnt/ β -caténine sur l'expression du gène de la myéline périphérique *mbp*. La mutation de TCF3 et l'injection du dominant négatif LRP6 Δ C provoque une inhibition de l'expression de *mbp* (visualisé par hybridation *in situ*) chez le poisson zèbre à 3 et 5dpf (Tawk et al., 2011).

Comme nous l'avons vu précédemment, le destin des CS immatures dépend de leur association aléatoire avec les axones. Si le diamètre de l'axone est supérieur à 1 μ m, la CS immature évoluera en CS myélinisante. En revanche, si le diamètre de l'axone est inférieur à 1 μ m, la CS englobera plusieurs axones afin de former des Remake bundles non myélinisants. Ce processus est appelé ségrégation unitaire (*radial sorting*). La voie Wnt/ β -caténine joue un rôle important dans cette étape. En effet, les souris dont l'expression de la β -caténine a été fortement diminuée (LOF) dans les CS présentent un retard dans la réalisation de la ségrégation unitaire ainsi qu'un nombre élevé de Remake bundles. Au contraire, les nerfs sciatiques des souris dont l'expression de la β -caténine a été fortement augmentée (GOF) ne contiennent que peu de Remake bundles. La majorité des axones de large diamètre de ces souris ont réalisé leur ségrégation unitaire de manière précoce. La β -caténine est donc

primordiale pour la ségrégation unitaire et favorise la maturation des CS immatures en CS myélinisantes.

Mais il est à noter que malgré ces différences, les souris LOF et GOF ont une la gaine de myéline plus fine que celle des WT. Il est également intéressant de constater que le profil d'expression des gènes exprimés spécifiquement dans la CS mélinisante (P0, PMP22, Prx) est identique que l'on surexprime ou invalide la β -caténine (Figure 30) (Grigoryan et al., 2013).

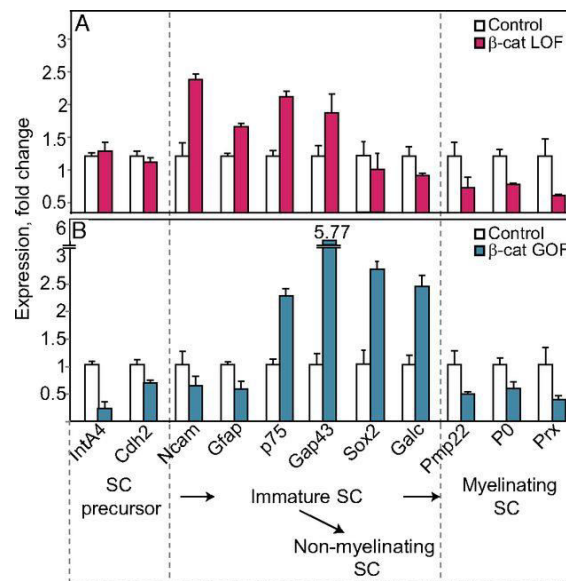


Figure 30: Expression des ARNm de différents marqueurs de la myélinisation dans le nerf sciatique des souris LOF et GOF (Grigoryan et al., 2013). Le niveau d'activation de la β -caténine module l'expression des marqueurs de différenciation de la CS.

Alors que la littérature commence à s'étoffer sur les rôles de la voie Wnt/ β -caténine dans le SNC, elle est encore pauvre concernant le SNP. Cependant dans tous les cas, nous pouvons noter que ses rôles sont multiples et parfois contradictoires selon que l'on se situe à différents stades de différenciation. De plus, nous commençons à percevoir qu'une régulation fine de la β -caténine est nécessaire. Ceci est difficilement conciliable avec les techniques d'études souvent trop grossières.

2. Les oxystérols

Les oxystérols sont des dérivés oxydés du cholestérol. Comme lui, ils sont composés de 27 atomes de carbone et possèdent un noyau stérol (Figure 31). Ils se forment soit rapidement par auto-oxydation du cholestérol soit ils sont synthétisés par des enzymes appartenant pour la plupart à la famille des cytochromes P450. Les oxystérols sont d'importantes molécules de signalisation pour la régulation de l'ensemble du métabolisme du cholestérol, des acides biliaires et des hormones stéroïdiennes. Cependant, ces composés peuvent aussi être considérés comme toxiques, renforçant ou engendrant certaines pathologies par exemple l'athérosclérose. L'oxydation du cholestérol peut avoir lieu sur le noyau stérol et plus particulièrement sur les positions 4, 5, 6 et 7. Les oxydations peuvent également se produire sur la chaîne latérale du cholestérol aux positions 22, 24, 25 et 27. Cependant, dans ce chapitre nous nous intéresserons seulement à ces derniers et aux oxystérols formés par l'oxydation du carbone en position 7 du cholestérol.

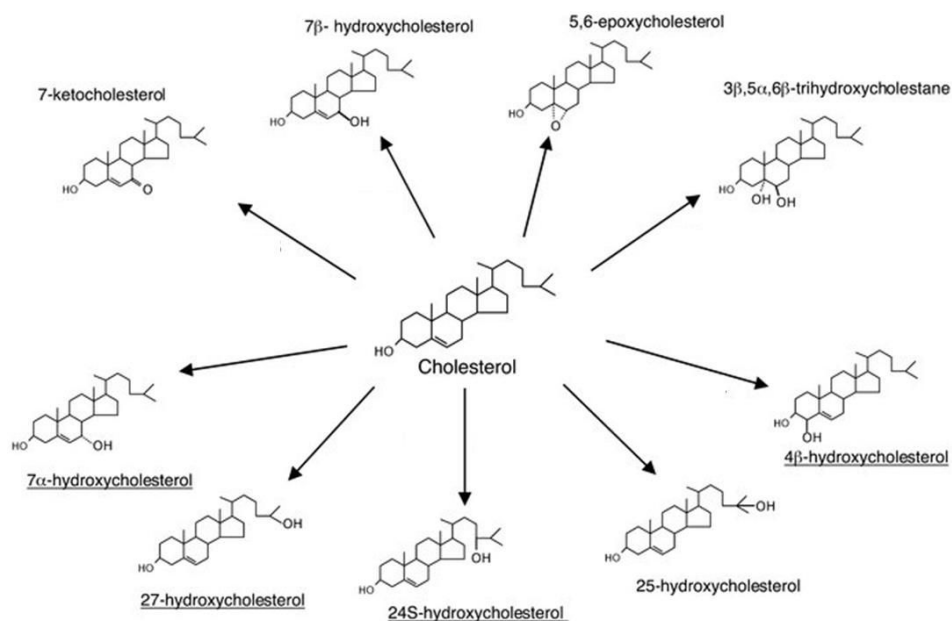


Figure 31 : Les oxystérols sont des dérivés oxydés du cholestérol (Björkhem, 2002). Ces oxydations ont lieu soit au niveau de la chaîne latérale carbonnée soit au niveau des cycles.

2.1. Formation des oxystérols

2.1.1. Les oxystérols de la chaîne latérale

L'auto-oxydation de la chaîne latérale du cholestérol est un phénomène marginal. En effet, cette dernière se situe dans la région hydrophobe des lipoprotéines. Elle se trouve ainsi protégée de ce processus. La production des oxystérols tels que le 27-hydroxycholestérol (27OH), le 24(S)-hydroxycholestérol (24(S)) ou le 25-hydroxycholestérol (25OH) est donc principalement la résultante d'une oxydation enzymatique. A chacun de ces trois oxystérols est associé une enzyme spécifique permettant leur formation. La 27-hydroxylase (CYP27A1) est ainsi responsable de la synthèse du 27OH. Le CYP46A1, aussi appelé 24-hydroxylase, est connu pour catalyser la formation du 24(S). Le 25OH est quant à lui généré par la 25-hydroxylase, une enzyme n'appartenant pas, contrairement aux 2 autres, à la famille des CYP450. Mais il est à noter que le 25OH peut aussi être produit, de façon minoritaire par chacune des enzymes précédemment citées (Russell, 2000).

2.1.2. Le 7 ketocholestérol

Le 7 ketocholestérol (7KC) est parmi les oxystérols les plus abondants de l'organisme. Il est présent en forte quantité dans les plaques d'athérosclérose (Brown et al., 1997) ainsi que dans la rétine (Rodriguez and Fliesler, 2009). Cependant, sa fonction reste à ce jour assez méconnue.

Le 7KC diffère du cholestérol par la présence d'un groupe cétone fonctionnel sur le carbone en position 7 (cycle B). Les origines de sa formation sont confuses. Cependant nous savons qu'il peut être synthétisé selon au moins 3 mécanismes:

- Absorption alimentaire: le 7KC est le principal oxystérol formé par l'oxydation du cholestérol présent dans les aliments (Nielsen et al., 1995). Il peut être absorbé par les entérocytes et transporté par les chylomicrons (Vine et al., 1997). Cependant, le 7KC est rapidement métabolisé dans le foie (Erickson et al., 1977) afin d'être éliminé dans la bile. Ainsi, le taux de 7KC provenant de l'alimentation paraît être négligeable.
- Oxydation enzymatique: plusieurs enzymes permettent la synthèse du 7KC. La 7-hydroxycholestérol déshydrogénase (7-HD) catalyse la conversion du 7 α - ou 7 β -hydroxycholestérol en 7KC (Song et al., 1998). Le niveau d'expression de cette enzyme est variable selon les espèces. Elle est exprimée à un niveau important chez le hamster, à un taux modéré chez l'homme et est absente chez le lapin, la souris et le rat. Cette distribution est

étroitement corrélée avec les degrés de résistance de ces espèces à la 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-*p*-dioxine (TCDD) (Savouret et al., 2001). Le cytochrome P450 7A1, appelé aussi 7 α -hydroxylase est l'enzyme clé de la voie classique de synthèse des acides biliaires. Cette enzyme permet également la formation du 7KC à partir du 7-déshydrocholestérol, précurseur du cholestérol et de la vitamine D3. Afin d'assurer un mécanisme de rétrocontrôle, le 7KC inhibe en retour la 7 α -hydroxylase (Shinkyô et al., 2011). La 11 β -hydroxystéroïde déshydrogénase de type 1 (11 β -HSD1) est connue pour réduire la cortisone en cortisol (Nobel et al., 2001). Mais son action sur le 7KC est ambiguë. *In vitro*, cette enzyme catalyse les interconversions du 7 α -hydroxycholestérol, 7 β -hydroxycholestérol et du 7KC. En revanche, *in vivo*, la 11 β -HSD1 fonctionne seulement comme une réductase. Elle convertit ainsi le 7KC en 7 α -hydroxycholestérol ou 7 β -hydroxycholestérol (Schweizer et al., 2004).

- Autoxydation: Il semble que l'autoxydation soit le principal mécanisme de formation du 7KC. Le 7-hydroperoxycholestérol est formé par l'action de radicaux libres sur le cholestérol. Le 7-hydroperoxycholestérol se décompose ensuite en 7 α -hydroxycholestérol, 7 β -hydroxycholestérol et en 7KC (Girotti et al., 2002).

| Enzymes | Oxystérols |
|---|---------------------------|
| 24-hydroxylase (CYP46A1) | 24(S)-hydroxycholestérole |
| 25-hydroxylase | 25-hydroxycholestérole |
| 27-hydroxylase (CYP27A1) | 27-hydroxycholestérole |
| 7-hydroxycholestérole déshydrogénase (7-HD) | 7-Ketocholestérol |
| 7 α -hydroxylase (CYP7A1) | 7-Ketocholestérol |
| 11 β -hydroxystéroïde déshydrogénase de type 1 (11 β -HSD1) | 7-Ketocholestérol |

Tableau 3 : Les enzymes impliquées dans la synthèse des oxystérols mentionnés ci-dessus.

2.2. Rôle des oxystérols dans le système nerveux

2.2.1. Homéostasie du cholestérol

Alors que le cholestérol est incapable de franchir la barrière hémato-encéphalique, les oxystérols passent aisément les membranes cellulaires et se conjuguent facilement avec les

lipoprotéines. La conversion du cholestérol en oxystérols est donc primordiale pour son excrétion cellulaire. Les deux principaux oxystérols impliqués dans ce mécanisme de transport sont le 24(S) (majoritairement) et le 27OH. Une fois la barrière hémato-encéphalique franchie, ils sont dirigés vers le foie pour y être dégradés. Les oxystérols, naturels ou synthétiques (comme le T0901317), activent également certains gènes relatifs à l'homéostasie du cholestérol tels que les transporteurs du type ATP binding cassette (ABC) (ABCA1, ABCG1, ABCG2) ou encore de l'apolipoprotéine E (ApoE). Ceci permet d'augmenter la sortie du cholestérol du SNC (Whitney et al., 2002) (Fukumoto et al., 2002) (Liang et al., 2004)(Koldamova et al., 2005) (Abildayeva et al., 2006).

2.2.2. Effets toxiques des oxystérols

Le 24(S) a été montré comme étant toxique dans un modèle cellulaire de neuroblastome humain (Kölsch et al., 1999). Il peut également induire l'expression de plusieurs gènes pro-inflammatoires dans des cocultures de cellules gliales et de neurones (HCN) (Alexandrov et al., 2005) comme la COX-2, une cyclo-oxygénase qui catalyse la formation de prostaglandines (hormones pro-inflammatoires) à partir de l'acide arachidonique.

Par ailleurs, il a été également rapporté que d'autres oxystérols comme le 25-OH, le 22(R)-hydroxycholestérol (22(R)) ainsi que le 7 β -hydroxycholestérol ont de puissants effets neurotoxiques sur la lignée neuronale PC12 (Chang and Liu, 1998) (Chang and Liu, 1997).

Il convient cependant de préciser que ces études ont été réalisées sur des cultures cellulaires traitées par des concentrations élevées d'oxystérols (50 μ M).

Le 25-OH (10 μ M) provoque également la mort de la lignée oligodendrocytaire 158N par apoptose via un mécanisme indépendant des LXR (Liver X Receptor). Cependant, ces composés induisent, par le biais de l'activation du LXR et de PXR (Pregnane X Receptor) la sécrétion de la phospholipase A2 de type IIA qui exerce un rôle protecteur partiel sur ces cellules (Trousson et al., 2009).

2.2.3. Effets bénéfiques des oxystérols

A contrario des effets toxiques précédemment cités, le 7 β -hydroxycholestérol et 7 β -hydroxycholesteryl-3-oléate ont des effets bénéfiques après hémisection de la moelle épinière. En effet, ces oxystérols stoppent la prolifération et l'activité astrocytaire (astrogliose). Les axones sérotoninergiques provenant de la partie médullaire intacte colonisent alors la zone lésée afin d'assurer sa réinnervation. (Giménez y Ribotta et al., 1995).

2.3. Implication des oxystérols dans les maladies neurodégénératives

Les oxystérols sont impliqués dans plusieurs maladies neurodégénératives dont la maladie d'Alzheimer, la sclérose en plaques et l'adrénoleucodystrophie.

2.3.1. Maladie d'Alzheimer

Le lien entre la maladie d'Alzheimer (AD) et le cholestérol semble clairement établi. Des études ont montré que le risque de développer l'AD est réduit chez les patients ayant reçu un traitement hypolipémiant (Wolozin et al., 2000). De plus, des dérégulations touchant plusieurs gènes contrôlant l'homéostasie du cholestérol (ApoE, ABCA1, LXR β ...) sont considérées comme des facteurs de risques de l'AD (Puglielli et al., 2003). En revanche, le rôle propre des oxystérols dans l'AD est beaucoup plus contradictoire. Certaines études leur attribuent un effet toxique alors que d'autres révèlent un effet bénéfique voire un potentiel thérapeutique. Cette opposition est sans doute en partie causée par le grand nombre de composés constituant la famille des oxystérols et donc leurs hétérogénéités de structure et de mécanismes d'action. Pour ajouter à la complexité, il est également important de préciser que ces molécules peuvent s'interconvertir.

Alors que le relargage de 24(S) du cerveau diminue avec l'âge, les niveaux de 24(S) dans le plasma et le liquide céphalorachidien sont augmentés dans les premiers stades de l'AD (Papassotiropoulos et al., 2002) (Lütjohann et al., 2000). Néanmoins, le niveau plasmatique de 24(S) est réduit dans les stades plus avancés (Bretillon et al., 2000) (Papassotiropoulos et al.,

2000). Cela pourrait laisser penser que la quantité d'oxystérols reflète le nombre et l'état des neurones.

Dans un cerveau sain, CYP46A1 et CYP27A1 sont situées dans les neurones et les astrocytes. CYP27A1 est également localisé dans les oligodendrocytes. Les cerveaux de patients souffrant d'AD montrent une localisation différente de ces enzymes. CYP46A1 est majoritairement exprimée dans les astrocytes et autour des plaques amyloïdes, alors que l'expression de CYP27A1 est diminuée dans les neurones mais fortement augmentée dans les oligodendrocytes. Cette enzyme n'est pas détectée autour des plaques amyloïdes (Brown et al., 2004).

L'AD est caractérisée par la synthèse, de peptides amyloïde β ($A\beta$) formant des plaques séniles et par une accumulation de protéines Tau hyper phosphorylées, aboutissant *in fine* à une mort neuronale (Hardy and Selkoe, 2002). $A\beta$ est formé par le clivage séquentiel d'APP (amyloïde precursor protein) par les enzymes β - et γ -secretases (Thinakaran and Koo, 2008).

Le peptide $A\beta$, toxique dans les neurones des patients atteints d'Alzheimer, se lie au cholestérol et catalyse son oxydation en 7 β -hydroxycholestérol, considéré ici comme très toxique. Ceci pourrait contribuer à la perte neuronale observée dans l'AD (Nelson and Alkon, 2005). De plus, une autre étude indique que dans les HCN, le 24(S) active l'expression de l'APP (Alexandrov et al., 2005) ce qui laisse penser qu'une augmentation de la quantité de certains oxystérols dans le cerveau aurait un effet délétère. Il a été également montré que le 22(R) et le T0901317 augmentent la sécrétion de $A\beta$ et promeuvent l'expression de ABCA1 dans la lignée de neuroblastome A2 (Neuro A2) (Koldamova et al., 2005).

Néanmoins, la surexpression de la Cyp46A1 (multipliant ainsi par deux la quantité de 24(S)) dans le cerveau de souris modèle d'AD, par l'utilisation de vecteurs lentiviraux, provoque la diminution de la production de peptides $A\beta$ et de plaques amyloïdes dans l'hippocampe et le cortex cérébral (Hudry et al., 2010). L'efflux de cholestérol cérébral, par le biais de sa transformation en 24(S) semble donc bénéfique dans l'AD. Le 24(S) augmente également l'expression, dans le réticulum endoplasmique (RE), de la protéine chaperonne GRP78 (Glucose Regulated Protein 78). Cette protéine se complexe avec l'APP et la séquestre dans le RE, empêchant ainsi l'action des β - et γ -secretase et donc la formation de $A\beta$ (Urano et al., 2013). Nous ne pouvons pas non plus exclure un effet bénéfique direct du 24(S) par

l'intermédiaire des récepteurs nucléaires ou membranaires. En effet, le 24(S) mais aussi le 25OH et 27OH en activant l'expression d'ABCG1 grâce à leur action sur le LXR β protège le modèle cellulaire de neuroblastome humain SH-SY5Y de la mort cellulaire provoquée par le 7KC (Okabe et al., 2013). L'inactivation de LXR α ou LXR β chez les souris transgéniques APP23 (un modèle murin d'AD) provoque une augmentation des dépôts amyloïde (Zelcer et al., 2007). L'AD est aussi caractérisée par une activation inflammatoire microgliale et neuronale. L'activation de LXR par T0901317 diminue cette inflammation causée par les dépôts d'A β (Cui et al., 2012).

2.3.2. Sclérose en plaques

La sclérose en plaques (MS) est une maladie chronique, inflammatoire et démyélinisante du SNC. Les causes de cette maladie sont mal connues ; néanmoins elles semblent être multifactorielles (facteurs génétiques, facteurs environnementaux et un facteur déclenchant de la maladie). C'est une maladie auto-immune dans laquelle des lymphocytes sont activés, passent la barrière hémato-encéphalique, attaquent les oligodendrocytes et provoquent une démyélinisation des fibres nerveuses du SNC.

Les niveaux d'oxystérols sont aussi altérés chez les patients atteints de MS. Leoni *et al* ont montré une augmentation du niveau de 24(S) plasmatique chez les patients les plus jeunes ainsi qu'une diminution chez les patients les plus âgés de façon similaire à ce qui est observé chez les patients atteints de l'AD (Leoni et al., 2002). Mais une autre étude a montré une diminution de 24(S) chez les patients atteints de la forme primaire progressive ainsi que chez des patients âgés atteints de la forme progressive récurrente (Teunissen et al., 2003).

La maîtrise de la réponse inflammatoire, notamment des Th (T cell helper) 1 et Th17, est primordiale dans la perspective thérapeutique de cette maladie. L'EAE (experimental autoimmune encephalomyelitis) permet de modéliser la MS chez la souris. L'activation des LXRs par T0901317 ou GW3965 permet de diminuer la réponse inflammatoire et donc la sévérité de l'atteinte. L'activation des LXRs permet d'augmenter l'expression de SREBP1. Celui-ci interagit alors avec AhR pour empêcher son action sur le promoteur du gène l'interleukine 17 (IL-17). L'activité transcriptionnelle de ce gène s'en trouve inhibée et donc la réponse inflammatoire des Th17 réduite (Cui et al., 2011).

2.3.3. L'adrénoleucodystrophie

L'adrénoleucodystrophie liée à l'X (ALDX) est une maladie démyélinisante cérébrale grave, causée par une déficience de production de la protéine peroxysomal adrenoleukodystrophy (ALDP), codée par le gène ABCD1. Cette affection est liée à un déficit de la fonction peroxisomale avec accumulation d'acides gras saturés à très longue chaîne. Cette accumulation entraîne une neuro-inflammation qui aboutit à la perte des oligodendrocytes et de la myéline (Singh et al., 2009). Ces acides gras longs sont à l'origine d'une augmentation de la quantité de 7 β -hydroxycholestérol et du 7KC. Ces derniers, à 20 μ M, ont été montrés comme pouvant provoquer l'apoptose des oligodendrocytes. En effet, le 7KC va diminuer la quantité d'AKT actif (phosphorylé). Cela provoque une augmentation de GSK3 β actif entraînant une dégradation accrue de la protéine Myeloid cell leukemia sequence 1 (MCL1) par le protéasome. BAX (Bcl-2-associated X protein) et BAD (Bcl-2-associated Death promoter protein) sont alors libérés, provoquant une diminution du potentiel membranaire mitochondrial et une activation de la caspase 3 aboutissant à l'apoptose des 158N (Ragot et al., 2013).

2.4. Les Liver X Receptors (LXRs)

Les effets des oxystérols s'exercent via la famille des OSBP-proteins (Oxysterol-Binding Related-Protein), ou par le biais de leurs récepteurs nucléaires LXR α et LXR β (Liver X Receptors α and β) ou indirectement par le biais de la modulation de l'action du Aryl hydrocarbon Receptor (AhR) (Savouret et al., 2001). Les LXR et AhR seront au centre de notre intérêt dans la suite de ce manuscrit.

Le LXR α (ou NR1H3) et le LXR β (ou NR1H2) ont été clonés grâce à leur homologie de séquence avec d'autres récepteurs nucléaires (Willy et al., 1995) (Shinar et al., 1994). Les LXRs étaient à l'origine des récepteurs orphelins car leurs ligands naturels étaient inconnus. Ils ont finalement été « adoptés » par les oxystérols lorsque l'on a découvert que ces derniers pouvaient lier et activer ces récepteurs (Janowski et al., 1996).

2.4.1. Expression

Les deux homologues LXRs sont codés par deux gènes différents et ont des expressions différentielles. Le gène codant pour LXR α est localisé sur le chromosome 11 chez l'homme (chromosome 2 chez la souris). Il comporte 8 exons (10 exons chez la souris) et code pour une protéine de 43 kDa (50 kDa chez la souris). Le gène LXR β se situe sur le chromosome 19 chez l'homme (chromosome 7 chez la souris), il comporte 10 exons chez l'homme comme chez la souris et code pour une protéine de 51 kDa chez l'homme (50 kDa chez la souris). Alors que LXR β est exprimé de façon ubiquiste, LXR α est exprimé dans le foie (fortement), dans les reins, les intestins, les tissus adipeux, les poumons et dans le SNC au niveau du cervelet (Figure 32). Les fonctions des LXR α et des LXR β ne sont pas redondantes et leurs niveaux d'expression ne se compensent pas toujours. Par exemple, les souris LXR β ^{-/-} présentent une augmentation de l'expression basale de LXR α , alors que celle de LXR β ne change pas chez les souris LXR α ^{-/-} (Ulven et al., 2004).

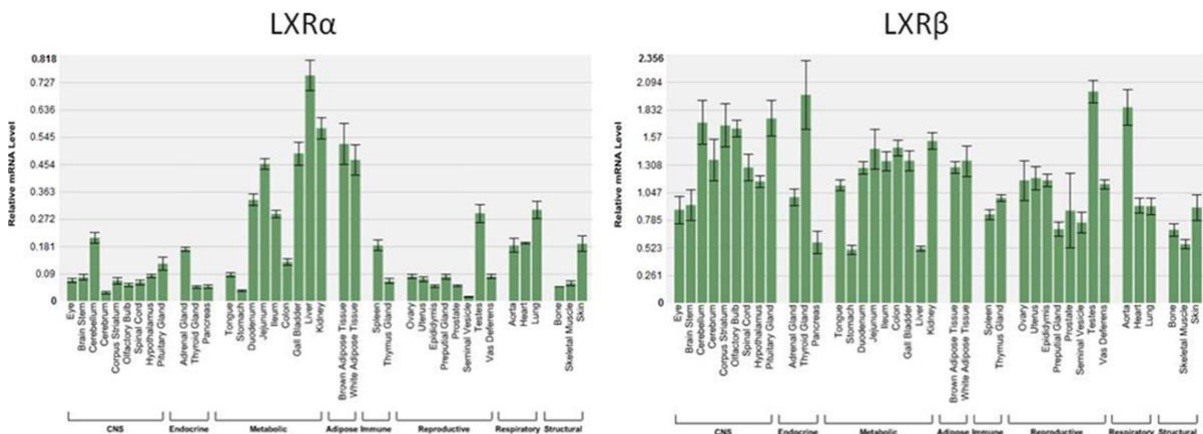


Figure 32 : Expression tissulaire de LXR α et LXR β chez la souris C57Bl/6J (d'après NURSA database). Malgré une présence détectée dans tous les tissus testés, les isoforme du LXR montrent des niveaux d'expression différents.

2.4.2. Mode d'action

Les récepteurs LXRs forment des hétérodimères avec le RXR lui-même activé par l'acide 9-*cis*-rétinoïque. Dans le noyau, ils régulent l'expression génique par liaison à des éléments de réponse au LXR (LXRE) ou au DR4 (AGGTCAAnnnnAGGTCA) présents au niveau des promoteurs de leurs gènes cibles.

Les hétérodimères sont présents dans le noyau où ils sont complexés, en l'absence de ligand, avec des corépresseurs tels que NCoR1 ou SMRT (Hörlein et al., 1995) (Wagner et al., 2003) qui recrutent des complexes transcriptionnels contenant des HDAC spécifiques. Ces HDAC génèrent une structure chromatinienne très dense au niveau du promoteur cible qui entraîne une répression génique.

En réponse à la liaison des oxystérols, le dimère LXR-RXR échange ses corépresseurs contre des coactivateurs tels que les SRCs (Huuskonen et al., 2004) ou PGC-1 α (Oberkofler et al., 2003) afin d'activer l'expression de ses gènes cibles. Ces coactivateurs possèdent, quant à eux, des activités histone acétyltransférase (HAT) qui vont permettre une décondensation de la chromatine et donc entraîner une activation de la transcription (Figure 33).

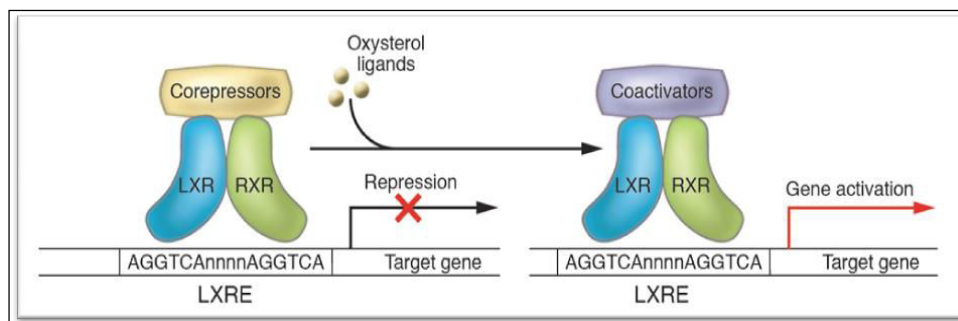


Figure 33 : Mode d'action schématique des LXRs (Zelcer and Tontonoz, 2006). La fixation des ligands sur les LXRs induit le relargage du corépresseur au profit du recrutement d'un coactivateur.

2.4.3. Rôles des LXRs

Dans les tissus périphériques

L'homéostasie du cholestérol est maintenue par sa synthèse *de novo*, son absorption intestinale, sa transformation en acides biliaires, en stéroïdes, en acide gras et par son excrétion biliaire. Les LXR agissent comme des détecteurs du cholestérol et régulent son homéostasie (Figure 33).

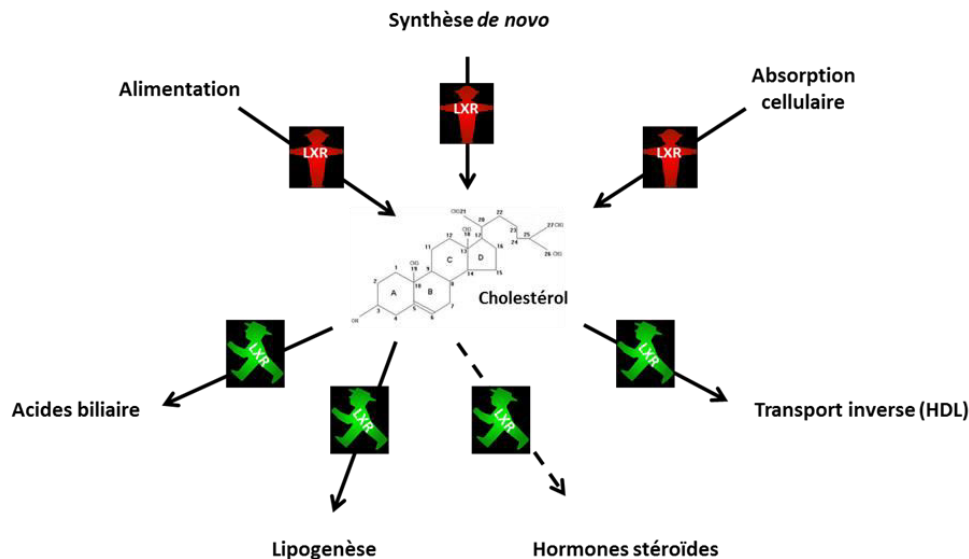


Figure 33 : Contrôle du métabolisme du cholestérol par le LXR Les LXRs régulent la synthèse de novo, l'absorption intestinale et cellulaire, le transport inverse du cholestérol, mais aussi son excrétion vers la bile et sa transformation en acides biliaires ou en hormones stéroïdes (adapté de <http://www.phoenixpeptide.com>).

Le foie est le principal site de biosynthèse ainsi que d'élimination du cholestérol. Au niveau des hépatocytes, la biosynthèse du cholestérol est régulée positivement par un mécanisme impliquant les facteurs de transcription de la famille SREBP pouvant notamment activer l'expression de la HMG-CoA réductase et synthétase. Lorsque l'alimentation procure suffisamment de cholestérol, les oxystérols comme le 24(s) et 25OH se forment et s'accumulent. Ces composés sont importants pour la régulation du métabolisme du cholestérol. Premièrement, ils diminuent sa biosynthèse en inhibant le clivage activateur de SREBP (Janowski, 2002). Deuxièmement, une des principales fonctions des LXRs dans le foie est de promouvoir la biosynthèse des acides gras afin de diminuer la quantité de cholestérol. Les LXRs stimulent la lipogenèse grâce à l'induction de SREBP1C, de FAS (fatty acid synthase), de ACC (acetyl CoA carboxylase) et de SCD1 (sterol CoA desaturase) (Peet et al., 1998) (Repa et al., 2000a) (Schultz et al., 2000). Troisièmement, l'activation du LXR α par les oxystérols induit l'expression de gènes impliqués dans la synthèse d'acides biliaires et donc l'excrétion de cholestérol dans la bile. Chez les rongeurs, Cyp7A1 (chez l'homme CYP7A1 n'est pas un gène cible de LXR mais de FXR) est l'enzyme limitante de la voie convertissant le cholestérol en acides biliaires. Les souris LXR α -/- n'ont plus la capacité de réguler leur taux de cholestérol lorsqu'elles sont soumises à un régime riche en cholestérol car elles sont incapables d'activer l'expression hépatique de Cyp7A1 (Peet et al., 1998).

En plus de leur action dans la biosynthèse des acides biliaires, les LXRs, en régulant positivement les gènes codant pour les transporteurs ABCG5 et ABCG8 [156], permettent de diminuer l'absorption intestinale de cholestérol comme l'ont montré les expériences sur les souris doublement invalidées pour les LXR α/β (Repa et al., 2000b). Les LDL (low density lipoprotein) permettent de transporter le cholestérol dans le sang afin de le transférer aux cellules. Ces dernières expriment à leur surface le récepteur au LDL (LDLR). Cette expression est régulée positivement par SREBP2. Les LXRs régulent cette absorption cellulaire en augmentant l'expression de IDOL (inductible degrader of LDLR). Cette protéine est une E3 ligase permettant l'ubiquitination des LDR et donc sa dégradation (Zelcer et al., 2009).

Enfin, le transport inverse du cholestérol qui implique le transport des excès de cholestérol des tissus périphériques vers le foie où il sera dégradé *via* des protéines de transport HDL (High Density Lipoprotein) est lui aussi régulé par les LXRs (Kannisto et al., 2014).

Dans le système nerveux central

Dans le SNC, les LXRs régulent également l'homéostasie du cholestérol. Les souris LXR α/β KO présentent une diminution de l'expression des transporteurs du cholestérol (sauf ApoE). Ces souris présentent aussi une perturbation de l'homéostasie des lipides (accumulation de lipides dans certaines zones du cerveau) associée à des problèmes neurodégénératifs tels que des pertes neuronales, une prolifération des astrocytes et une désorganisation des gaines de myéline. Elles présentent aussi des problèmes majeurs au niveau du système ventriculaire et une absence de plexus choroïde (Wang et al., 2002).

Les souris LXR β -/- arborent, elles aussi, une dégénérescence des motoneurones ainsi qu'une atrophie axonale et une astrogliose qui rappellent certaines pathologies telles que la sclérose amyotrophique latérale. Cette neurodégénérescence est également associée à une accumulation de lipides (Andersson et al., 2005) On peut remarquer que le phénotype des souris double KO et celui des souris LXR β -/- est assez proche. D'ailleurs, il semble que le LXR β soit l'isoforme prédominante du SNC. Ainsi, le LXR α semblerait jouer un rôle restreint dans ce tissu.

Rôle des LXR et du métabolisme du cholestérol dans le système nerveux périphérique

Dans le SNP, comme dans le SNC, le cholestérol est majoritairement situé dans la gaine de myéline et donc dans les cellules de Schwann. Deux modèles murins ont été créés afin d'étudier le rôle de ce stéroïde dans ces cellules. Dans le premier modèle, *SQS*^{-/-}, le gène codant pour la squalène synthétase a été invalidé dans les oligodendrocytes et les cellules de Schwann (Cre *CNPase*) (Saher et al., 2005). Cette protéine est une enzyme clé de la synthèse des stérols. Dans le second modèle, c'est le gène codant pour la protéine SCAP (Sterol regulatory element-binding protein (SREBP) Cleavage Activation Protein) qui a été spécifiquement invalidé dans les cellules de Schwann (Cre *P0*) (Verheijen et al., 2009). SCAP permet le clivage et donc l'activation des facteurs de transcription SREBP. Comme nous l'avons évoqué ci-dessus, ces derniers régulent l'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse du cholestérol et des acides gras. Ces deux modèles ont développé des neuropathies périphériques causées par une hypomyélinisation du nerf sciatique (Figure 34). Les cellules de Schwann des souris *SCAP*^{-/-} présentent un défaut d'exportation de la protéine P0 du réticulum endoplasmique vers la membrane, entraînant une fragilité de la gaine de myéline.

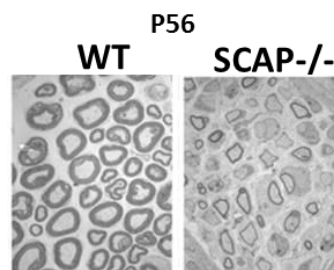


Figure 34 : L'invalidation du gène *SCAP* provoque une hypomyélinisation du nerf sciatique. Image de microscopie électronique (Verheijen et al., 2009).

Pendant longtemps nous avons cru que les hormones stéroïdes étaient seulement synthétisées par les glandes endocrines (les surrénales, les gonades et le placenta). Or le système nerveux central et périphérique possèdent la capacité de produire de novo des neurostéroïdes à partir du cholestérol. Cette synthèse est nommée neurostéroïdogénèse.

Les neurostéroïdes, comme la progestérone, jouent un rôle essentiel dans la neurogénèse, la prolifération des progéniteurs neuronaux, la régénération axonale, la lutte contre l'apoptose neuronale et la myélinisation (Schumacher et al., 2004) et dans la protection du SNP contre les maladies neurodégénératives (Melcangi and Garcia-Segura, 2006) (Caruso

et al., 2008). Les neuropathies diabétiques sont caractérisées par une diminution de la quantité de neurostéroïdes. L'activation des LXR par le ligand synthétique GW3965 restaure cette carence en stimulant l'expression de la protéine StAR (Sterol Acute Regulatory protein). Cette dernière est un transporteur permettant l'entrée du cholestérol dans la mitochondrie, lieu de la neurostéroïdogenèse. Dans cet organite, le cholestérol est transformé en prégnénolone, premier stéroïde de la chaîne de biosynthèse, grâce à l'action du Cyp11A1 (Figure 35) (Cermenati et al., 2010).

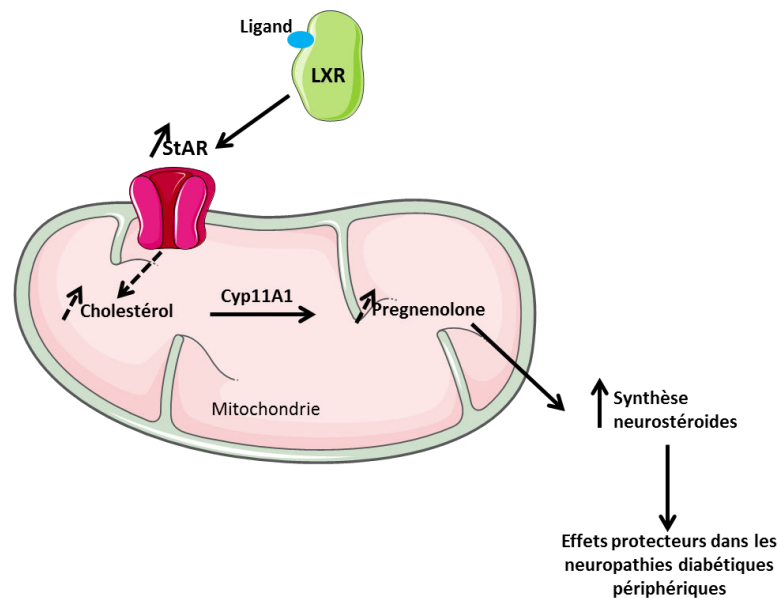


Figure 35 : Mécanisme d'action protecteur des LXR dans les neuropathies diabétiques périphériques (Cermenati et al., 2013). L'activation du LXR induit l'expression de StAR. La quantité de cholestérol mitochondriale est alors augmentée. Ce dernier est transformé en neurostéroïdes qui vont exercer un effet protecteur sur le nerf sciatique.

3. RIP140

3.1. Historique

Dans les années 90, après la découverte des récepteurs nucléaires (RN), les laboratoires tentèrent d'identifier les corégulateurs transcriptionnels leur étant associés. RIP140 (Receptor Interacting Protein 140) (aussi appelé NRIP1 (Nuclear Receptor Interacting Protein 1)) est l'un des premiers corégulateurs à avoir été découvert en 1994 (Cavaillès et al., 1994). Il fut isolé à partir d'extraits nucléaires de cellules de mammifères (HeLa, COS-1, ZRF5-

1) par Far-western blot utilisant comme sonde le LBD du récepteur des estrogènes α et β ($ER\alpha/\beta$) couplé à une GST.

Un an après, le cDNA de RIP140 humain fut isolé dans une banque de cellules cancéreuses mammaires ZRF5-1 (Cavaillès et al., 1995). S'en suit au cours des années suivantes sa caractérisation dans de nombreuses autres espèces : souris (Lee et al., 1998), rat, poulet, poisson zèbre, xénope et chien.

Depuis sa découverte grâce à son interaction avec $ER\alpha/\beta$, il est démontré que RIP140 se lie également à de nombreux autres récepteurs nucléaires (RN) et facteurs de transcription.

| Nom | Abréviation | Référence |
|---|---|--|
| Récepteur de l'acide rétinoïque α/β | RAR α/β | (L'Horset et al., 1996) |
| Retinoid X receptor α/β | RXR α/β | (L'Horset et al., 1996) |
| Récepteur des hormones thyroïdiennes α/β | TR α/β | (L'Horset et al., 1996)(Treuter et al., 1998) |
| Récepteur des glucocorticoïdes | GR | (Subramaniam et al., 1999) |
| Récepteur des androgènes | AR | (Ikonen et al., 1997) |
| Récepteur de la vitamine D | VDR | (Masuyama et al., 1997) |
| Peroxisome proliferator-activated receptor α,γ,δ | PPAR α,γ,δ | (Lim et al., 2004), (Treuter et al., 1998), (Windahl et al., 1999) |
| Liver X receptor α/β | LXR α/β | (Miyata et al., 1998) |
| Retinoid-related orphan receptor β | ROR β | (Poliandri et al., 2011) |
| Pergname X receptor | PXR | (Masuyama et al., 2001) |
| Estrogen related receptor α,β,γ | ERR α,β,γ | (Castet et al., 2006) |
| Testicular orphan receptor 4 | TR4 | (Yan et al., 1998) |
| Testicular orphan receptor 2 | TR2 | (Lee et al., 1998) |
| c-Jun | c-Jun | (Teyssier et al., 2003) |
| Aryl hydrocarbon receptor | AhR | (Kumar et al., 1999) |
| Nuclear factor- <i>kappa</i> B | NFκB | (Zschiedrich et al., 2008) |

Tableau 3 : Liste des récepteurs nucléaires et facteurs de transcription interagissant avec RIP140

3.2. Le gène RIP140

Chez l'homme, le gène RIP140 est porté par le chromosome 21 (21q11.2) dans une région pauvre en gène associée au syndrome de Down et à la maladie d'Alzheimer (Cavaillès et al., 1995) (Katsanis et al., 1998).

Chez les souris, le gène RIP140 est situé sur le chromosome 16. Des sites d'initiation de la transcription alternatifs laissent penser que RIP140 est sous le contrôle de plusieurs promoteurs. Son ARNm est composé d'un unique exon codant et de plusieurs exons non codants situés en amont, qui sont pour certains alternatifs. L'organisation entre exons et introns est bien conservée entre l'homme et la souris (Figure 36). Le rôle physiologique des

exons non codants en 5' n'est pas encore défini, mais cela pourrait être lié à la stabilité de l'ARN, à l'efficacité traductionnelle ainsi qu'à la spécificité cellulaire (Augereau et al., 2006a) (Nichol et al., 2006).

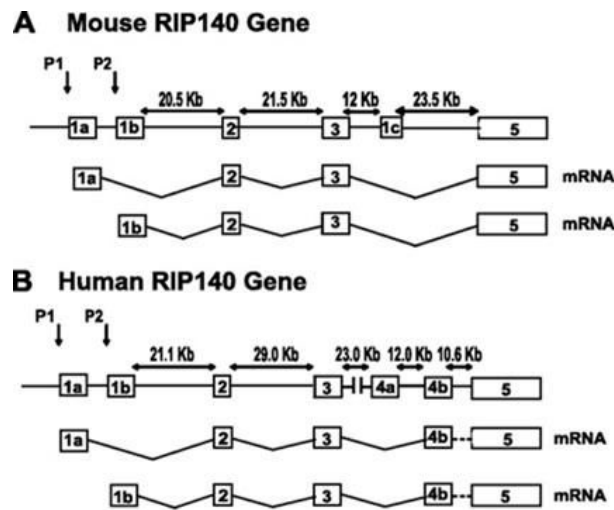


Figure 36 : Organisation du gène et des ARNm codant pour RIP140. A) Chez la souris. B) Chez l'homme. Les exons 1a, 1b, 2,3 et 5 sont conservés chez ces 2 espèces (Nichol et al., 2006).

3.3. Structure protéique de RIP140

RIP140 humain est constitué de 1158 acides aminés. Sa séquence est très conservée au cours de l'évolution. Il existe 83% d'homologie entre les formes murine et humaine de RIP140.

RIP140 se compose de domaines répresseurs (RD), de motifs permettant sa liaison aux récepteurs nucléaires (NR boxes) et de séquences d'adressage nucléaire (NLS).

3.3.1. Les domaines répresseurs

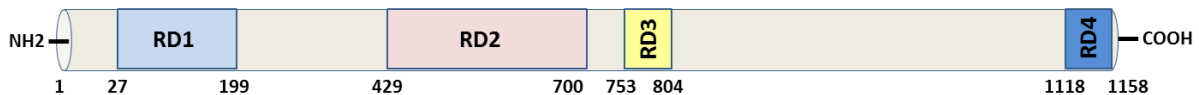


Figure 37 : Cartographie des 4 domaines répresseurs de RIP140. RIP140 possède 4 domaines répresseurs (RD).

RIP140 possède 4 domaines répresseurs (RD) (Figure 37) (Castet et al., 2004) (Christian et al., 2004) :

- RD1 est situé entre les résidus 27 et 199. Il permet le recrutement des HDACs de classe I et II (Castet et al 2004, Wei et al 2004 ; Wei et al 2000).

- RD2 est localisé entre les acides aminés 429 et 739. Ce site contient deux motifs spécifiques PIDLS et PINLS qui permettent la fixation des protéines CtBP1 et CtBP2 (Castet et al 2004 ; Vo et al 2001).
- RD3 et RD4 sont situés, respectivement, entre les acides aminés 753-804 et 1118-1158. Cependant à ce jour, aucun partenaire de ces domaines n'a encore été identifié avec certitude.

3.3.2. Motifs de liaisons aux récepteurs nucléaires

En 1997, Heery (Heery et al., 1997) mit en évidence une séquence signature (LxxLL) nécessaire à la liaison directe des coactivateurs transcriptionnels (SRC1/2, TIF2/GRIP1...) aux récepteurs nucléaires: les NR boxes(Figure. 38). Il identifie 9 NR boxes répartis sur l'ensemble de RIP140. A titre de comparaison, SRC1a ne contient que 3 motifs LxxLL.

Les nombreuses NR (nuclear receptor) boxes présentes dans la séquence de RIP140, n'ont pas la même affinité pour l'ensemble des récepteurs nucléaires.

RAR et RXR interagissent avec RIP140 par un motif légèrement divergent, LXXML, situé entre les acides aminés 1070 et 1074 (Chen et al., 2004).

RIP140 et SRC1 se lient tous les deux au domaine transactivateur (Q-rich domain) de AhR. L'interaction de SRC1 avec AhR est possible grâce à ses motifs LxxLL. En revanche, RIP140 se fixe sur AhR grâce à sa séquence d'acides aminés comprise entre 154 et 350, indépendamment de ses NR boxes. (154 et 350) (Kumar et al., 1999) (Kumar and Perdew, 1999).

3.3.3. Séquences de localisation nucléaire

Comme attendu pour un corégulateur transcriptionnel, RIP140 possède 2 séquences NLS:

- En position 97 (KRKR mono partie NLS)
- En position 856 (KRKR x10KRKR bi partie NLS)

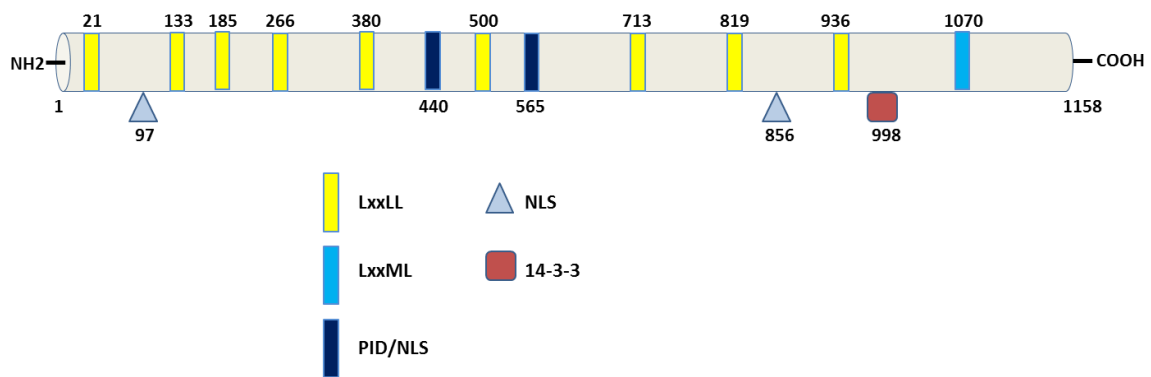


Figure 38 : Cartographie des principaux motifs d'interaction de RIP140. RIP140 murin comporte 9 motifs LxxLL, 1 motif LxxML, 1 motif PIDLS et 1PINLS, 2 sequences NLS. D'après (Mostaqul Huq et al., 2008).

3.3.4. Expression et localisation cellulaire

RIP140 est une protéine ubiquiste. Son ARNm a été détecté dans de nombreuses lignées cellulaires de mammifères (Cavaillès et al., 1995) ainsi que dans tous les tissus testés (Foie, adipocyte, ovaire, testicules...) avec une expression particulièrement importante dans le cerveau (Lee et al., 1998).

Au niveau subcellulaire, RIP140 est localisé dans des foci nucléaires (Zilliacus et al., 2001) (Carascossa et al., 2006). Cette répartition ponctiforme est permise par une séquence de 40 acides aminés (431-472) (Tazawa et al., 2003). La localisation nucléaire de RIP140 est régulée par différents mécanismes:

- Dans des conditions d'hyperacétylation (inhibition des HDACs), RIP140 est délocalisé dans le cytoplasme (Huq and Wei, 2005).
- L'interaction de RIP140 avec la protéine ubiquitaire 14.3.3 provoque également son export dans le cytoplasme (Zilliacus et al., 2001).
- Le même phénomène de délocalisation nucléaire est observé après induction des cellules (COS-7, HeLa, A549, 293T) par les glucocorticoïdes (Tazawa et al., 2003) et par des androgènes (Carascossa et al., 2006).

Ce type de répartition nucléaire pourrait être une forme de stockage de RIP140 avec les régulateurs de la machinerie transcriptionnelle.

3.4. Régulation de l'expression de RIP140

3.4.1. Régulation transcriptionnelle

Les estrogènes (Thenot et al., 1999) (Augereau et al., 2006a), les acides rétinoïques (RA) (Kerley et al., 2001), les androgènes (Carascossa et al., 2006) ainsi que l'ERR α (Nichol et al., 2006) induisent une augmentation de la quantité d'ARNm RIP140 de manière transcriptionnelle; ceci afin d'exercer un rétrocontrôle négatif sur l'expression de leurs gènes cibles. Le traitement des cellules hépatiques par la 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) provoque également une augmentation de la quantité de transcrits RIP140. En revanche, le but de cette induction est opposé à celui recherché dans le cas des récepteurs nucléaires évoqués ci-dessus. En effet, RIP140 permet dans ce cas de stimuler l'activité de la voie AhR (Kumar et al., 1999).

3.4.2. Modifications post-traductionnelles

RIP140 subit des modifications post-traductionnelles : phosphorylation, acétylation, conjugaison avec la forme active de la vitamine B6 : le Pyridoxal 5' Phosphate (PLP) sur la lysine 613, SUMOylation (Figure 39). Ces modifications auront des conséquences sur sa distribution cellulaire, sa régulation et son activité.

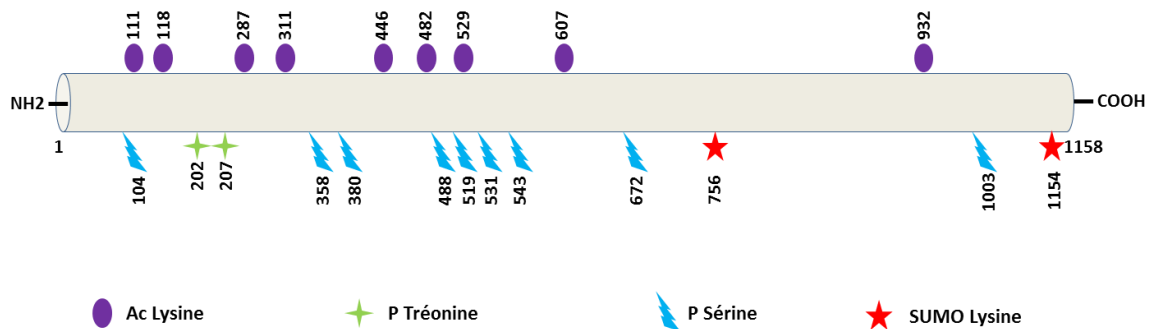


Figure 39 : Cartographies des sites de modifications post-traductionnelle de RIP140. Afin de moduler son activité RIP140 subit de nombreuses modifications post-traductionnelles : phosphorylation, acétylation, conjugaison, SUMOylation (d'après (Mostaqul Huq et al., 2008)).

La phosphorylation

En 2005, grâce à la spectrométrie de masse, Huq a cartographié les sites (9 serines et 2 thréonines) de phosphorylation de RIP140 (Huq et al., 2005). Ces phosphorylations sont

importantes pour moduler son rôle biologique. Elles permettent son interaction avec d'autres protéines, notamment avec la protéine 14.3.3. Comme nous l'avons vu précédemment, cette liaison modifiera sa localisation et donc son interaction avec d'autres protéines et son activité (Zilliacus et al., 2001) (Darling et al., 2005).

La phosphorylation de RIP140 sur les Thréonines 202 et 207, par MAPK, provoque une augmentation de l'action transrepressive de RIP140. Ceci est, au moins pour une part, dû à l'amélioration de sa capacité de liaison avec HDAC3 (Gupta et al., 2005).

L'acétylation

Chez l'insecte, 8 lysines acétylées ont été identifiées dans les régions N-terminales et centrales de RIP140 (Huq and Wei, 2005). L'acétylation de la Lysine 446 (principalement) par PCAF, dans les cellules humaines, minore le pouvoir répresseur de RIP140 en diminuant son interaction avec CtBP1 (Vo et al., 2001).

Méthylation

L'exportation, hors du noyau, de RIP140 est liée à certaines modifications post-traductionnelles. Par exemple, la PKC (activée par un niveau élevé de Di-acideglycerol) phosphoryle deux serines spécifiques de RIP140. RIP140 est ensuite méthylé grâce à l'arginine methylTransférase1, ce qui accroît son interaction avec l'Exportine 1 (Gupta et al., 2005) (Gupta et al., 2008).

La SUMOylation

Les lysines 756 et 1154 situées respectivement dans le RD3 et le RD4 de RIP140 sont sujettes à la SUMOylation. Cette SUMOylation n'affecte pas la stabilité de RIP140 mais provoque une augmentation de son pouvoir répresseur. En effet, La mutation de ces lysines compromet ses capacités répressives (Rytinki and Palvimo, 2008).

Conjugaison avec la Vitamine B6

La forme active de la vitamine B6, PLP (Pyridoxal 5' Phosphate) se conjugue avec 20 à 30 % du RIP140 endogène des cellules de mammifères (adipocytes et COS-1). Cette conjugaison se fait exclusivement sur la lysine 613. Ceci aura pour conséquence d'augmenter le pouvoir répresseur de RIP140, d'une part en favorisant son interaction avec HDAC3, et

d'autre part en permettant d'augmenter son temps de localisation nucléaire en empêchant son interaction avec l'exportine CRM1 (Huq et al., 2007).

3.5. Rôle de RIP140 dans le contrôle de la transcription

3.5.1. Mécanismes transrépresseurs

RIP140 apparaît être un corégulateur transcriptionnel particulier, non conventionnel. Le fait d'être recruté par des holo-récepteurs et de posséder des NR boxes (et non des CoRNR boxes), laisse penser qu'il exerce un rôle de coactivateur. Mais de nombreux articles lui imputent un rôle de corépresseur.

Dans un premier temps, il a été supposé que RIP140 exerçait son activité répressive en entrant en compétition avec certains coactivateurs (SRC1, CBP, PCAF...) grâce à ses motifs LxxLL (Treuter et al., 1998).

Par la suite, il a été démontré, par des expériences réalisées chez la levure et dans des cellules de mammifères en utilisant une construction GAL4-DBD-RIP140, que RIP140 exerçait directement un rôle transpresseur sur de nombreux promoteurs (Lee et al., 1998) (Castet et al., 2004). Comme nous l'avons vu précédemment, RIP140 possède 4 domaines répresseurs. Ces derniers permettent le recrutement de protéines impliquées dans le contrôle transcriptionnel.

Les HDACs

Les HDACs sont des enzymes qui participent, avec les HATs, au contrôle dynamique de la compaction chromatinienne par les histones. L'état chromatinien désacétylé est associé à une chromatine compacte et donc inaccessible à la machinerie transcriptionnelle.

RIP140, par sa séquence comprise entre 115 et 199 du domaine RD1, interagit avec les HDACs. Des expériences d'immunocytochimie confirment sa colocalisation avec HDAC5 (Castet et al., 2004).

Un traitement par la Tricostatin A (TSA), un inhibiteur spécifique des HDACs, empêche, au moins partiellement, les effets répresseurs de RIP140 passant par AR, RAR/RXR ou SF1 (Wei et al., 2000) (Mellgren et al., 2003). Cependant, il est difficile de construire une théorie universelle consistant à imputer aux HDACs le rôle répresseur de RIP140. En effet, le

traitement par la TSA n'abolit pas l'activité répressive de RIP140 passant par ER α (Castet et al., 2004).

Ces différences mécanistiques, pourraient être liées à la nature du promoteur, du récepteur nucléaire ou aux types cellulaires. Cela a déjà été démontré dans le cas de l'effet répressif des HDACs sur NCOR (Fernandes et al., 2003).

Les CtBPs

Les CtBPs sont des corépresseurs transcriptionnels très conservés au cours de l'évolution. Ils sont impliqués dans de nombreux mécanismes du développement ou du cycle cellulaire. La famille des CtBPs comprend 2 membres : CtBP1 et CtBP2. Ils ont une forte homologie et un rôle transrépresseur, dépendant ou indépendant des HDACs (selon les promoteurs), pour un grand nombre de facteurs de transcription.

CtBP1 et 2 sont tous les deux capables de se lier au domaine RD2 de RIP140 grâce à 2 motifs très conservés:

- PIDLS (440-444)
- PINLS (565-569)

CtBP2 possède la même affinité pour les 2 sites. En revanche, pour CtBP1, le motif PINLS est un site de liaison plus puissant que PIDLS (Castet et al., 2004).

Cependant, malgré cette interaction, les CtBPs ne peuvent pas expliquer l'ensemble des effets répresseurs de RIP140. En effet, lorsque l'on mute les sites PINLS et PIDLS ou lorsque l'on utilise des fibroblastes de souris KO pour CtBP1 et 2, on observe toujours cet effet répresseur de RIP140 sur le promoteur ERE- β Glob-luc. Cela démontre que CtBP, n'est pas le partenaire unique et majeur de RIP140 pour son action répressive (Vo et al., 2001) (Tazawa et al., 2003).

Effecteurs inconnus

Ainsi, RD1 permet le recrutement des HDACs, RD2 celui des CtBPs. Mais aucun partenaire se fixant au RD3 et 4 n'a encore été identifié. Cependant ces domaines sont dotés de capacités transrepressives indépendantes des domaines 1 et 2 (Castet et al., 2004) (Christian et al., 2004). Comme nous l'avons vu précédemment, la liaison de la protéine SUMO-

1 semble importante pour l'activité répressive de ces domaines (Rytinki and Palvimo, 2008). Les SUMOs peuvent faciliter le recrutement des HDACs (Nathan et al., 2006). Mais les expériences de traitement par la TSA indiquent que les HDACs ne sont pas impliqués ici.

Tous ces éléments laissent à penser que RIP140 possède une activité corépressive globale et que l'importance de chaque domaine est dépendante du promoteur, du type cellulaire et des modifications post traductionnelles subies.

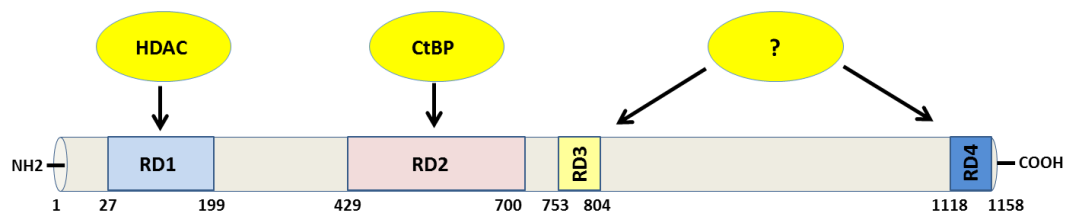


Figure 40 : Partenaires protéiques impliqués dans le rôle transrépressur de RIP140. Les HDACS interagissent avec le premier domaine répresseur de RIP140 (RD1), les CtBPs avec le 2nd (RD2) grâce aux motifs PIDLS et PINLS. Aucune protéine partenaire n'a encore été identifiée pour les sites 3 et 4 (RD3 et RD4) mais la présence des Lysine 756 et 1154, support de la SUMOylation, semble essentielle à l'activité répressive de RIP140.

3.5.2. Mécanismes transactivateurs

De nombreuses publications rapportent un rôle positif de RIP140 dans l'expression de ses gènes cibles. Des expériences réalisées chez la levure mettent cela en évidence avec différents récepteurs nucléaires : ER α (Nephew et al., 1998) (Sheeler et al., 2000), RAR α (Joyeux et al., 1997) ou GR (Windahl et al., 1999). Dans les cellules de mammifère, la surexpression de RIP140 provoque une augmentation de l'activité transcriptionnelle relayée par ER α (Cavallès et al., 1995) et AhR (Kumar et al., 1999).

De plus, des analyses de microarrays sur des pré-adipocytes de souris invalidées pour RIP140 montrent que certains gènes sont régulés positivement par RIP140. Parmi ces gènes, certains étaient connus pour être également régulés par SP1 (Christian et al., 2005)(Castet et al., 2006).

Les récepteurs nucléaires peuvent aussi exercer leurs effets transcriptionnels indépendamment de leurs éléments de réponse en interagissant avec SP1 par exemple. SP1

est un facteur de transcription qui se lie à des séquences riches en GC des promoteurs cibles. $ERR\alpha$ et γ régulent positivement l'activité transcriptionnelle de certains gènes ($TR\alpha$, SRY, p21, RIP140) grâce au domaine SP1 des promoteurs de ces mêmes gènes. Lorsque RIP140 est surexprimé, cette même activité transcriptionnelle est fortement stimulée. RIP140 pourrait séquestrer les HDACS, les empêchant ainsi de se lier à SP1, favorisant alors l'activité transcriptionnelle du promoteur des gènes cibles de SP1 (Castet et al., 2006).

3.6. Rôles biologiques de RIP140

La création de souris invalidées pour le gène RIP140 (RIPKO) a permis de mettre en évidence une partie de ses rôles biologiques. Ces animaux sont viables mais présentent plusieurs phénotypes remarquables.

3.6.1. Fertilité

Les souris RIPKO femelles sont stériles. Cette stérilité est strictement causée par un défaut d'ovulation: les oocytes ne sont pas expulsés par les follicules matures, cependant ils sont fertilisables *in vitro*. De plus les expériences de transfert d'embryons indiquent que ces animaux ne présentent pas de problème d'implantation (Leonardsson et al., 2002).

3.6.2. Le tissu adipeux

Il existe 2 types de tissus adipeux : le tissu adipeux blanc (WAT) et le tissu adipeux brun (BAT). Ces 2 tissus ont des fonctions bien distinctes. Le WAT sert surtout au stockage des excédents caloriques en triglycérides (TG) (Ahima and Flier, 2000) (Cinti, 2005). Alors que le BAT est impliqué dans la production de chaleur grâce à l'oxydation des acides gras (AG) (Cannon and Nedergaard, 2004).

Les souris invalidées pour RIP140 présentent une réduction de 70% de leur masse graisseuse corporelle et de 20% de leur poids total, ainsi qu'une résistance à l'obésité provoquée par un régime riche en graisse (Leonardsson et al., 2004). Le WAT de ces souris expriment des gènes (UPC1, CPT1, CIDEA) spécifiques au BAT, perdant ainsi leur capacité de

stockage énergétique au profit d'une thermogénèse calorique. Il se produit une transdifférenciation en BAT-like.

3.6.3. Le muscle

L'expression de RIP140 est bien plus élevée dans les fibres musculaires glycolytiques (contraction rapide fonctionnant en anaérobie) que dans les fibres musculaires oxydatives (contraction lente fonctionnant en aérobie) qui présentent un niveau important de phosphorylation oxydative et d'oxydation des acides gras.

Les souris invalidées pour RIP140 présentent une modification du typage de fibre musculaire. Elles présentent une augmentation du nombre de fibres oxydatives au détriment des fibres glycolytiques (Seth et al., 2007).

La surexpression de RIP140 dans le modèle murin RIPTg (RIP140 transgénique) entraîne une hypertrophie cardiaque et une fibrose ventriculaire aboutissant à une forte mortalité autour de 4 semaines. Cette anomalie est causée par un défaut de l'activité de la chaîne de transport d'électrons de la mitochondrie et de la consommation d'oxygène (Fritah et al., 2010). Il est à noter que les femelles RIPTg sont moins touchées par ces problèmes cardiaques, protégées sans doute par le taux d'œstrogènes circulants (Pedram et al., 2008).

3.6.4. Le foie

Soumises à un régime riche en graisse (HFD), les souris RIPKO ne développent pas de stéatose hépatique. L'analyse transcriptomique des hépatocytes primaires provenant de ces animaux indique une induction de l'expression de *PEPCK* et une diminution de l'expression de *FAS* et de *SREBP1c* entraînant une baisse de la synthèse de TG et donc de la lipogenèse dans les hépatocytes de souris RIPKO (Herzog et al., 2007).

3.6.5. Absorption du glucose

Indépendamment de son rôle nucléaire de régulateur transcriptionnel, RIP140 intervient aussi dans des processus de régulation cytoplasmique. Le glucose pénètre dans la cellule grâce au transporteur GLUT4 qui est adressé à la membrane grâce au signal insuline.

La fraction cytosolique de RIP140 perturbe ce signal et diminue ainsi la quantité de GLUT4 présent à la membrane cellulaire (Ho et al., 2009).

3.6.6. Système nerveux central

Dans le cerveau de souris, l'ARNm RIP140 est détecté à E9.5. A l'âge adulte de 2 mois, il est retrouvé dans le cortex et l'hippocampe (Duclot et al., 2012). L'exon 1 de cet ARNm cérébral est différent de celui des autres tissus, bien que la protéine soit semblable. L'expression de la protéine RIP140 dans le cerveau diminue au cours du vieillissement de la souris mâle et femelle (Ghosh and Thakur, 2008).

Dans cet organe, une régulation pré-translationnelle inhabituelle de RIP140 a été mise en évidence. La grande majorité des miRNA se lient dans la région 3'UTR de leurs ARN cibles soit pour empêcher leur traduction, soit dans des cas moins fréquents pour accélérer leur dégradation. Mir-346 est transcrit à partir du deuxième intron du gène GRID1 (Glutamate Receptor Ionotropic Delta 1), codant pour un récepteur impliqué dans la susceptibilité à la schizophrénie. Ce miRNA se lie à la région 5'UTR de RIP140 par une séquence située sur l'exon 3 (exon commun à tous les ARNm RIP140). Cette interaction augmente l'expression protéique de RIP140 en facilitant l'interaction de l'ARNm avec les ribosomes. Ainsi, l'activité répressive de RIP140 se trouve augmentée par cette liaison (Tsai et al., 2009).

La présence du chromosome 21 surnuméraire, à l'origine du syndrome de Down, semblerait être associée à une modification de l'expression de RIP140 (FitzPatrick et al., 2002), avec notamment une augmentation de son expression dans l'hippocampe (Gardiner, 2006). Cependant, l'implication de RIP140 dans la pathologie de la trisomie 21 reste hypothétique. La seule étude menée à ce jour sur le rôle biologique de RIP140 dans le système nerveux a été publiée en 2011. L'invalidation de RIP140 ne provoque pas de changements architecturaux globaux du cerveau. La densité ainsi que l'épaisseur des différentes couches cellulaires constituant le cortex et l'hippocampe ne sont pas modifiées. De même, un marquage au Luxol n'a révélé aucune altération manifeste de la myéline. En réalisant des tests comportementaux, Duclot et al, ont démontré que les souris invalidées pour RIP140 présentent un déficit d'apprentissage et de mémorisation ainsi qu'une augmentation de réponse au stress (Duclot et al., 2012).

4. AHR

4.1. Préambule

L'ensemble des organismes vivants est soumis à une exposition constante à différents composés chimiques présents dans l'environnement. Pour y faire face, des stratégies de lutte contre ces xénobiotiques ont été mises en place. Il s'agit de différents systèmes de détections, de biotransformations et d'élimination.

Les enzymes participant à ces réactions sont regroupées sous le nom d'enzyme du métabolisme des xénobiotiques (EMX). Elles sont classées en 3 groupes:

- Les enzymes de phase I comportent les monooxygénases comme les cytochrome P450
- Les enzymes de phase II sont des « transférases » comme les Gluthation-S-tranferase
- Enfin, les transporteurs de la famille « ATP binding cassette » ou ABC forment le groupe des enzymes de phase III.

L'élimination des xénobiotiques est séquentielle. D'abord les enzymes de phase I activent le composé étranger, en lui ajoutant une fonction hydroxyle. Ce composé est ensuite conjugué par les enzymes de phase II sur la fonction activée, pour le rendre plus hydrophile afin d'augmenter sa solubilité. Enfin, ce composé est éliminé de la cellule grâce aux transporteurs actifs de phases III. Il peut être alors éliminé de l'organisme dans les urines, les selles ou la sueur (Figure 47).

Ces enzymes sont sous le contrôle de récepteurs solubles appelés « récepteur aux xénobiotiques » dont font partie le PXR (Pregnane X Receptor), le CAR (Constitutive Androstane Receptor) et le AhR.

Au milieu des années 70, le AhR est découvert par l'équipe du Dr D.W Nebert lors d'un programme de recherches visant à comprendre les mécanismes des cancers d'origine chimique. Dans un article, il évoque l'existence de gènes contrôlant l'induction d'enzymes à activité « aryl-hydroxylase » (Nebert et al., 1975) (Poland et al., 1976).

AhR est un facteur de transcription appartenant à la famille des protéines bHLH/PAS. Cette famille comporte de nombreux membres intervenant dans différentes voies de

signalisation, en plus de la réponse aux xénobiotiques, comme la réponse à l'hypoxie (HIF1 α), du rythme circadien (PER) et du développement neuronal (SIM). AhR s'hétérodimerise avec une autre protéine de cette famille: l'ARNT.

AhR est surtout connu pour être le récepteur aux dioxines. Ces dernières forment peut être le groupe de polluants environnementaux persistants (POP) le plus craint. L'appellation dioxine regroupe plusieurs composés chimiques différents comme les PCDDs, les PCDFs et les PCBs. Le ligand exogène le plus affiné de AhR est la TCDD (aussi appelée dioxine de Seveso). Ces polluants sont considérés comme des POPs en raison de leur hydrophobicité et de leur résistance aux mécanismes d'élimination des xénobiotiques. Ils s'accumulent dans le tissu adipeux, le foie et le cerveau.

Chez l'homme une exposition à la TCDD provoque des lésions dermatologiques (comme la chloracné dont est victime le candidat à l'élection présidentielle ukrainienne, Victor Ioutchentko, après son empoisonnement), des atteintes hépatiques et un syndrome cachéxique.

AhR fut longtemps enfermé dans son carcan de « détoxificateur ». Mais depuis quelques années, l'hypothèse que ce récepteur puisse avoir un rôle proprement physiologique commence à émerger. Cette idée est supportée par plusieurs indices comme le degré élevé de conservation de AhR au cours de l'évolution ainsi que les aberrations développementales observées chez les modèles d'animaux invalidés pour AhR.

Il semblerait donc que le rôle d'AhR ne se limite pas à celui auquel il a été assujéti pendant 30 ans. Un champ de recherche s'ouvre.

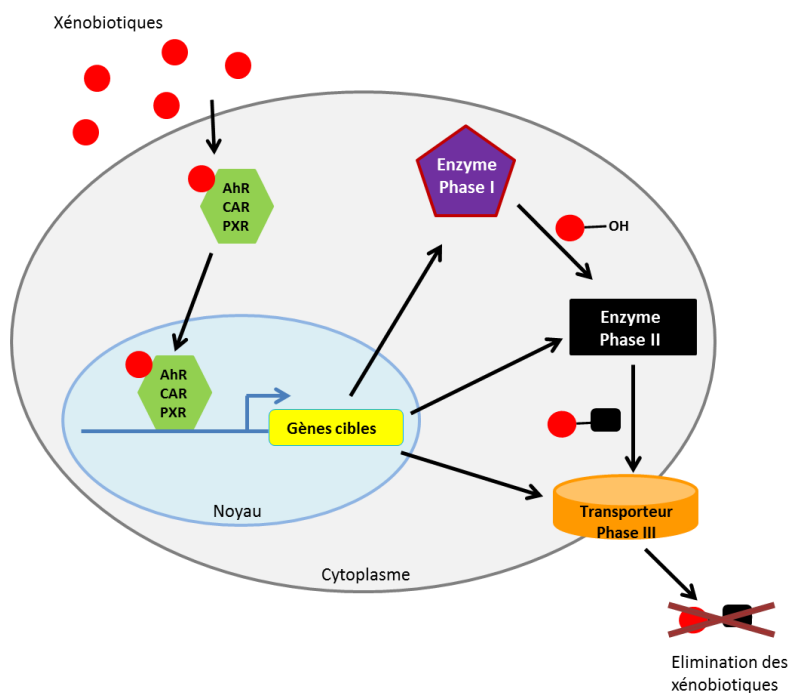


Figure 41: Schéma simplifié du métabolisme des xénobiotiques. Dans le cytoplasme des cellules, les xénobiotiques se lient et activent les récepteurs CAR, AhR et PXR. Ces derniers vont alors transloquer dans le noyau afin d'activer la transcription des gènes nécessaires à l'élimination des xénobiotiques.

4.2. Les ligands d'AhR

Les ligands du AhR sont multiples et peuvent être classés en plusieurs catégories :

4.2.1. Les ligands exogènes

La principale source d'exposition chez les animaux et l'Homme aux ligands exogènes provient de leur alimentation (90%). Les ligands exogènes peuvent être groupés selon leurs origines : « synthétique » ou naturelle (Denison and Nagy, 2003).

Les ligands d'origine synthétique incluent des polluants environnementaux dont les HAHs (hydrocarbures aromatiques halogénés) et les HAPs (hydrocarbures aromatiques polycycliques) (Figure 9). Les ligands de la famille des HAHs ont une forte affinité vis-à-vis du récepteur ; la TCDD, par exemple, a une constante de dissociation de l'ordre du nM pour le AhR humain. De plus, ces molécules sont très stables et s'accumulent dans l'environnement et les graisses animales. Les ligands de la famille des HAP ont une affinité moins importante, de l'ordre du μM . La plupart de ces ligands ont comme caractéristique structurale d'être

aromatique et plan. De plus, la plupart de ces polluants provoquent de nombreux effets toxiques chez les organismes vivants ; par exemple, le benzo(a)pyrène (BaP) a été classé cancérigène par l'OMS (organisation mondiale de la santé) du fait de sa génotoxicité (tout comme 14 autres HAP dont certains sont aussi des ligands du AhR). Les dioxines et certains autres polluants sont également produits en petite quantité lors d'éruptions volcaniques et de feux de forêt.

Des ligands d'origine naturelle, apportés par l'alimentation, ont également été identifiés comme agonistes et antagonistes du AhR. Par exemple, le resvératrol (3,5,4' trihydroxystilbène), qui appartient à la famille des polyphénols, a été identifié comme un antagoniste du AhR (Ciolino et al., 1998). Il est présent dans certains fruits comme le raisin et possède une activité anti-oxydante et anti-inflammatoire reconnue. D'autres molécules, dont les flavonoïdes, regroupent de nombreux composés naturels, sont également des ligands du AhR: la quercétine (présente dans certaines plantes comme dans le *Capparis spinosa*) est décrite comme un agoniste alors que l' α -naphthoflavone, dérivée synthétique des flavonoïdes, est couramment utilisée comme antagoniste du AhR. Cette molécule a la capacité d'empêcher la liaison des HAP et HAH sur le AhR tout en étant un agoniste partiel.

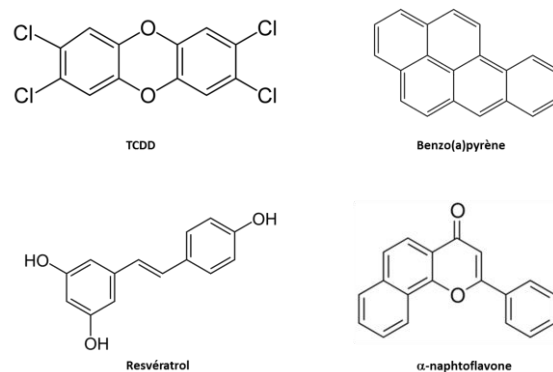


Figure 42 : Principaux ligands exogènes du AhR.

4.2.2. Les ligands endogènes

A ce jour, le ou les ligands physiologiques du AhR ne sont pas encore connus avec certitude. Cependant de nombreux candidats potentiels ont été identifiés et sont des régulateurs de l'expression de la batterie de gènes dépendants du AhR. Les ligands présumés incluent des dérivés du tryptophane et des indoles, l'acide arachidonique, certains leucotriènes (Lipoxine A4) et des métabolites de l'hème (bilirubine et biliverdine) (figure 43).

Parmi ces ligands, les dérivés du tryptophane ont été les plus étudiés. Le tryptophane est un acide aminé essentiel. Il est métabolisé en de nombreuses molécules actives comme la sérotonine et la cynurénine. Un article récent montre que dans des cellules de gliomes humains, la cynurénine se lie au AhR et provoque sa translocation nucléaire ainsi que l'activation de ses gènes cibles (Opitz et al., 2011).

De plus, le 6-formylindolo[3,2-b]carbazole (FICZ), produit lors de l'irradiation du tryptophane par les ultra-violetes (et ainsi produit naturellement dans la peau), a été identifié comme un ligand du AhR et un activateur du Cyp1A1 (Rannug et al., 1987) (Wei et al., 1998). Cette molécule possède une très haute affinité pour le AhR (de l'ordre du nM comme la TCDD). Le FICZ est surtout produit dans les kératinocytes, il est rapidement converti par le Cyp1A1 et ses métabolites sont retrouvés dans les urines humaines (Wincent et al., 2009). Cet agoniste puissant du AhR se différencie ainsi significativement des HAHs qui sont, de par leur lipophilie et leur résistance au métabolisme des xénobiotiques, généralement persistants et non métabolisés.

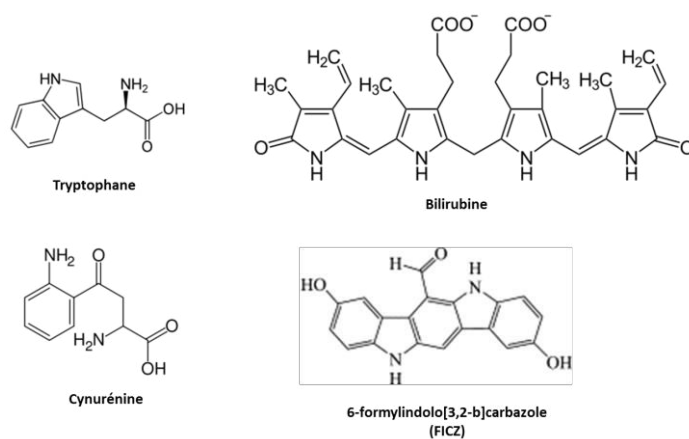


Figure 43 : Principaux ligands endogènes du AhR.

Le 7-ketocholestérol(7KC) appartient à la famille des oxystérols. Il est principalement produit par l'auto-oxydation du cholestérol. Cette molécule est un puissant modulateur endogène de AhR (Figure 44). En effet, le 7KC est un compétiteur féroce de la TCDD pour sa liaison au AhR. L'IC50 de cet oxystérol pour la TCDD est comprise entre 500nM et 7µM. Il empêche la liaison de AhR à ses éléments de réponses, XRE, inhibant ainsi l'activité transcriptionnelle de CYP1A1 (Savouret et al., 2001).

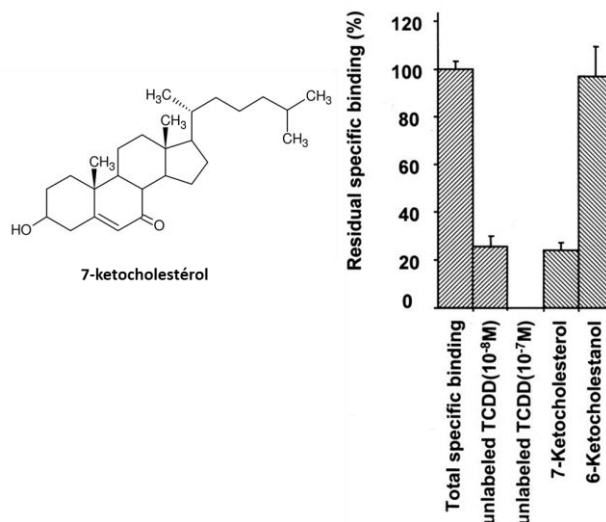


Figure 44 : Le 7-Ketocholestérol est un modulateur du AhR. Dans les cellules mammaires T47-D, le 7KC est le seul oxystérol capable de déplacer la liaison de la TCDD au AhR (Savouret et al., 2001).

4.3. Expression et régulation du AhR

Le gène codant pour AhR est situé sur le chromosome 7 chez l'homme et sur le chromosome 11 chez la souris (Le Beau et al., 1994) (Schmidt et al., 1993). Dans les deux espèces, son ARNm est constitué par 11 exons.

4.3.1. Patron d'expression du AhR

In vivo, de nombreuses études ont montré que le AhR était exprimé de façon ubiquiste avec, cependant, des variations du niveau d'expression selon les tissus. Chez l'Homme, les plus hauts niveaux d'expression sont retrouvés chez l'adulte dans le placenta, le poumon et le foie (Dolwick et al., 1993). Le AhR semble exprimé très tôt durant le développement embryonnaire. L'équipe du Dr. B.D. Abbott a étudié, par hybridation *in situ*, l'expression de l'ARNm durant le développement embryonnaire (de 10 à 16 jours de gestation) de souris C57BL/6N. Cette étude montre que le AhR est exprimé dès le 10ème jour de gestation dans le neuroépithélium, dans le ganglion trigéminal (au niveau de la branche ophtalmique et mandibulaire) et dans les cellules de la crête neurale dérivées des arcs branchiaux 1 et 2. L'expression de la protéine AhR décroît graduellement dans ces tissus jusqu'au jour 14 de

gestation. A contrario, il devient détectable dans certaines régions spécifiques du cerveau dont l'hippocampe (Abbott and Probst, 1995). Le AhR est également présent dans le système nerveux périphérique au niveau des ganglions rachidiens à partir du jour 12 de gestation.

Des expériences de Western Blot, ont déterminé la présence de AhR dans le cervelet de souris C57BL/6J (P0, 3, 6, 10, 21 et adulte). L'expression maximale de AhR se situe entre 6 et 10 jours post natal. Elle diminue par la suite (Williamson et al., 2005).

AhR et son partenaire ARNT (AhR Nuclear Translocator) sont généralement co-exprimés. Mais il existe aussi des différences d'expression dans certains tissus ; ceci peut être mis en relation avec les multiples fonctions d'ARNT qui lie d'autres partenaires protéiques (Schmidt and Bradfield, 1996).

4.3.2. Régulation de l'expression du AhR

Le promoteur du AhR ne contient ni de boîtes TATA ni de boîtes CCATT (comme l'ARNT et HIF1a). En revanche, il possède une région riche en GC. La liaison de SP1 (specificity protein 1) et de SP3 est indispensable pour une expression basale de AhR (Eguchi et al., 1994) (Fitzgerald et al., 1998) (Wolff et al., 2001). Ces caractéristiques sont celles d'un gène de ménage (Eguchi et al., 1994) (Garrison and Denison, 2000).

L'expression d'AhR est régulée par plusieurs voies de signalisation (Wnt, AP1 (activator protein 1, PPAR α (Peroxisome proliferator-activated receptor alpha)...). Le promoteur du AhR humain contient six éléments de réponse à AP1 et deux sites de liaison de AP2 (Wolff et al., 2001). La stimulation d'AP1, dans les MCF7, entraîne une augmentation de l'expression de AhR, signature des gènes de défense au stress (Spink et al., 1998).

L'expression du AhR est également induite par le TGF β dans des cellules cancéreuses de poumons humain (Döhr et al., 1997) et dans les HepG2 (Wolff et al., 2001) ainsi que par le PPAR dans des cellules cancéreuses du colon (Fallone et al., 2005).

Un traitement des cellules cancéreuses de la prostate par le Lithium chloride, par un milieu conditionné Wnt3a ou par transfection de la forme hyperactive de la β -caténine provoque également une augmentation de l'expression de AhR (Chesire et al., 2004).

Le gène AhR est également sous la régulation épigénétique. La TSA, un inhibiteur des HDAC provoque une induction de l'expression de ce dernier (Garrison et al., 2000).

4.4. Structure protéique du AhR

AhR est une protéine constituée de 848 acides aminés (96 KDa) chez l'homme et de 805 acides aminés (90 KDa) chez la souris C57bl6.

Il est composé de 3 grands domaines : le domaine basique loop helice loop (bHLH), le domaine PAS et le domaine de transactivation (TAD) (Figure 45).

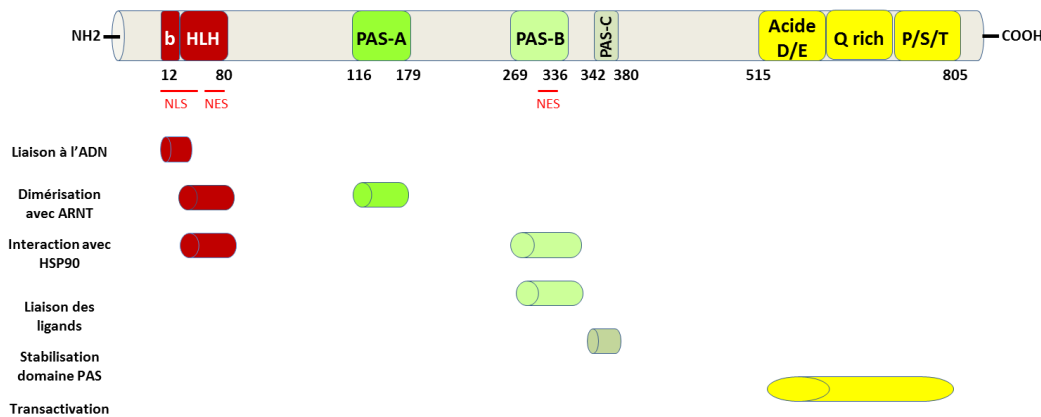


Figure 45 : Principaux domaines protéiques de AhR Sur schéma est représenté en rouge le domaine bHLH, en vert les trois domaines PAS et en jaune le TAD.

4.4.1. Le domaine bHLH

Ce domaine forme la région N-terminale de AhR. Il est commun à de nombreux facteurs de transcription comme c-Myc ou MyoD (Myogenin D). Il est subdivisé en 2 sous domaines. Tout d'abord, le sous domaine basique (b) composé d'acides aminés chargés positivement. Il permet l'interaction du facteur de transcription avec la séquence d'ADN chargée négativement. Le sous domaine HLH est important pour l'hétérodimerisation du AhR avec l'ARNT. Il porte également un motif NES (Nuclear Export Signal) permettant l'export nucléaire du AhR. A cheval sur les deux sous domaines, AhR possède également une séquence de localisation nucléaire NLS (Nuclear localisation Signal).

4.4.2. Le domaine PAS

La partie centrale de AhR est constituée par le domaine PAS. C'est un motif très conservé au cours de l'évolution. On le retrouve chez les plantes, les procaryotes, les invertébrés et les vertébrés. Il est présent dans les protéines impliquées dans la perception de l'environnement (senseur d'oxygène, de lumière...).

PAS est un acronyme formé par la première lettre des protéines où il fut initialement identifié :

- PER: protéine, codée par le gène période chez la drosophile, impliquée dans la régulation du rythme circadien (Reddy et al., 1986) (Citri et al., 1987).
- ARNT: identifié comme essentiel dans la signalisation du AhR (Hoffman et al., 1991).
- SIM: protéine codée par le locus Single Minded importante pour le développement neurologique (midline cell lignage) chez la drosophile (Jackson et al., 1986) (Nambu et al., 1991).

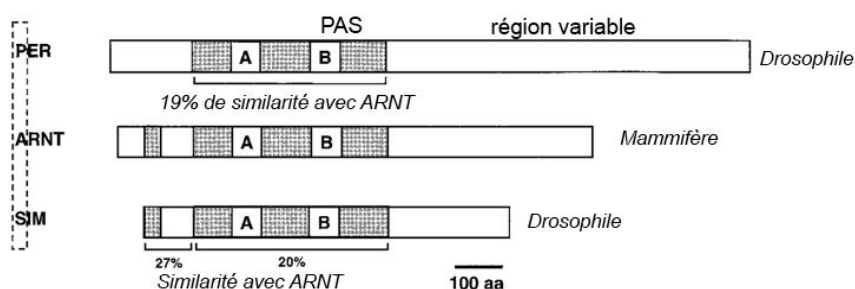


Figure 46 : Structure des membres fondateurs de la famille PAS : Per, ARNT et Sim. Le pourcentage d'homologies de SIM et PER par rapport à ARNT est indiqué (Gu et al., 2000).

Le domaine PAS est défini comme étant la région homologue entre ces 3 protéines fondatrices. Il est composé de 250 à 300 acides aminés contenant 2 sous domaines appelés A et B séparés par environ 50 acides aminés imparfaitement répétés (Hoffman et al., 1991) (Nambu et al., 1991).

Bien qu'à la lecture de la séquence primaire, le domaine PAS soit assez divergent d'une protéine à une autre, l'architecture 3D de ce domaine est très conservée (Henry and Crosson, 2011).

PAS A est impliqué dans l'hétérodimerisation avec ARNT. PAS B est surtout important pour la liaison du ligand : c'est le ligand binding domaine (LBD) du AhR. Il permet également la liaison d'une protéine chaperonne HSP90 et contient une autre séquence NES.

Dans les protéines impliquées dans le rythme circadien, en C-terminal de PAS A et B, un domaine supplémentaire, PAS C a été identifié. Il contribue au maintien de la bonne conformation de PAS B.

4.4.3. Le domaine de transactivation (TAD)

Enfin, en C-terminal, le domaine transactivateur du AhR, aussi appelé TAD, est constitué de 3 parties:

- Une partie riche en résidus acides, Glutamate et Aspartate (515-538)
- Une partie riche en Glutamine (643-740) que l'on nomme « Q rich domain »
- Une dernière partie riche en Proline, Serine et Thréonine, abrégée sous l'acronyme P/S/T domaine

La seconde partie, Q rich, est importante pour la liaison des cofacteurs. Par exemple, les coactivateurs SRC 1, 2 et 3 sont présents sur les motifs XRE de Cyp1A1 après traitement par la TCDD (Kumar and Perdew, 1999). AhR est également capable de lier des corepresseurs comme SMRT (Fallone et al., 2004).

L'homologie de séquence entre le TAD murin et humain est faible (58%). Cette différence pourrait en partie expliquer quelques divergences dans l'induction de certains gènes cibles du AhR entre les cellules humaines et murines après traitement par la TCDD. De même, la variation tissulaire d'expression de ces coregulateurs pourrait en partie expliquer les différences de réponse et de sensibilité tissulaire et cellulaire à certains ligands du AhR.

4.5. Mécanisme d'action de AhR

En absence de ligand, AHR est localisé dans le cytoplasme. La liaison du ligand sur AhR permet donc son passage d'une forme inactive à une forme active.

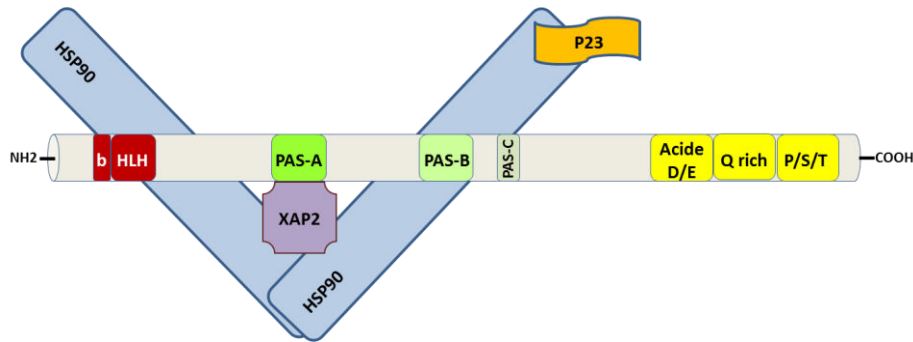


Figure 47: Représentation schématique du complexe cytoplasmique du AhR. Les 2 protéines chaperonnes Hsp90 interagissent, au niveau de leur domaine central, avec les domaines HLH et PAS-B du AhR alors que la protéine co-chaperonne p23 interagit avec Hsp90 au niveau de son domaine N-terminal. La protéine XAP2 se lie au AhR au niveau de sa partie centrale et aux Hsp90 au niveau de leur partie C-terminale (Petrulis and Perdew, 2002).

4.5.1. Le complexe cytoplasmique

Dans le cytoplasme, AhR forme un complexe protéique constitué d'un dimère de protéines chaperonnes ou « Heat shock proteines » 90 (Hsp90), de XAP2 (aussi nommée Ara9 ou AIP) et de la co-chaperonne p23 (Figure 47).

Les HSP90

Ahr est lié à 2 HSP90. Celles-ci sont impliquées dans la stabilité du AhR en le protégeant de l'ubiquitination. Elles favorisent également la liaison à ses ligands en lui permettant d'adopter une conformation adéquate. La première HSP90 interagit avec le domaine bHLH du AHR. Elle masque le motif NLS, favorisant ainsi sa rétention cytoplasmique. L'autre HSP90 est lié au domaine PAS B. Elle ne sera libérée que dans le noyau permettant alors l'interaction de AhR avec l'ARNT (Pongratz et al., 1992).

XAP2

Cette protéine chaperonne interagit avec AHR au niveau du domaine PAS A (Bell and Poland, 2000). Comme les HSP90, XAP2 est importante, d'une part en assurant la stabilité du AhR en le protégeant des ubiquitines ligases, et d'autre part, pour sa localisation cytoplasmique en masquant la deuxième séquence NLS et en permettant l'ancrage du AhR au réseau d'actine.

P23

P23 est une protéine co-chaperonne de AhR. Elle va se lier indirectement à ce dernier

grâce à la HSP90. P23 est importante pour la régulation de l'activité du récepteur. Son absence du complexe cytoplasmique, permettra à AhR d'être actif indépendamment de la présence de ligand (Kazlauskas et al., 1999).

Dans le cytoplasme, AhR peut également se complexer avec Src. Ce dernier va être relargué lorsque AHR sera activé par son ligand. Il pourra alors phosphoryler ses partenaires (Köhle et al., 1999). Par exemple, l'activation de la voie FAK/Src par la TCDD entraîne une modification structurelle des points focaux des HePG2 modifiant leurs propriétés migratoires (Tomkiewicz et al., 2013).

4.5.2. Le complexe nucléaire: interaction avec l'ARNT

ARNT aussi appelée HIF1 β est la première protéine «PAS domain» identifiée chez les mammifères. Cette protéine est exprimée de manière ubiquiste et intervient dans les réponses à l'hypoxie et aux xénobiotiques grâce à son hétérodimerisation, respectivement, avec HIF1 α et AhR.

Les souris ARNT $^{-/-}$ meurent à E10, 5 à cause d'un défaut d'angiogenèse empêchant la formation des vaisseaux sanguin du sac vitellin (Maltepe et al., 1997).

Le SNC et les reins expriment, en plus d'ARNT, une autre isoforme: l'ARNT2. Ces deux protéines ont une homologie de 90% (Dougherty and Pollenz, 2008). L'affinité du AhR pour ARNT ou ARNT2 est identique. Le recrutement d'une isoforme plutôt que d'une autre pourrait être dépendant de leur quantité respective et de la nature du ligand (Hankinson, 2008). ARNT2 s'hétérodimerise également avec HIF1 α . Les cultures primaires de neurones de souris ARNT2 $^{-/-}$ sont en stress hypoxique sévère. Contrairement aux souris ARNT $^{-/-}$, les souris ARNT2 $^{-/-}$ ont un développement embryonnaire normal mais meurent prématurément. Elles présentent un défaut de développement de l'hypothalamus identique à celui observés chez les souris SIM1 $^{-/-}$ (Keith et al., 2001). Ces résultats suggèrent que, malgré leur forte homologie de séquence, les 2 isoformes possèdent en plus de leurs rôles communs (notamment la réponse à l'hypoxie), des fonctions différentes.

4.5.3. L'activation par les ligands

Les ligands du AhR sont en général très lipophiles et diffusent à travers la membrane

plasmique des cellules. La liaison entre le ligand et le AhR induit un changement de conformation du récepteur qui provoque l'exposition du signal de localisation nucléaire présent dans la région N-terminale du récepteur. Le complexe formé du AhR, de la protéine Hsp90 restante, de p23 et du ligand, migre alors dans le noyau. Les protéines chaperonnes vont alors se dissocier et le AhR se lier avec son co-partenaire ARNT. Cette liaison masque la séquence d'exportation nucléaire du AhR. L'hétérodimère AhR/ARNT se lie à des éléments de réponse appelés « Xenobiotic Responsive Element » (XRE) localisés dans les promoteurs de gènes cibles et recrutent de nombreux coactivateurs (SRC1, P300, CBP) (Kobayashi et al., 1997), (Kumar and Perdew, 1999). Plusieurs de ces gènes cibles sont des enzymes du métabolisme des xénobiotiques telles que le cytochrome P450 1A1 (Figure 48).

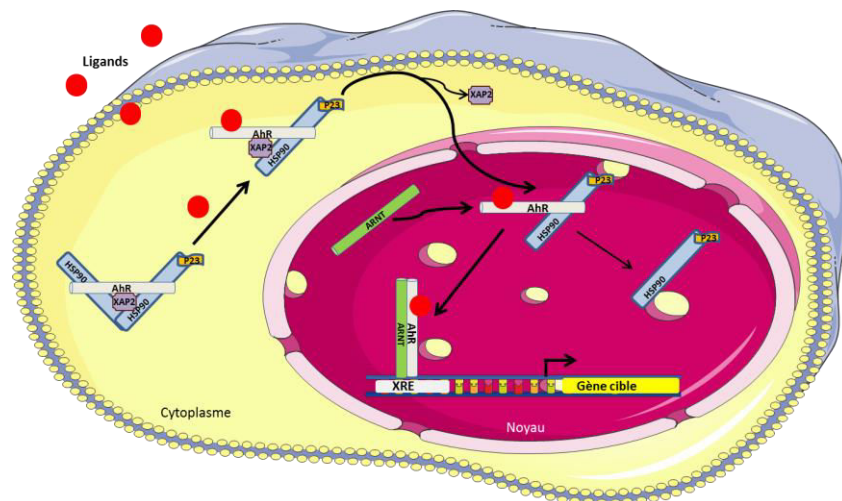


Figure 48: Voie de transduction du AhR. Le AhR fait partie d'un complexe cytoplasmique qui comprend 2 protéines chaperonnes HSP90, une protéine co-chaperonne p23 et la protéine XAP2. Après liaison de son ligand, le AhR migre dans le noyau et s'hétérodimérise avec son partenaire ARNT. Cet hétérodimère se lie à l'élément de réponse aux xénobiotiques (XRE, 5'- TNGCGTG-3') dans les promoteurs des gènes cibles dont il active la transcription.

4.5.4. XRE et séquences associées

Le XRE est constitué par la séquence 5'-TNGCGTG-3'. AhR se lie sur le demi site TNGC alors que ARNT occupe l'autre moitié de la séquence (GTG) (Bacsi et al., 1995) (Schmidt and Bradfield, 1996). Ce site est dit canonique. C'est le site de liaison classique de AhR sur le promoteur de Cyp1A1 après traitement par la TCDD. Mais des études plus récentes montrent que l'hétérodimère AhR/ARNT est capable de se lier à des séquences XRE non conventionnelles présentes sur les promoteurs des gènes PON1 (Paraoxonase 1) et BAX, en

fonction des ligands mis en jeu (Gouédard et al., 2004).

4.5.5. Modifications post-traductionnelle

Les modifications post-traductionnelles du AhR peuvent moduler son activité indépendamment de sa régulation par ses ligands. La phosphorylation des sérines 12, 16 et 36 du NLS, par la PKC, bloque le AhR dans le cytoplasme malgré la présence de ligand. Ces phosphorylations pourraient causer un défaut d'interaction entre le NLS et le transporteur nécessaire à la translocation nucléaire du AhR. A contrario, la phosphorylation de la sérine 68 du NES par la MAP kinase p38 bloque l'export du AhR du noyau vers le cytoplasme (Ikuta et al., 2004). La PKA, activée par une augmentation de l'AMP cyclique, phosphoryle le AhR ce qui provoque sa translocation nucléaire dans la lignée cellulaire (Hepa1). Mais l'ARNT ne se lie pas à cette forme nucléaire de AhR. Cette translocation nucléaire du AhR n'influence pas l'expression du Cyp1a1, ce qui suggère l'activation d'une réponse alternative encore inconnue (Oesch-Bartlomowicz et al., 2005). L'oméprazole, inhibiteur des pompes à protons utilisé comme antiulcéreux, induit l'expression du Cyp1a1 *via* le AhR mais sans le lier directement (Dzeletovic et al., 1997). Ce processus impliquerait la phosphorylation de la tyrosine 320 du AhR par des protéines kinases activées par l'oméprazole (Backlund and Ingelman-Sundberg, 2005).

4.5.6. Inhibition du signal AhR

Il est important que la protéine AhR soit régulée. D'une part afin de contrôler la durée et l'amplitude de la réponse du AhR après son activation par ses ligands; d'autre part pour permettre la libération de l'ARNT afin qu'il puisse agir avec ses autres partenaires (HIF1 α , SIM1...) dans d'autres voies de signalisation. L'expression et l'activité de AhR peuvent être modulée de 2 manières: premièrement grâce à sa dégradation par le protéasome, deuxièmement par l'action d'une autre protéine à domaine PAS, le AhRR (Aryl hydrocarbon Receptor Repressor).

Le protéasome

Après liaison de son ligand, le AhR est rapidement dégradé. Sa concentration nucléaire

est maximale 1 à 2h après l'induction par la TCDD puis diminue rapidement (Pollenz et al., 1998). Cette dégradation est dépendante du protéasome puisque le MG132 empêche celle-ci. L'utilisation de la Leptomycine B, une drogue qui bloque l'export nucléaire, abolit également cette dégradation ce qui laisse penser que l'action du protéasome est cytoplasmique (Davarinos and Pollenz, 1999). Une autre protéine est indispensable à ce mécanisme. Il s'agit de l'ADPF (AhR degradation promoting factor). Elle se lie au domaine TAD et agit comme une E3 ubiquitine ligase (Ma and Baldwin, 2002) (Ma, 2007).

Le AhRR

Présentation générale

AhRR comme AhR et ARNT appartient à la famille des protéines bHLH-PAS. AhR et AhRR possèdent une forte homologie de chacun de ces deux domaines. AhRR peut donc s'hétérodimeriser avec l'ARNT et se lier aux séquences XRE. Mais AhRR ne possède ni de domaine PAS B ni de domaine Q riche. Il n'est donc pas directement sensible aux ligands de AhR et il est incapable de recruter des coactivateurs permettant la transcription de gènes cibles (Mimura et al., 1999) (Karchner et al., 2002) (Figure 49).

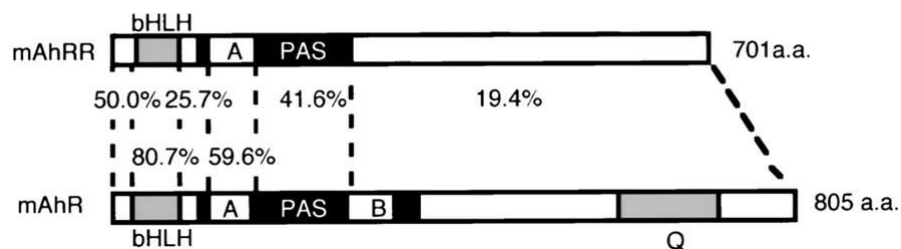


Figure 49: Représentation par domaines du AhRR et du AhR murin. Les valeurs (%) représentent le pourcentage d'homologie entre les domaines des AhR et AhRR murins. Les domaines bHLH et PAS A sont très conservés entre les 2 protéines contrairement au domaine C-terminal qui présente seulement 19,4% d'homologie (Mimura et al., 1999).

Le gène AhRR est localisé sur le chromosome 13 chez la souris. Il semble provenir d'une duplication du gène AhR ancestral. Il n'est exprimé ni chez les invertébrés, ni chez les vertébrés précoces. Il est apparu après le AhR dans l'évolution. (Dehal et al., 2002) (Goldstone et al., 2006).

Son promoteur contient 1 élément de réponse au NF κ B, 3 régions riches en GC et 3 (ou 4) séquences XRE (Baba et al., 2001). Il n'est donc pas surprenant de constater que l'expression de AhRR augmente après traitement par les ligands AhR.

Chez la souris, le cerveau et le cœur sont les organes où la quantité d'ARNm codant pour AhRR est la plus importante (Bernshausen et al., 2006).

Mécanismes d'action

Le fonctionnement de AhRR n'est pas encore bien compris. Au fil des études, 3 mécanismes d'action ont été proposés.

- Compétition pour l'ARNT.

AhRR, comme AhR, possède un domaine PAS A. Des expériences de co-immunoprécipitation montrent une interaction entre AhRR et ARNT (Mimura et al., 1999): AhRR inhiberait l'action du AhR en le privant de son hétérodimère l'ARNT. De plus, cela démasquera le motif NES du récepteur permettant ainsi sa dégradation dans le cytoplasme par le protéasome. Mais après surexpression d'ARNT, les effets répresseurs de AhRR sont toujours observés. Donc la compétition entre AhR et AhRR pour l'ARNT n'est pas le mécanisme de répression principal (Evans et al., 2008).

- Compétition pour l'XRE

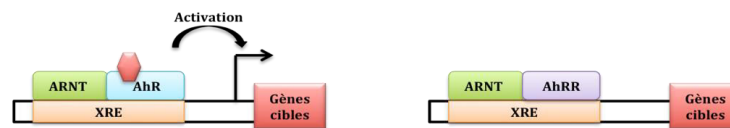
Les domaines bHLH de AhR et de AhRR sont homologues. Des expériences de CHIP indiquent une liaison de AhRR sur les séquences XRE (Mimura et al., 1999). AhRR serait donc capable de gêner la liaison de AhR sur ses éléments de réponses et ainsi de diminuer l'expression de ses gènes cibles. Mais une mutation du domaine basique, rendant AhRR incapable de se lier aux séquences XRE (mais ne touchant pas son signal NLS), n'abolit pas son activité répressive (Evans et al., 2008). Donc la compétition pour les XRE n'est pas non plus le mécanisme d'action principal de AhRR.

Pour aller encore plus loin, Evans *et al*, ont montré que la surexpression d'ARNT combinée à la mutation du domaine basique de AhRR n'ébranlait pas son pouvoir inhibiteur.

- Corépresseur

Un 3^{ème} mécanisme pourrait expliquer les effets du AhRR. AhRR en se liant au complexe AhR/ARNT/XRE empêcherait le recrutement de coactivateurs transcriptionnels et/ou favoriserait le recrutement de corépresseurs. Oshima *et al* ont montré que la partie C-terminale (342-701) de AhRR se lie à Ankra2. Cette protéine recrute des HDAC 4 et 5 ((Oshima et al., 2007). Mais cette hypothèse est controversée. Une étude montre, grâce à des mutants de délétion, que seule la partie N-terminale est importante pour le pouvoir répresseur de AhRR (Evans et al., 2008).

1) Compétition



2) Transrépression



Figure 50: Mécanismes de répression de la protéine du AhR par le AhRR. Le AhRR régule le AhR par 2 mécanismes : le premier mécanisme proposé est une compétition entre AhR et AhRR pour la liaison avec l'ARNT avec liaison de AhRR-ARNT. Le deuxième mécanisme proposé est la transrépression via la formation d'un complexe à 4 protéines (AhR-ARNT/AhRR-ARNT) (Hahn et al., 2009) (d'après Aline Chevallier).

4.6. Rôle du AhR dans le système nerveux

Très peu de données concernant le rôle du AhR dans le système nerveux sont disponibles. La majorité des articles publiés sur les mammifères consistent à étudier les conséquences d'une intoxication par la dioxine. Nous avons donc décidé d'analyser la bibliographie du AhR ou de ses homologues durant l'évolution pour tenter de comprendre son rôle chez les mammifères.

4.6.1. Phylogénie

Le récepteur Aryl hydrocarbure est bien conservé au cours de l'évolution. Il est aussi bien exprimé chez les invertébrés que chez les vertébrés. Chez les premiers, il ne contient pas de domaine PAS B (Kudo et al., 2009). Il ne lie pas des ligands exogènes comme la TCDD et l' α - et β -naphtoflavone (Reitzel et al., 2014) (Butler et al., 2001), ce qui ne signifie pas qu'il ne possède pas de ligands endogènes. Ils n'ont sans doute pas encore été identifiés. Cependant, il est aussi possible que le AhR soit un facteur de transcription classique.

L'anémone étoilée (*Nematostella vectensi*) exprime AhR au stade larvaire précoce dans le territoire du futur tissu neural. Il est intéressant de constater que l'ARNT est, lui, exprimé à un stade larvaire tardif. De plus, des expériences de co-immunoprécipitation semblent indiquer qu'il n'existe pas d'interaction entre eux. L'hétérodimerisation entre AhR et ARNT serait donc apparue plus tardivement (Reitzel et al., 2014). En effet chez la drosophile cette voie de signalisation est conservée. L'orthologue d'ARNT est nommé Tango.

Les résultats d'expériences d'inactivation du AhR, chez le nématode (*C.elegans*) et chez la drosophile (*D.Melanogaster*) démontrent son importance dans des fonctions endogènes, en particulier du système nerveux, non dépendante du métabolisme des xénobiotiques.

Le poisson zèbre (*Danio rerio*) est un modèle classiquement utilisé en ecotoxicologie. Il met en évidence l'évolution du rôle d'AhR. En effet, chez cette espèce 3 isoformes du AhR ont été mises en évidence : AhR1a, AhR1b et AhR2 (Karchner et al., 2005). AhR1a, dont le gène est localisé au niveau du chromosome 16, est principalement exprimé dans le foie et le rein et ne lie pas les ligands exogènes comme la dioxine ou la β -naphtoflavone (Andreasen et al., 2002). Sa fonction n'a pas encore été élucidée. Contrairement à AhR1a, les protéines AhR1b et AhR2 (dont les gènes sont adjacents sur le chromosome 22) ont la capacité de lier les ligands classiquement décrits chez les mammifères. AhR1b est exprimé très tôt durant le développement embryonnaire dans le cerveau, le cœur et les gonades contrairement à AhR2 dont l'expression est ubiquitaire. Le AhR2 est impliqué dans la réponse aux xénobiotiques alors que AhR1b possède une fonction plus physiologique qui reste encore à caractériser (Karchner et al., 2005).

Des homologues du AhR ont également été identifiés chez les oiseaux, les reptiles et

certaines amphibiens comme la grenouille (Hahn, 2002). Chez les mammifères, une unique isoforme du AhR a été identifiée (Hahn et al., 2006).

Nematode

Chez le nématode *Caenorhabditis elegans*, l'orthologue du AhR, nommé *ahr-1* (« aryl hydrocarbon receptor related 1 »), partage 56% d'homologie de séquence avec le domaine bHLH du AhR murin et 35% avec son domaine PAS (Mimura and Fujii-Kuriyama, 2003). De plus, l'équipe du Pr. Powell-Coffman a identifié la protéine co-partenaire de ce récepteur, appelée *aha-1* qui similairement à ARNT, se lie à de multiples protéines PAS comme le *ahr-1* et les facteurs induits par l'hypoxie (Powell-Coffman et al., 1998). Des études menées *in vitro* dans des réticulocytes de lapin ont montré que le *ahr-1* partage de nombreuses propriétés biochimiques avec son homologue murin. En effet, *ahr-1* est capable de se complexer avec les protéines chaperonnes Hsp90 et également avec ARNT. AhR-1 est exprimé pendant le développement embryonnaire et larvaire et plus particulièrement dans les neurones (Qin and Powell-Coffman, 2004). La mutation de AhR-1 provoque une atteinte des motoneurones GABA, les motoneurones RME (innervant les muscles de la tête et contrôlant le comportement de forage pour la recherche de nourriture).

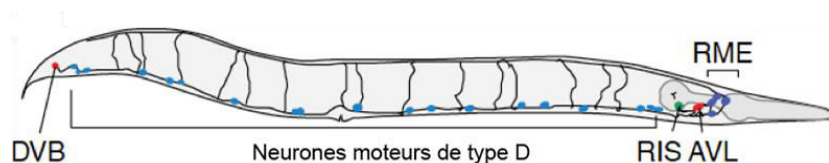


Figure 51 : Représentation schématique du système GABAergique du nématode *C.elegans*. Les motoneurones GABA de type D innervent les muscles du corps, les motoneurones AVL et DVB innervent les muscles entériques et le neurone RIS est un interneurone. Les motoneurones RME innervent les muscles de la tête, certains d'entre eux expriment le AhR et l'absence de ce dernier provoque un défaut de leur différenciation (Schuske et al., 2004) (schéma d'après Aline Chevallier).

Les 4 neurones RME se subdivisent en 2 lignées (gauche/droite ou dorsal/ventral) qui se différencient par leurs connexions dendritiques (Figure 51). Il a été montré que seuls les neurones RME du sous-groupe gauche/droite (RMEL, RMER ; L pour Left et R pour Right) exprimaient le *ahr-1*. Lorsque celui-ci est muté, ces neurones ont des défauts d'extensions synaptiques et d'expression de marqueurs spécifiques des neurones RMEL/R. Toutefois, la synthèse et le transport du GABA ne sont pas altérés. Les 2 neurones RMEL/R adoptent un

phénotype dorso-ventral identique aux neurones RMED/V (D pour dorsal et V pour ventral) (Huang et al., 2004). Le *ahr-1* joue ainsi un rôle dans le programme de différenciation des motoneurones RME. Les conséquences comportementales de ce défaut de différenciation n'ont pas encore été étudiées.

La perte du *ahr-1* entraîne également une suppression du comportement social d'alimentation des nématodes (Qin and Powell-Coffman, 2004). Ce comportement est régulé par divers facteurs environnementaux comme la concentration en oxygène et en nutriments. La sensibilité du ver aux variations en oxygène dépend de 4 neurones (AQR, PQR, URXR et URXL). La réexpression du *ahr-1* dans ses 4 neurones est suffisante pour restaurer le comportement social d'alimentation des nématodes *ahr-1* mutants.

AhR-1 est également impliqué dans la biosynthèse des acides gras polyinsaturés à longue chaîne (Aarnio et al., 2010). Ces acides gras peuvent perturber la plasticité neuronale chez le nématode (Marza and Lesa, 2006).

AhR-1 agit sur l'arborisation dendritique des neurones sensitifs (Smith et al., 2013). Les neurones nociceptifs PVD ont une arborisation dendritique importante, contrairement aux neurones du toucher AVM et PVM. L'arborisation dendritique du nématode est sous le contrôle de plusieurs facteurs de transcription. L'un des plus importants est MEC-3. Il est faiblement exprimé dans les neurones PVD et fortement exprimé dans les neurones AVM et PVM. AhR-1 augmente l'expression de MEC-3 ce qui diminue l'arborisation dendritique avantagant la mise en place des neurones AVM et PVM à la place des neurones PVD. De plus, l'augmentation d'expression de MEC-3 bloque l'activité de la protéine membranaire HPO-30 qui favorisait les PVD.

Drosophile

L'orthologue du AhR chez la *Drosophile melanogaster* est appelé Spineless (Ss). Cette protéine partage 71% d'homologie au niveau du domaine bHLH, 55% au niveau du domaine PAS-A du AhR murin et seulement 17% avec le PAS-B (Figure 16) (Duncan et al., 1998).

Des études *in vitro* et *in vivo* ont permis de mettre en évidence que le dimère Ss/Tango, induit en absence de ligands exogènes, la transcription de gènes possédant un XRE 5'-GCGTG-3' (Emmons et al., 1999). Ss est exprimé dans de nombreux tissus pendant le développement

embryonnaire et larvaire mais plus particulièrement dans les segments maxillaires, labiaux et mandibulaires de la tête, au niveau des pattes, antennes et « soies » ainsi que dans le système nerveux périphérique au niveau des segments thoraciques et abdominaux (McMillan and Bradfield, 2007). Ss est codé par un gène homéotique (qui influence la mise en place du plan d'organisation du corps chez la drosophile). Le mutant du gène Ss est pour la première fois étudié, en 1923, par un des pionniers de la génétique chez la drosophile, Calvin Bridges. Cette mutation provoque une réduction de la taille des soies. Peu après d'autres modifications phénotypiques ont été décrites chez ces mutants. Le segment distal des antennes est transformé en segment distal de pattes tandis que la région tarsale des pattes est absente. Ces modifications phénotypiques sont aussi présentes chez le mutant Tango (Emmons et al., 1999).

Le SNP de la drosophile contient peu de neurones sensoriels, environ 44 par hémisegment. Mais ils recouvrent une large partie de l'épiderme, grâce notamment à leur arborisation dendritique. La majorité de ces neurones sont des da neurones (« dendritic arborisation neurons »). Ils sont subdivisés en 4 catégories en fonction de la complexité de leur arborisation dendritique. Dans l'ordre de la moins complexe à la plus complexe nous avons : les da neurones I, II, III et IV. La classe IV compte à elle toute seule plus de ramifications que les 3 autres réunies. La thermoception, la nociception et la coordination rythmique de la locomotion sont le fait de ces neurones qui expriment tous en des niveaux similaires Ss et Tango.

La mutation de Ss provoque des anomalies dans l'arborisation dendritique de ces neurones.

Chez les da neurones de type I et II cette mutation entraîne une augmentation de l'arborisation dendritique ainsi que de la taille des épines. En revanche, les da neurones de catégorie III et IV, voient à l'inverse, une réduction de leur arborisation dendritique et de la taille de leur épines. Les mutants Ss ont une harmonisation des classes de da neurones. Il n'est plus possible de faire la différence entre un da neurone de classe I, II et III. Seul ceux de la classe IV restent identifiables malgré cette baisse.

Ss réprime donc la croissance et l'arborisation dendritique des neurones de classe I et II mais promeut celles-ci pour ceux de la classe III et IV.

Enfin, il est intéressant de noter que les auteurs de cette étude (Kim et al., 2006), ne retrouvent pas ces résultats chez le mutant Tango. Ils en concluent que Tango n'est pas le

partenaire d'AhR dans ce processus. Ce dernier emprunterait une autre voie.

Récemment, une équipe a inséré le AhR murin sous le contrôle d'un promoteur inductible dans des drosophiles mutantes pour Ss (Céspedes et al., 2010). Ils ont montré qu'en absence de dioxine, le AhR murin était capable de remplacer la fonction de Spineless chez la drosophile avec:

- Une restauration presque complète du phénotype lié à la perte de fonction de Spineless durant le développement.
- Une localisation du AhR murin dans le noyau comme son homologue invertébré.
- Une liaison à la protéine co-partenaire Tango. Ce travail suggère que le AhR a conservé ses fonctions ancestrales durant l'évolution. Ainsi, tout comme Spineless ou ahr-1, le AhR murin pourrait jouer un rôle important dans le développement et l'homéostasie du système nerveux.

4.6.2. Effets de la TCDD sur le système nerveux des mammifères

Les équipes de recherche se sont essentiellement concentrées sur les effets d'un ligand exogène du AhR, la TCDD (très utilisée du fait de sa spécificité mécanistique) au cours du développement et sur l'homéostasie du système nerveux. De plus, ce polluant environnemental s'accumule dans l'organisme au niveau des tissus gras comme, le cerveau (Kakeyama and Tohyama, 2003) durant une dizaine de jours chez la souris. Son caractère lipophile lui permet de passer les barrières hémato-encéphalique et placentaires. Enfin, diverses études épidémiologiques chez l'Homme et expérimentales chez l'animal montrent que la TCDD possède de nombreux effets neurotoxiques (Birnbaum and Tuomisto, 2000).

Etudes comportementales

Les études comportementales réalisées chez l'animal après une exposition à la TCDD durant le développement, révèlent:

- des défauts de coordination motrice chez des rats Wistar (diminution de leur habilité à rester sur le Rotarod) (Thiel et al., 1994).
- une altération de la mémoire spatiale de rats Sprague-Dawley dans le test du labyrinthe radial à 8 branches (Seo et al., 1999).
- une perturbation de la motricité sur le test du plan incliné chez de jeunes rats Wistar

(Nishijo et al., 2007).

Etudes épidémiologiques

Depuis 40 ans, les chercheurs s'intéressent aux effets des polluants organiques persistants (POPs) sur la santé humaine. De nombreux rapports cliniques montrent sans ambiguïté les effets néfastes de la TCDD et des PCBs SNC. La circonférence crânienne des nouveau-nés est inversement proportionnelle à la quantité de TCDD présent dans le lait maternel (Nishijo et al., 2008) (Tawara et al., 2009). Ceci est un indicateur du retard de maturation cérébrale chez le fœtus. Les enfants directement intoxiqués par les PCBs ou indirectement pendant la grossesse présentent des retards cognitifs. De nombreux cas de migraine ont aussi été signalés (Rogan and Gladen, 1992).

Effets de la TCDD sur les oligodendrocytes

Un seul article fait état de l'impact de la TCDD sur la myélinisation du SNC (Fernández et al., 2010). L'administration, à des rates Agouti noires au 18ème jour de gestation, d'une unique dose modérée de TCDD (0,7 ug/kg), par voie orale entraîne chez les rats de la portée (P2/3, P14, P30 et P135) une modification de l'expression de différents marqueurs de la différenciation oligodendrocytaire du cervelet:

- augmentation de Olig1 (« oligodendrocyte transcription factor 1 »), marqueur des cellules précurseurs indifférenciées de la lignée oligodendrocytaire (P14 à P135)
- augmentation de PDGFR α (« platelet derived growth factor receptor, alpha »), marqueur des oligodendrocytes en prolifération et non myélinisants (P2/3 et P14)
- diminution de la MBP (« Myelin Basic Protein »), marqueur des oligodendrocytes myélinisants (P135).

La TCDD induirait, ainsi, un retard de différenciation et de maturation des oligodendrocytes. Deux mécanismes sont suspectés : le premier serait un effet direct de la TCDD *via* le AhR durant la période critique de prolifération, migration et maturation des précurseurs des oligodendrocytes. Le second mécanisme proposé pourrait être un effet indirect de la dioxine sur les hormones endocrines (i.g œstrogènes et hormones thyroïdiennes) dont l'équilibre est important pour la maturation des oligodendrocytes et l'expression des gènes de la myéline.

Effets de la TCDD sur le système nerveux périphérique

Cependant les données concernant le SNP sont éparses, peu nombreuses et contradictoires. En 1987, Klawans diagnostique des polyneuropathies périphériques (PNP) sur 96% de la cohorte de 45 ouvriers exposés à la TCDD (Klawans, 1987). Pazderova-Vejlupková *et al* publient une étude où ils suivent sur 10 ans 80 ouvriers d'une usine d'engrais chimiques exposés à la TCDD entre 1965 et 1968. 23% de ces ouvriers présentent des neuropathies périphériques touchant essentiellement les extrémités inférieures (Pazderova-Vejlupková *et al.*, 1981). Une étude épidémiologique sur les populations Japonaise et Taïwanaise empoisonnée par de l'huile de riz contaminée par des PCBs montre une diminution de la vitesse de conduction nerveuse et une hypotonie (Rogan and Gladen, 1992).

En 1976, un accident dans l'usine « Icesma Chemical » entraîne l'échappement d'un nuage de TCDD qui retombe sur la ville de Seveso en Italie. Les études qui suivent sont toutes relatives à cette catastrophe écologique. En 1981, Filippini *et al* réalisent une étude électrophysiologique sur les habitants de cette ville. 22% d'entre eux, sans antécédent avant l'accident, présentent des polyneuropathies périphériques légères ou des signes subcliniques de polyneuropathies périphériques un an après la catastrophe (Filippini *et al.*, 1981). Six ans après l'accident, Barbieri *et al* ont enquêté sur 152 personnes ayant développé une chloracné. Bien qu'aucune polyneuropathie périphérique n'ait été identifiée chez ces patients, il y avait une augmentation significative des signes cliniques et électrophysiologiques d'atteintes de neuropathies périphériques (Barbieri *et al.*, 1988). Cependant, en 1989, Assenatto *et al* publient un article affirmant que sur 193 personnes ayant développé une chloracné aucune ne montre des signes cliniques ou électrophysiologiques de polyneuropathies périphériques, 9 ans après l'accident (Assenatto *et al.*, 1989).

En 1993, l'équipe du Dr Neundorfer publie deux articles sur la capacité de la TCDD à induire des polyneuropathies périphériques. Ils ont administré en injection intrapéritoneale bolus 4 doses de TCDD (2,2 µg, 4,4 µg, 6,6 µg et 8,8 µg/kg) à des rats males Wistar de 15 à 20 semaines pour la première étude (Grehl *et al.*, 1993) et à des rats males de souche mixte Han/Wistar d'environ 6 mois lors de la deuxième étude (Grahmann *et al.*, 1993). Ces doses sont considérées comme faibles (LD50 rat Wistar: 20-50 µg/kg et la LD50 rat Han/Wistar: 10000 µg/kg). Les rats ont connu une croissance et une prise de poids comparable au groupe contrôle (injection d'huile de maïs). Cela exclu, de ces études, le biais provoqué par la carence

en nutriments, vitamines et minéraux. Dix mois après le traitement par la TCDD, les deux articles font état d'une diminution de la vitesse de la conduction nerveuse des nerfs sensitifs (SCV) et moteur (MCV) de manière dose dépendante. Pour le groupe ayant reçu la dose la plus importante de TCDD cette perte s'élève à 30% pour la MCV et à 20% pour la SCV. Les électromyogrammes de ces rats montrent une augmentation importante de l'activité musculaire spontanée, signe d'une dénervation sévère. L'étude histologique du nerf sciatique et du nerf tibial met en évidence une réduction du nombre de fibres myélinisées, une dégénérescence axonale sévère et un amincissement extrême de la gaine (avec présence de phénotype en bulbe d'oignon pour les doses les plus élevées).

La sévérité des effets de la TCDD est proportionnelle à la dose injectée et au type de nerf étudié (le nerfs sciatique est plus sévèrement touché que le nerfs tibial). Mais elle est aussi dépendante d'une réponse interindividuelle assez large pour être signalée.

RESULTATS

Avant-propos

Les oxystérols, générés par l'oxydation du cholestérol, sont d'importantes molécules de signalisation impliquées dans la régulation de l'homéostasie du cholestérol. Malgré la littérature parfois contradictoire, il semble également avoir un rôle (bénéfique et/ou délétère) dans la progression des maladies neurodégénérative du SNC. Cependant, très peu de données bibliographiques n'étaient disponibles concernant leur rôle dans la myélinisation.

Nos objectifs sont les suivants :

1. Etudier l'impact des oxystérols et de leurs récepteurs LXRs dans la régulation de la myélinisation du SNP et du SNC.
2. Analyser le mécanisme d'action moléculaire des oxystérols dans les oligodendrocytes et les cellules de Schwann.
3. Tenter d'utiliser les ligands du LXR pour la remyélinisation.

Résumé des résultats obtenus :

1. Les oxystérols et leurs récepteurs (LXR α et β) sont présents dans le nerf sciatique et le cerveau. Ils sont synthétisés, entre autres, par les oligodendrocytes et les cellules de Schwann (Makoukji et al., 2011).
2. Nos résultats suggèrent que les ligands du LXR exercent un effet inhibiteur sur l'expression des gènes de la myéline périphérique P0 et PMP22 (Makoukji et al., 2011) mais qu'ils activent l'expression des gènes de la myéline centrale MBP et PLP (Meffre et al, en révision).
3. Le mécanisme d'action répresseur des oxystérols passent par une régulation négative de la voie Wnt/ β -caténine dans le SNP. La différence d'effet du LXR dans les oligodendrocytes et les cellules de Schwann pourrait être due à une régulation différentielle de la voie Wnt/ β -caténine (Shackleford et al., 2013).
4. Les ligands du LXR sont capables de stimuler la remyélinisation du cervelet après lésion par la lysolécithine (Meffre et al, en révision).

**Interplay between LXR and Wnt/ β -Catenin Signaling in
the Negative Regulation of Peripheral Myelin Genes
by Oxysterols**

Joelle Makoukji,¹ Ghjuvan'Ghjacumu Shackelford,¹ Delphine Meffre,¹ Julien Grenier,¹ Philippe Liere,² Jean-Marc A. Lobaccaro,³ Michael Schumacher,² and Charbel Massaad¹

The Journal of Neuroscience, June 29, 2011 • 31(26):9620–9629

Interplay between LXR and Wnt/ β -Catenin Signaling in the Negative Regulation of Peripheral Myelin Genes by Oxysterols

Joelle Makoukji,¹ Ghjuvan'Ghjacumu Shackleford,¹ Delphine Meffre,¹ Julien Grenier,¹ Philippe Liere,² Jean-Marc A. Lobaccaro,³ Michael Schumacher,² and Charbel Massaad¹

¹University Paris Descartes, Unité Mixte de Recherche (UMR) 8194, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), 75270 Paris, France, ²UMR 788, Inserm and University Paris-Sud 11, Institut Fédératif de Recherche 93, 94276 Le Kremlin-Bicêtre, France, and ³UMR CNRS and University Blaise Pascal 6547, and Centre de Recherche en Nutrition Humaine d'Auvergne, 63177 Aubière, France

Oxysterols are reactive molecules generated from the oxidation of cholesterol. Their implication in cholesterol homeostasis and in the progression of neurodegenerative disorders is well known, but few data are available for their functions in the peripheral nervous system. Our aim was to study the influence of oxysterols on myelin gene expression and myelin sheath formation in peripheral nerves. We show by gas chromatography/mass spectrometry that Schwann cells and sciatic nerves contain 24(S)-hydroxycholesterol, 25-hydroxycholesterol, and 27-hydroxycholesterol and that they express their biosynthetic enzymes and receptors (liver X receptors LXR α and LXR β). We demonstrate that oxysterols inhibit peripheral myelin gene expression [myelin protein zero (MPZ) and peripheral myelin protein-22 (PMP22)] in a Schwann cell line. This downregulation is mediated by either LXR α or LXR β , depending on the promoter context, as suggested by siRNA strategy and chromatin immunoprecipitation assays in Schwann cells and in the sciatic nerve of LXR knock-out mice. Importantly, the knock-out of LXR in mice results in thinner myelin sheaths surrounding the axons. Oxysterols repress myelin genes via two mechanisms: by binding of LXRs to myelin gene promoters and by inhibiting the Wnt/ β -catenin pathway that is crucial for the expression of myelin genes. The Wnt signaling components (Disheveled, TCF/LEF, β -catenin) are strongly repressed by oxysterols. Furthermore, the recruitment of β -catenin at the levels of the MPZ and PMP22 promoters is decreased. Our data reveal new endogenous mechanisms for the negative regulation of myelin gene expression, highlight the importance of oxysterols and LXR in peripheral nerve myelination, and open new perspectives of treating demyelinating diseases with LXR agonists.

Introduction

The myelination of axons is a complex process performed by Schwann cells in the peripheral nervous system (PNS) (Garbay et al., 2000). Peripheral myelin genes Myelin Protein Zero (MPZ) and Peripheral Myelin Protein-22 (PMP22) expression is tightly regulated in Schwann cells (Niemann et al., 2006). A slight change in PMP22 or MPZ expression has a deep impact on the development and preservation of nerve fibers and their myelin sheaths, as observed in Charcot-Marie-Tooth disease (Roa et al., 1996).

Few cellular signals are known to directly regulate the myelin genes expression. We have shown that steroid hormones (Désarnaud et al., 2000) and more recently that the canonical Wnt/ β -catenin signaling pathway is a direct driver of myelin gene

expression. Inactivation of Wnt components in zebrafish embryos or in mouse Schwann cells led to severe dysmyelination and the inhibition of myelin gene expression (Tawk et al., 2011). However, endogenous factors involved in the inhibition of myelin gene expression have so far been neglected.

Oxysterols are natural compounds originating from the enzymatic oxidation of cholesterol. There are different oxysterols, in particular 24(S)-hydroxycholesterol [24(S)-OH], 25-hydroxycholesterol (25-OH), and 27-hydroxycholesterol (27-OH), which are, respectively, synthesized by means of the cholesterol hydroxylase CYP46A1, CH25H, and CYP27A1 α (Russell, 2000). They are implicated in cholesterol turnover, inflammation, and neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease (Lütjohann et al., 2000; Papassotiropoulos et al., 2002) and multiple sclerosis (Leoni et al., 2002; Teunissen et al., 2003). Glial cells are also targets for the oxysterol action: they inhibit astrocyte proliferation after brain injury (Bochelen et al., 1995) and cause oligodendrocyte apoptosis (Trousson et al., 2009).

Oxysterols are natural ligands for liver X receptors (LXRs) (Janowski et al., 1996), which has two isoforms: LXR α and LXR β . LXRs regulate gene expression by binding to responsive elements (LXRE). In the absence of ligands, LXRs bind to corepressors (Chen and Evans, 1995; Hörlein et al., 1995). In response to

Received Feb. 8, 2011; revised May 5, 2011; accepted May 11, 2011.

Author contributions: P.L. and C.M. designed research; J.M., G.G.S., D.M., J.G., and J.-M.A.L. performed research; J.-M.A.L. contributed unpublished reagents/analytic tools; P.L. and C.M. analyzed data; M.S. and C.M. wrote the paper.

This work was funded by Inserm, CNRS, University Paris Descartes, University Paris Sud 11, and the Association Française contre les Myopathies. J.M. and G.G.S. received PhD fellowships from the French Ministry of Research. We acknowledge Dr. Alain Schmitt of the Cochin Imaging Facility.

Correspondence should be addressed to Prof. Charbel Massaad, CNRS, UMR 8194, Université Paris Descartes, 45 rue des Saints-Pères, 75270, Paris Cedex 6, France. E-mail: charbel.massaad@parisdescartes.fr.

DOI:10.1523/JNEUROSCI.0761-11.2011

Copyright © 2011 the authors 0270-6474/11/319620-10\$15.00/0

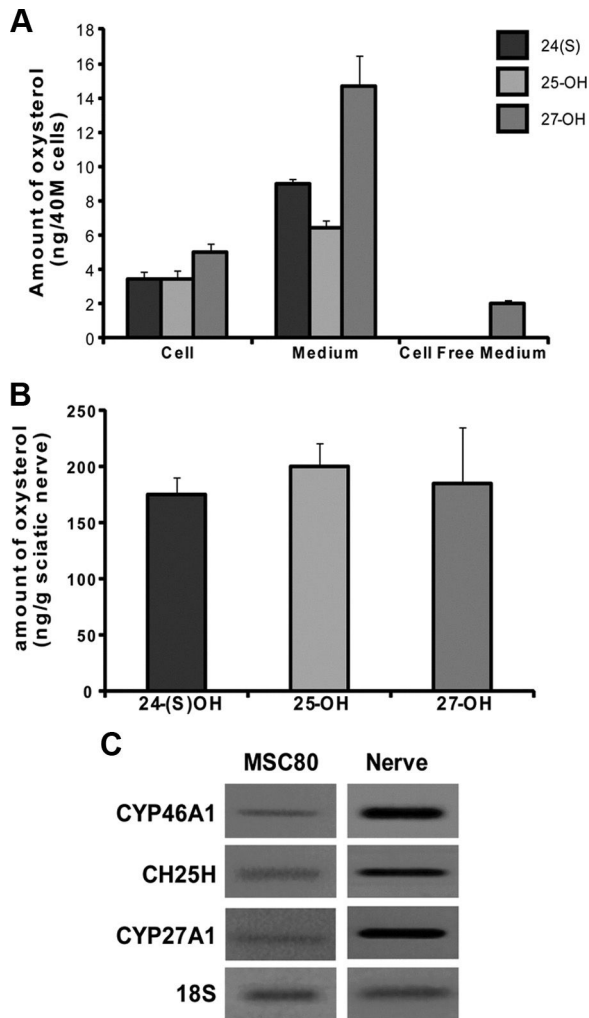


Figure 1. Analysis of oxysterols by GC/MS and expression of their biosynthetic enzymes in MSC80 cells and mouse sciatic nerve. **A**, MSC80 cells were cultured under normal conditions. After 72 h, medium and cells were separated to measure oxysterols by GC/MS. Results are expressed in nanograms per 40 million (M) cells and represent the means \pm SEM of three independent experiments performed in duplicate. **B**, Oxysterols were extracted from sciatic nerves of 8-week-old mice and were analyzed by GC/MS. Results are expressed in nanograms per gram of sciatic nerve tissue and represent the means \pm SEM of eight independent experiments performed in duplicate. **C**, Total RNA from MSC80 cells and mouse sciatic nerves was prepared. qRT-PCR experiments were performed by using primers recognizing specifically CYP46A1, CH25H, or CYP27A1. PCR products were analyzed on agarose gel (2%) and visualized under UV. 18S RNA was detected by specific primers and used to normalize the expression levels.

oxysterols binding, they interact with coactivators (Huuskonen et al., 2004) to transactivate. In the case of inflammatory genes, LXR is able to repress transcription in the presence of ligands by recruiting coregulator (Wang et al., 2008).

Studies with transgenic mice revealed important roles of LXRs within the nervous system (Andersson et al., 2005). *LXR β ^{-/-}* or *LXR α/β ^{-/-}* transgenic mice show several defects, such as axonal atrophy, neuronal loss, astrogliosis, and lipid accumulation in specific brain regions. Nevertheless, the role of oxysterols and LXRs has remained unexplored in the PNS, in particular their potential influence in myelination.

Here, we report a major role of oxysterols in the PNS. We showed that oxysterols are produced by a Schwann cell line and in sciatic nerves and that they inhibit peripheral myelin gene expression by mechanisms involving LXR and the Wnt/ β -catenin path-

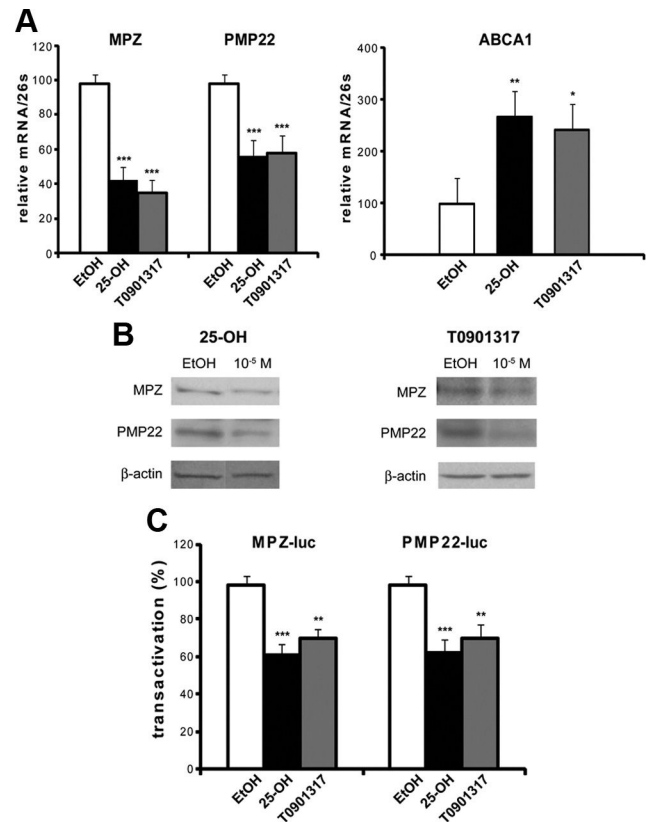


Figure 2. Effects of oxysterols on the expression of MPZ and PMP22 in MSC80 cells. **A**, MSC80 cells were treated with ethanol (vehicle), 25-OH, or T0901317 at 10 μ M during 24 h. Total RNA was extracted, and quantitative real-time PCR experiments were performed using primers recognizing MPZ, PMP22, or ABCA1. The RT-PCR was normalized using 26S RNA, and they represent the mean \pm SEM of at least four independent experiments. **B**, MSC80 cells were treated with ethanol (vehicle), 25-OH, or T0901317 at 10 μ M during 24 h. Western blots were performed using either anti-MPZ or anti-PMP22 antibodies to verify their expression in MSC80 cells. β -Actin was used to normalize the Western blots. Results were reproduced in three independent experiments, and figures represent a typical experiment. **C**, MSC80 cells were transiently transfected with MPZ-Luc or PMP22-Luc constructs. Sixteen hours after transfection, cells were incubated with 25-OH or T0901317 at 10 μ M for 24 h, and then β -galactosidase and luciferase activities were analyzed. Results represent the means \pm SEM of at least 11 independent experiments performed in duplicate. * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 by Tukey's *post hoc* tests after one-way ANOVA when compared with control.

way. Furthermore, *LXR α/β ^{-/-}* knock-out (KO) mice exhibit thinner myelin sheaths around their axons. Our results show, for the first time, the implication of LXR and oxysterols in the negative regulation of myelin gene expression.

Materials and Methods

Animals. Eight-week-old male mice (C57BL/6:129Sv) were purchased from Janvier. *LXR α/β ^{-/-}* knock-out mice and their wild-type (WT) controls were maintained on a mixed strain background (C57BL/6:129Sv) and housed in a temperature-controlled room with a 12 h light/dark cycle (Cummins and Mangelsdorf, 2006). All experiments were performed on age-matched male mice (8 weeks old). Animals were fed *ad libitum* with water and Global-diet 2016S from Harlan containing 16% protein, 4% fat, and 60% carbohydrates. To reduce the effect of stress, the elapsed time between the capture of a mouse and its death by decapitation was under 30 s. Sciatic nerves were collected and frozen in liquid nitrogen. All aspects of animal care were approved by the Regional Ethic Committee (authorization CE2-04).

Cell culture. The mouse Schwann cell line (MSC80) was maintained in DMEM supplemented with 10% decomplemented fetal calf serum (Hyclone-Perbio), 1% penicillin, 1% streptomycin (Invitrogen), and 1%

glutamine. All cultures were grown at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂.

Plasmids and chemicals. MPZ promoter–luciferase reporter (MPZ–Luc) was graciously provided by Dr. G. Lemke (The Salk Institute, La Jolla, CA) and PMP22–Luc by Dr. P. Patel (Baylor College of Medicine, Houston, TX). The siRNAs directed against LXR α and LXR β were purchased from Dharmacon. Each LXR isoform was targeted by four different separate siRNA recognizing four different regions of LXR transcripts. The siRNA that we have used did not have any off-target effect. 25-OH was purchased from Sigma-Aldrich and TO901317 from SPI-Bio.

Transient transfections. MSC80 cells were transiently transfected using Effecten reagent (Qiagen). One day before the transfection, MSC80 cells (1.5×10^5 cells per well) were grown into six-well plate and incubated in the DMEM culture medium containing 10% de-complemented fetal calf serum. The MPZ–Luc or the PMP22–Luc plasmid (0.3 μ g), the pRSV– β -galactosidase expression vector (0.1 μ g), and siRNAs at the concentrations indicated in the figure legends were mixed with a solution containing Effecten reagents (0.85 mg/ml) in DMEM. The mixture was then added to the cells and incubated overnight. Sixteen hours after transfection, the medium was replaced by DMEM with or without 25-OH (10 μ M) or TO901317 (10 μ M). Luciferase activity was determined using the enzymatic method described by Massaad et al. (2000). The β -galactosidase activity was used to normalize the transfection efficiency.

Quantitative and semiquantitative RT-PCR experiments. Total RNA from cultured MSC80 was obtained using RNA NOW (Ozyme). One microgram was reverse transcribed with random primers from Promega and reverse transcriptase MMLV-RT from Invitrogen. PCR experiments were performed using TaqDNA polymerase purchased from Promega and primers specific to each gene from Operon. PCR products were analyzed on agarose gel (2%) and visualized under UV.

Quantitative real-time PCR was performed with standard protocols using SYBRGreen ROX Mix (ABgene) as a fluorescent detection dye in ABI PRISM 7000 in a final volume of 10 μ l, which also contains 300 nm primers (Operon) and 20 ng of reverse-transcribed RNA in 384-well plates. To characterize the generated amplicons and to control the contamination by unspecific byproducts, a melting curve analysis was applied. Each reaction was performed in triplicate, and the mean of at least three independent experiments was calculated. All results were normalized to the 26S mRNA level and calculated using the Δ Ct method. The primer sequences used in real-time PCR included the following: MPZ forward (F), 5'GTCAAGTCCCCAGTAGAA3'; MPZ reverse (R), 5'AGGAGCAAGAGGAAAGCAC3'; PMP22 F, 5'AATGGACACACGACTGATC3'; PMP22 R, 5'CCTTTGGTGAAGTGAAGAG3'; LXR α F, 5'CAATGCCTGATGTTTCTCC3'; LXR α R, 5'TGACTCCAACCC-TATCCCTA3'; LXR β F, 5'CTTGTTGGTGTCTTCTTGA3'; LXR β R, 5'TGTGGTAGGCTGAGGTGTA3'; CYP46A1 F, 5'ATGCCAGGGAAG-AGAAAGC3'; CYP46A1 R, 5'CTTTGAGGATCTGCGTGAG3'; CH25H F, 5'ACCCACTCACCATCTTTAC3'; CH25H R, 5'GCCACGAT-TTTGTCCTCA3'; CYP27A1 F, 5'AGACCATCGGCACCTTTTC3'; CYP27A1 R, 5'GCACCACACCAGTCACTT3'; Disheveled 2 (DVL2) F, 5'GGCTT-GTGTCGTCAGATACC3'; DVL2 R, 5'TTTCATGGCTGCTGG-ATAC3'; DVL3 F, 5'CCGATGAGGATGATTCCACC3'; DVL3 R,

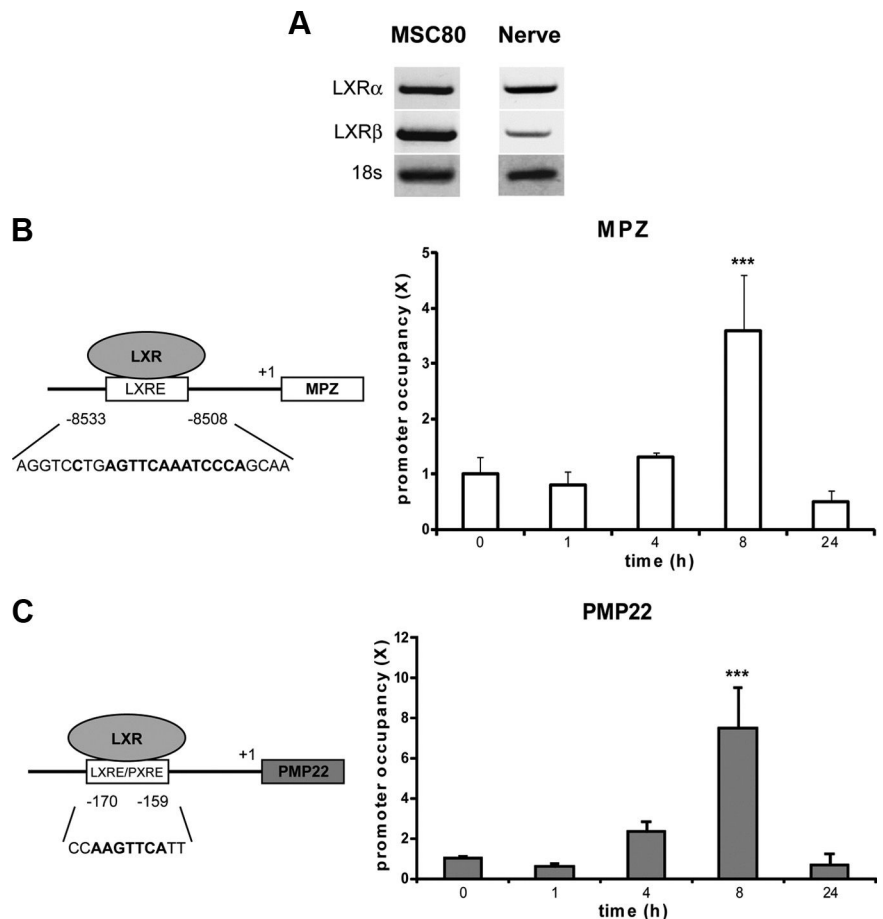


Figure 3. Expression of LXR α and LXR β and their implication in MPZ promoter activity in MSC80 cells. **A**, Total RNA from MSC80 cells or mouse sciatic nerves was prepared. RT-PCR experiments were performed by using primers recognizing specifically LXR α or LXR β . PCR products were analyzed on agarose gel (2%) and visualized under UV. 18S RNA was detected by specific primers and used to normalize LXR expression levels. Putative LXR binding sites located in MPZ (**B**) or PMP22 (**C**) promoters were identified with MatInspector software (Genomatix). To examine the occupancy of these sites by LXRs, cells were treated or not with 25-OH (10 μ M) during 1, 4, 8, or 24 h and then subjected to ChIP analysis using anti-LXR α / β antibody or C23 antibody as a non-relevant antibody. Quantitative real-time PCR was performed to detect MPZ and PMP22 promoter regions, including LXR and/or PXR binding elements. Results are the mean of at least four independent experiments. *** $p < 0.001$ by Tukey's *post hoc* tests after one-way ANOVA when compared with control.

5'TGAGGCACTGCTCTGTTCTG3'; TCF1 F, 5'TCAAGAGGTGG-GGGATTAGA3'; TCF1 R, 5'GCAGGAGAAGCATTGTAGG3'; LEF1 F, 5'AAGCCTCAACACGAACACAG3'; LEF1 R, 5'TGCACTCAGCTACGA-CATTTC3'; TCF3 F, 5'ACCCCTTCTGATGATTC3'; TCF3 R, 5'CGAC-CTTGTGCTTGTACT3'; β -catenin F, 5'GCCACAGGATTACAA GAAGC3'; β -catenin R, 5'CCACCAGAGTGAAAAGAAGC3'; 18S F, 5'CTACCACATCCAAGGAAGGC3'; 18S R, 5'CTCGGCCTGCTTT-GAACAC3'; 26S F, 5'AGGAGAAAACAACGGTCTGTCGCAAAA3'; 26S R, 5'GCGCAAGCAGGTCTGAATCGTG3'; LXRE F, 5'GGTCCT-GAGTTCAAATCCC3'; LXRE R, 5'GAACCTTCATCTGTTGT-TGG3'; LXRE/pregnane X receptor response element (PXRE) F, 5'GCTTTCAGGTTTCAGGGACA3'; LXRE/PXRE R, 5'TGGGA GATACACAAGCTGGA3'; ABCA1 F, 5'CTGTTTCCCCCAA CTTCTG 3'; and ABCA1 R, 5'TCTGCTCCATCTCTGCTTTC 3'.

Antibodies. Primary antibodies against MPZ (rabbit polyclonal) and PMP22 (rabbit polyclonal) were purchased from Abcam and β -catenin and LXR (mouse monoclonal) from BD Biosciences. Secondary antibodies used for Western blotting were HRP-conjugated goat anti-mouse IgG and HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG (Millipore).

Western blot. Protein content was determined using the "RC DC" protein assay kit (Bio-Rad) with BSA as standard. Aliquots of 20 μ g of total MSC80 extracts treated or not with 25-OH or TO901317 (10 μ M)

were used for each sample. Homogenate proteins were separated on 15% SDS-PAGE and blotted onto polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes. Nonspecific binding sites in the transblots were blocked at 4°C overnight with 2% ECL Advance blocking agent (GE Healthcare) with 0.1% Tween 20 (Invitrogen) in PBS. Membranes were then incubated at room temperature for 2 h with the following primary antibodies diluted in a mixture of 2% ECL Advance blocking agent and PBS–0.1% Tween: MPZ antibody (1:750), PMP22 antibody (1:750), β -catenin antibody (1:1000), and β -actin antibody (1:10,000). They were then incubated at room temperature for 1 h 30 min with the appropriate secondary antibody diluted in 2% blocking buffer/PBS–0.1% Tween (anti-rabbit at 1:20,000; anti-mouse at 1:20,000), followed by ECL Plus Western blotting detection (GE Healthcare) before exposure to radiographic film Hyperfilm ECL (GE Healthcare). Western blots were quantified by means of NIH Image J Software.

Chromatin immunoprecipitation. MSC80 cells treated with 25-OH for 1, 4, 8, or 24 h were fixed with 1% formaldehyde added to the medium for 10 min, scraped, and collected by centrifugation. Cells were resuspended in 300 μ l/ml lysis buffer (5 mM PIPES, pH 8.0, 85 mM KCl, and 0.5% NP-40) with a mixture of protease inhibitors (Roche). Cells were pelleted by centrifugation and resuspended in 300 μ l of 1% SDS, 10 mM EDTA, and 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, containing protease inhibitors. After incubation on ice for 10 min, they were sonicated six times for 30 s using Bioruptor (Diagenode). Lysates were then cleared by centrifugation, and the concentration of DNA was determined. Equal amounts of DNA were diluted 10 times in dilution buffer (0.01% SDS, 1% Triton X-100, 1.2 mM EDTA, 16.7 mM Tris-HCl, pH 8.1, and 167 mM NaCl). The chromatin solution was precleared for 1 h at 4°C on Protein A–Agarose/Salmon Sperm DNA beads from Millipore. After brief centrifugation and removal of the beads, DNA was incubated overnight at 4°C on a rotating wheel with 1 μ g of either β -catenin antibody or LXR antibody or non-relevant antibody (anti-C23). Immune complexes were collected on Protein A–Agarose/Salmon Sperm DNA beads from Millipore. Beads were washed sequentially in TSE (0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, and 20 mM Tris-HCl, pH 8.1) with 150 mM NaCl, TSE with 500 mM NaCl, buffer A (0.25 M LiCl, 1% NP-40, 1% deoxycholate, 1 mM EDTA, and 10 mM Tris-HCl, pH 8.1), and two times with Tris-EDTA, and then eluted with 200 μ l of 1% SDS and 0.1 M NaHCO₃. Crosslinks were reversed by heating at 65°C for 4 h after adding NaCl to 200 mM final concentration. After treatment with Proteinase K (50 μ g/ml) for 1 h at 37°C, DNA was purified using GeneClean Turbo kit (Q-Biogene). Real-time PCR analysis of inputs or immunoprecipitated DNAs was performed.

Oxysterols quantification by gas chromatography/mass spectrometry. MSC80 cells (40 \times 10⁶ cells) and their corresponding media were extracted separately with 10 vol of MeOH/CHCl₃ (1:1 v/v). Thirty nanograms of ²H₁₀-24(S)-OH cholesterol, as internal standard, and 50 μ g of butylated hydroxytoluene were added into extracts for oxysterols quantification and for avoiding cholesterol autoxidation processes, respectively.

Cholesterol was separated from oxysterols by solid-phase extraction. Samples were applied in CH₃CN/isopropanol (1:1 v/v) to a 500 mg C18 cartridge (International Sorbent Technology), and oxysterols were eluted with 12 ml of CH₃CN/Isopropanol/H₂O (55:25:25 v/v/v). This fraction was further purified by means of a second solid-phase extraction with a recycling procedure (Liere et al., 2004).

The oxysterol fraction was filtered through a 0.45 μ m Gelman PVDF membrane and was purified by HPLC (Thermo Fisher Scientific) and collected with a fraction collector (Gilson). HPLC was achieved with a Lichrosorb Diol column as described previously (Liere et al., 2000).

The oxysterols-containing fraction from HPLC was derivatized with *N*-methyl-*N*-trimethylsilyltrifluoroacetamide to form the di-trimethylsilyl ether derivatives of oxysterols.

Derivatized cells and media extracts as well as derivatized calibration solutions were injected with an AS 2000 autosampler (Thermo Electron Corporation) into the gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) system, which consisted of a TraceGC gas chromatograph coupled with an Autmass Solo mass spectrometer.

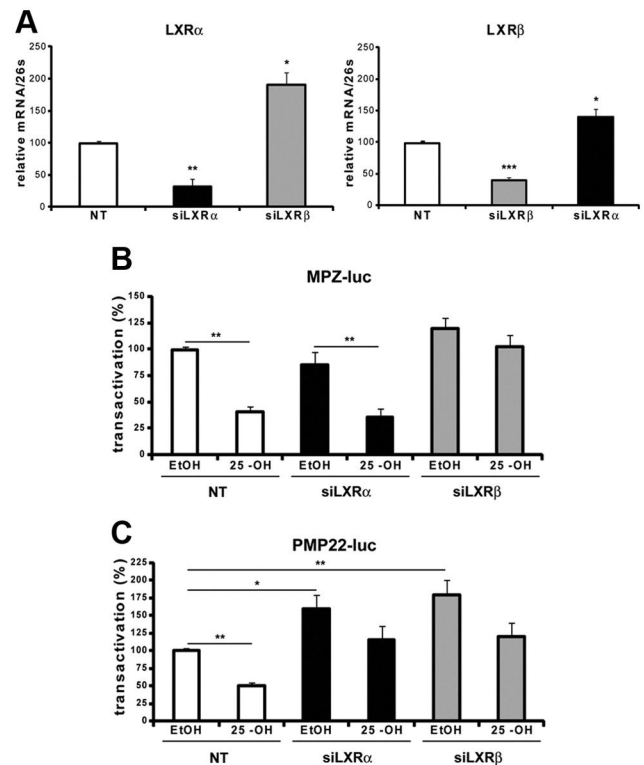


Figure 4. Implication of LXR α and LXR β in MPZ and PMP22 promoter activities in MSC80 cells. **A**, MSC80 cells were transfected with siRNA directed against LXR α or LXR β . The expression levels of LXR α and LXR β were determined by real-time RT-PCR and normalized by using 26S RNA. MSC80 cells were transiently transfected with either MPZ–Luc (**B**) or PMP22–Luc (**C**) plasmids and with siRNA directed against LXR α or LXR β . Sixteen hours after transfection, cells were incubated with 25-OH (10 μ M) for 24 h, and then β -galactosidase and luciferase activities were analyzed. Results represent the mean \pm SEM of at least six independent experiments performed in duplicate. * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 by Tukey's *post hoc* test after one-way ANOVA when compared with control.

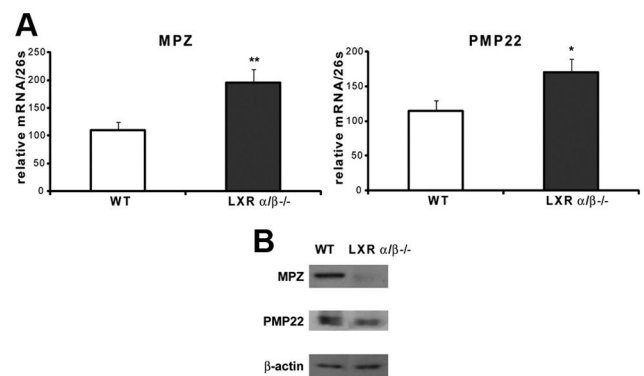


Figure 5. Expression of myelin genes in adult LXR α / β ^{-/-} mice. Eight-week-old male LXR α / β ^{-/-} mice were killed, and then their sciatic nerves were dissected (n = 6 per group). **A**, Total RNA was extracted and quantitative real-time PCR experiments were performed using primers recognizing MPZ or PMP22. The RT-PCR was normalized using 26S RNA, and they represent the mean \pm SEM of at least six independent experiments. * p < 0.05 and ** p < 0.01 by Student's *t* tests. **B**, Proteins were extracted, and Western blots were performed using anti-MPZ, anti-PMP22, or antibodies to verify their expression in LXR α / β ^{-/-} mice. β -Actin was used to normalize the Western blots. These results were reproduced in three independent experiments, and figures represent a typical experiment.

GC was performed in the splitless mode with a BPX5 capillary column (SGE Analytical Science). The temperature in the oven was initially 50°C for 1 min and then ramped to 340°C at 20°C/min.

The mass spectrometer was operated in the electronic impact mode. Identification of each oxysterol was supported by its retention

time and two diagnostic ions in the single ion monitoring mode. Quantification was performed according to the major diagnostic ion.

Methylene blue/azur II staining and transmission electron microscopy. Eight-week-old mice were deeply anesthetized by intraperitoneal injection of 40 mg/kg ketamine and 30 mg/kg xylazine and then intracardially perfused with 4% paraformaldehyde, 2.5% glutaraldehyde, and 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4. Tissues were dissected and immersed in the same fixative solution at 4°C overnight, washed in phosphate buffer, postfixed in 2% osmium tetroxide, dehydrated in graded ethanol series, and embedded in epoxy resin. Semithin sections were cut with a glass knife at (0.5–1 μ m) and stained with methylene blue/azur II. For electron microscopy, ultrathin sections (50–90 nm) were cut on an ultramicrotome (8800 Ultratome III; LKB Bromma) and collected on 300-mesh nickel grids. Staining was performed on drops of 4% aqueous uranyl acetate, followed by Reynolds's lead citrate (Reynolds, 1963). Ultrastructural analyses were performed in a JEOL jem-1011 electron microscope and digitalized with DigitalMicrograph software. Image acquisition was performed at the Cochin Imaging Facility. Electron microscopy images were used for calculating the g-ratio and axon perimeter using NIH ImageJ software. At least 100 randomly selected axons were analyzed per animal. At least three animals were used per genotype. Healthy axons were defined on the basis of the presence of intact membranes and the normal complement of organelles.

Statistical analysis. Unless otherwise specified, means of treatment groups were compared with one-way ANOVA. When the ANOVA showed that there were significant differences between the groups, Tukey's test was used to identify the sources of these differences. $p \leq 0.05$ was considered statistically significant. Two groups comparisons were performed by Student's *t* test.

Results

Oxysterols are synthesized by Schwann cells (MSC80) and sciatic nerves

We first showed by GC/MS that MSC80 mouse Schwann cells contain oxysterols. 24(S)-OH, 25-OH, and 27-OH were detected in cell lysates and their culture media after a 48 h incubation (Fig. 1A). Cell free media did not contain 24(S)-OH and 25-OH but contained a small amount of 27-OH, possibly resulting from auto-oxidation of cholesterol. Oxysterols are also present in mouse sciatic nerves (Fig. 1B) at relatively high amounts (175 ng of oxysterol per gram of tissue, which is $\sim 0.5 \mu$ M). Furthermore, we showed that the transcripts of their biosynthetic enzymes, CYP46A1 for 24(S)-OH, CH25H for 25-OH, and CYP27A1 for 27-OH, are expressed in MSC80 cells and in sciatic nerves of 8-week-old mice (Fig. 1C). These results demonstrate the ability of Schwann cells to synthesize oxysterols.

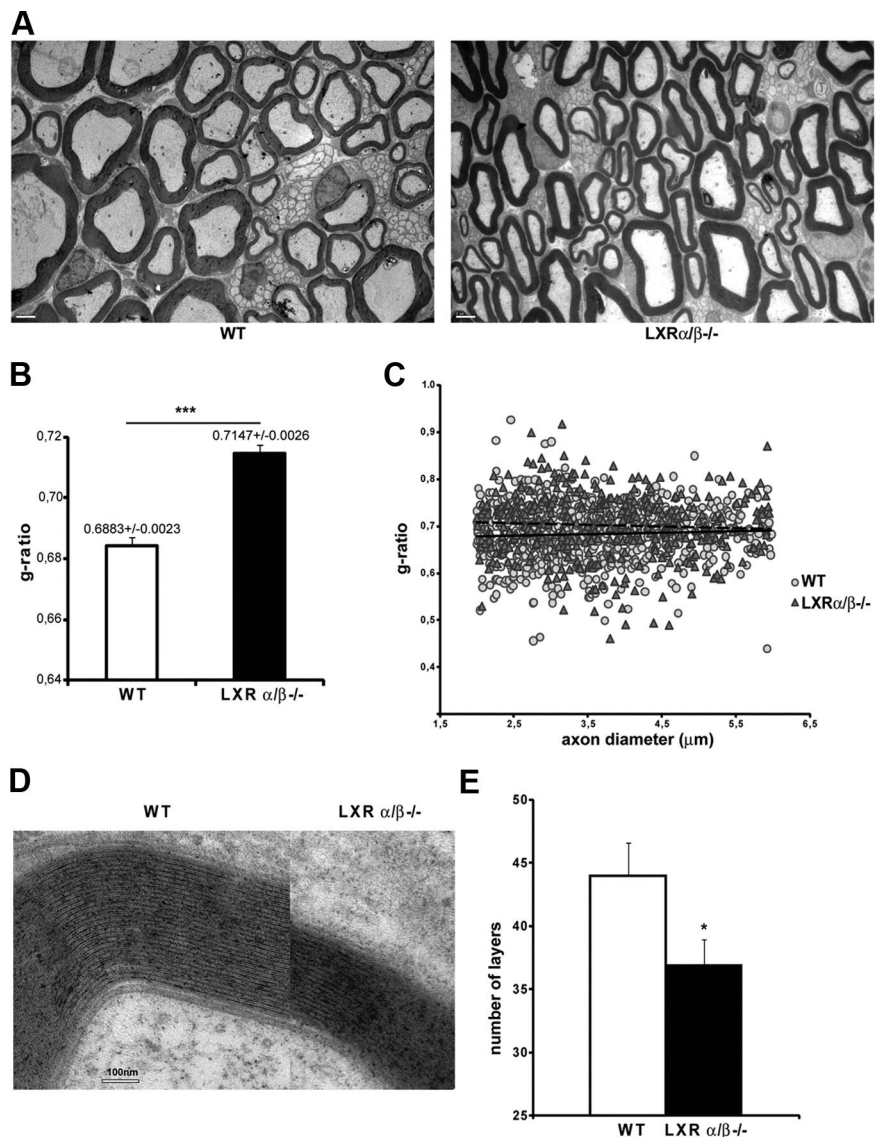


Figure 6. Incidence of LXR KO on myelin structure *in vivo*. **A**, Ultrathin (50–90 nm) cross-sections were prepared from Epon-embedded adult sciatic nerves and stained for myelin. Heterogeneity and reduced thickness of myelin sheaths is apparent in $LXR\alpha/\beta^{-/-}$ mice when compared with WT. Scale bar, 2 μ m. **B**, Myelin thickness was estimated by g-ratio determination using electronic microscopy pictures obtained from adult sciatic nerves. Myelin thickness is altered in $LXR\alpha/\beta^{-/-}$ mice. Three animals per genotype were used. Data are given as means \pm SEM. **C**, g-ratios were plotted against axonal diameters. The reduction in myelin thickness in $LXR\alpha/\beta^{-/-}$ mice when compared with WT was observed for nearly all types of axon calibers. Dotted line, Linear regression curve for WT animals; solid line, linear regression curve for $LXR\alpha/\beta^{-/-}$ mice. **D**, High-magnification electron micrographs of myelin layers from $LXR\alpha/\beta^{-/-}$ compared with WT animals. Scale bar, 100 nm. The two axons shown are of approximately equal diameters. **E**, Quantification of the number of layers around the axons of either WT or $LXR\alpha/\beta^{-/-}$ mice. * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$ by Student's *t* test when compared with control (WT).

Peripheral myelin genes are repressed by oxysterols in MSC80 cells

To analyze the effects of oxysterols on the expression of myelin genes, we incubated MSC80 cells with a high physiological concentration (10 μ M) of either 25-OH or the non-steroidal synthetic LXR ligand TO901317 for 24 h. This ligand (*N*-(2,2,2-trifluoro-ethyl)-*N*-[4-(2,2,2-trifluoro-1-hydroxy-1-trifluoromethyl-ethyl)-phenyl]benzenesulfonamide), was developed through structure–activity relationship studies. It shows similar efficacy to natural ligand (Schultz et al., 2000).

We showed by real-time PCR that 25-OH and TO901317 inhibited MPZ transcripts by 60 and 65%, respectively (Fig. 2A). PMP22 expression was inhibited by 40% by both drugs

(Fig. 2A). As a control, we tested the effect of 25-OH and TO901317 on a well-known LXR target gene, the cholesterol transporter ABCA1 (Cermenati et al., 2010). As expected, both 25-OH and TO901317 increased ABCA1 transcripts in MSC80 cells (Fig. 2A).

The inhibition of myelin mRNA was reflected at the protein level. We observed by Western blots a decrease in MPZ and PMP22 protein after incubating Schwann cells with 25-OH (64 and 69% inhibition for MPZ and PMP22, respectively) or TO901317 (67 and 59% decrease for MPZ and PMP22, respectively) (Fig. 2B). To assess whether 25-OH and TO901317 exert their effects at the level of the MPZ and PMP22 promoters, we performed transient transfection assays. MSC80 cells were transfected with either MPZ–Luc or PMP22–Luc constructs and then incubated with 10 μ M 25-OH or TO901317. As shown in Figure 2C, 25-OH reduced by 40% MPZ and PMP22 promoter activities, whereas their inhibition by TO901317 was less potent (an \sim 30% decrease). 25-OH also significantly inhibited myelin gene expression at a lower concentration (1 μ M; data not shown).

The repressing effects of oxysterols are mediated by LXR α or LXR β depending on the promoter context

To identify molecular effectors of the inhibitory effects of oxysterols on peripheral myelin genes, we studied their nuclear LXR receptors. First, we showed by PCR that the transcripts of both receptors are expressed in both MSC80 cells and in sciatic nerve (Fig. 3A). Then, we conducted chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays to assess the recruitment of LXRs at the level of myelin gene promoters. We found *in silico* a potential binding site for LXRs localized at $-8508/-8533$ bp at the level of the MPZ promoter (Fig. 3B) and a probable LXRE/PXRE located at position $-159/-170$ of the PMP22 promoter (Fig. 3C). For MPZ, ChIP experiments revealed that LXR recruitment is enhanced fourfold after 8 h of treatment of MSC80 cells with 25-OH. In the case of the PMP22 promoter, the binding of LXR was increased eightfold after a 8 h treatment with 25-OH (Fig. 3C). Similar results were obtained with the synthetic LXR ligand TO901317 (data not shown). Interestingly, at 24 h, the recruitment of LXR at the level of myelin gene promoters had returned to control levels (Fig. 3B,C).

To analyze the relative implication of either LXR α or LXR β in myelin gene repression, we knocked down their expression by siRNA in MSC80 cells and analyzed the impact on MPZ and PMP22 promoter activities. The efficacy of each siRNA was verified by real-time PCR. Each siRNA significantly inhibited the targeted LXR (Fig. 4A). Nevertheless, we observed a compensation in the expression between both LXRs: the knockdown of LXR α increased by 90% the expression of LXR β , whereas the knockdown of LXR β increased by 40% the expression of LXR α .

As expected, 25-OH inhibited MPZ promoter activity. The knockdown of LXR α did not interfere with the inhibitory effect of 25-OH. A 60% inhibition of MPZ promoter activity by 25-OH was still obtained despite the overexpression of LXR β attributable to LXR α knockdown. Interestingly, the knockdown of LXR β abrogated the inhibition of MPZ expression by 25-OH (Fig. 4B), although LXR α was overexpressed. This result highlights the important role of LXR β in mediating the inhibitory actions of MPZ.

Knockdown of either LXR α or LXR β significantly enhanced the basal activity of the PMP22 promoter (Fig. 4C), most likely by interfering with the inhibition of endogenous oxysterols (Figs. 1A, 2A). Furthermore, both LXR α and LXR β silencing reversed the inhibitory effect of 25-OH. These results show that both

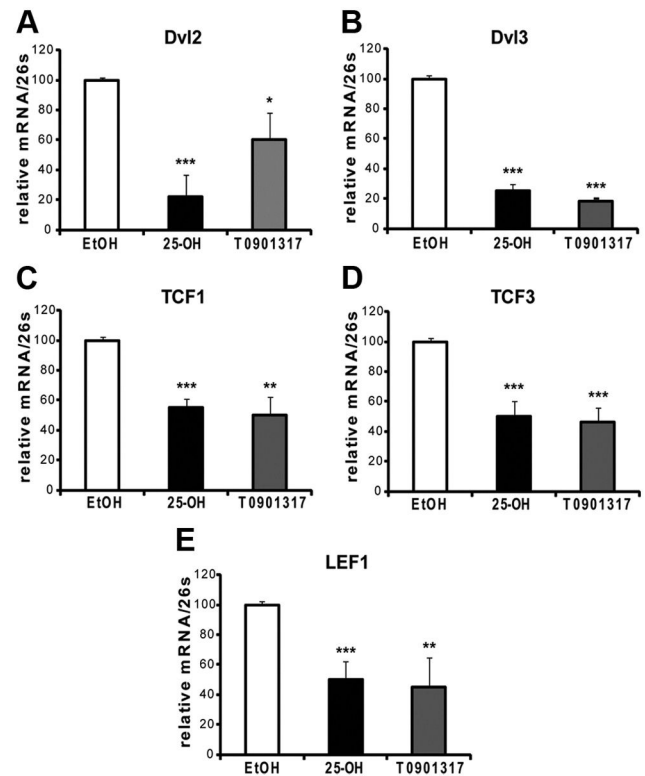


Figure 7. Effects of 25-OH and TO901317 on the expression of components of the Wnt signaling pathway. MSC80 cells were treated with ethanol (vehicle), 25-OH, or TO901317 at 10 μ M during 24 h. Total RNA was extracted, and quantitative real-time PCR experiments were performed using primers recognizing DVL2 (A), DVL3 (B), TCF1 (C), TCF3 (D), or LEF1 (E). The qRT-PCR was normalized using 26S RNA, and they represent the means \pm SEM of at least four independent experiments. * p < 0.05, ** p < 0.01, and *** p < 0.001 by Tukey's *post hoc* tests after one-way ANOVA when compared with control.

LXR α and LXR β mediate the inhibition of PMP22 promoter activity by 25-OH.

LXR α or LXR β knockout affects myelin structure *in vivo*

Because LXR α and LXR β are both expressed in sciatic nerves and affect myelin gene expression in MSC80 cells, we intended to analyze the consequences of their knock-out for the structure of myelin sheaths. First, we analyzed the expression of MPZ and PMP22 transcripts by real-time RT-PCR in sciatic nerves from adult LXR $\alpha/\beta^{-/-}$ mice (8-week-old males). The knock-out of both LXR α and LXR β enhanced by twofold MPZ transcript and by 70% PMP22 mRNA expression (Fig. 5A). Unexpectedly, both MPZ and PMP22 protein expressions were decreased in LXR $\alpha/\beta^{-/-}$ mice (Fig. 5B). We observed a 73% decrease for MPZ and 34% inhibition of PMP22 protein expression in LXR $\alpha/\beta^{-/-}$ mice. This finding prompted us to study the effect of the LXRs inactivation at the level of myelin structure by analyzing the diameters of sciatic nerve axons and the thickness myelin sheaths in WT and LXR $\alpha/\beta^{-/-}$ mice by electron microscopy and digital imaging of ultrathin (50–90 nm) cross-sections (Fig. 6A). In LXR double knock-out mice, the thickness of myelin sheaths was reduced, and they appeared heterogeneous when compared with controls. The g-ratios (axon diameter/diameter of nerve fibers) were calculated from no fewer than 100 myelinated axons per mouse and genotype ($n = 3$) using electron micrograph images. In WT mice, the average g-ratio was 0.6883 ± 0.0023 . In contrast, the myelin of LXR $\alpha/\beta^{-/-}$ was significantly thinner than that of controls (g-ratio = 0.7147 ± 0.0026),

with some fibers having g-ratios < 0.74 , a level never observed in WT mice (Fig. 6B).

We also calculated the g-ratios of sciatic nerve fibers from LXR double KO and wild-type animals, plotted as a function of their respective axonal diameters (Fig. 6C). We concentrated our analysis on the most abundant category of axons (i.e., between 2 and 6 μm). Although the most striking differences are observed for axons with small diameter, our results also revealed a reduction in myelin thickness for nearly all axon calibers. We also calculated the number of myelin sheaths layers for the same category of axons. As depicted in Figure 6D, the myelin sheath is thicker in wild-type animals versus $LXR\alpha/\beta^{-/-}$ mice. Indeed, number of myelin layers around the axons is significantly lower in $LXR\alpha/\beta^{-/-}$ mice (43.98 ± 2.59) versus control animals (36.94 ± 2.04). These data show that the absence of LXR expression alters peripheral myelin structure *in vivo*.

LXR ligands inhibit canonical Wnt signaling

Our next goal was to further study the molecular mechanisms underlying the inhibition of myelin genes by LXR. We have shown recently that the Wnt/ β -catenin signaling pathway is a major driver of myelin gene expression (Tawk et al., 2011). Here, we examined whether oxysterols can decrease myelin gene expression by inhibiting Wnt signaling. By real-time PCR, we showed that transcripts of the major components of the canonical Wnt pathway are inhibited by LXR ligands in MSC80 cells. 25-OH and TO901317 inhibited DVL2 by 75 and 35%, respectively (Fig. 7A). DVL3 was inhibited by 75% (25-OH) and by 80% (TO901317) (Fig. 7B). The transcription factors TCF1, TCF3, and LEF1 were downregulated by 40% (TCF1) and 50% (TCF3 and LEF1) (Fig. 7C–E).

β -Catenin, the central protein of the canonical Wnt pathway, was also affected by LXR ligands. As a matter of fact, treatment of MSC80 cells for 24 h with 25-OH or TO901317 ($10 \mu\text{M}$) was inhibited by 50% β -catenin transcript (Fig. 8A). β -Catenin protein expression was also decreased by 88% by 25-OH and 78% by TO901317 in MSC80 cells (Fig. 8B). This observation was confirmed in the sciatic nerves of adult $LXR\alpha/\beta^{-/-}$ mice, in which β -catenin protein expression was increased by 3.24-fold and mRNA expression by 50% (Fig. 8C). Because β -catenin expression was severely affected by the treatment of MSC80 cells with 25OH and TO901317, we wondered whether MPZ and PMP22

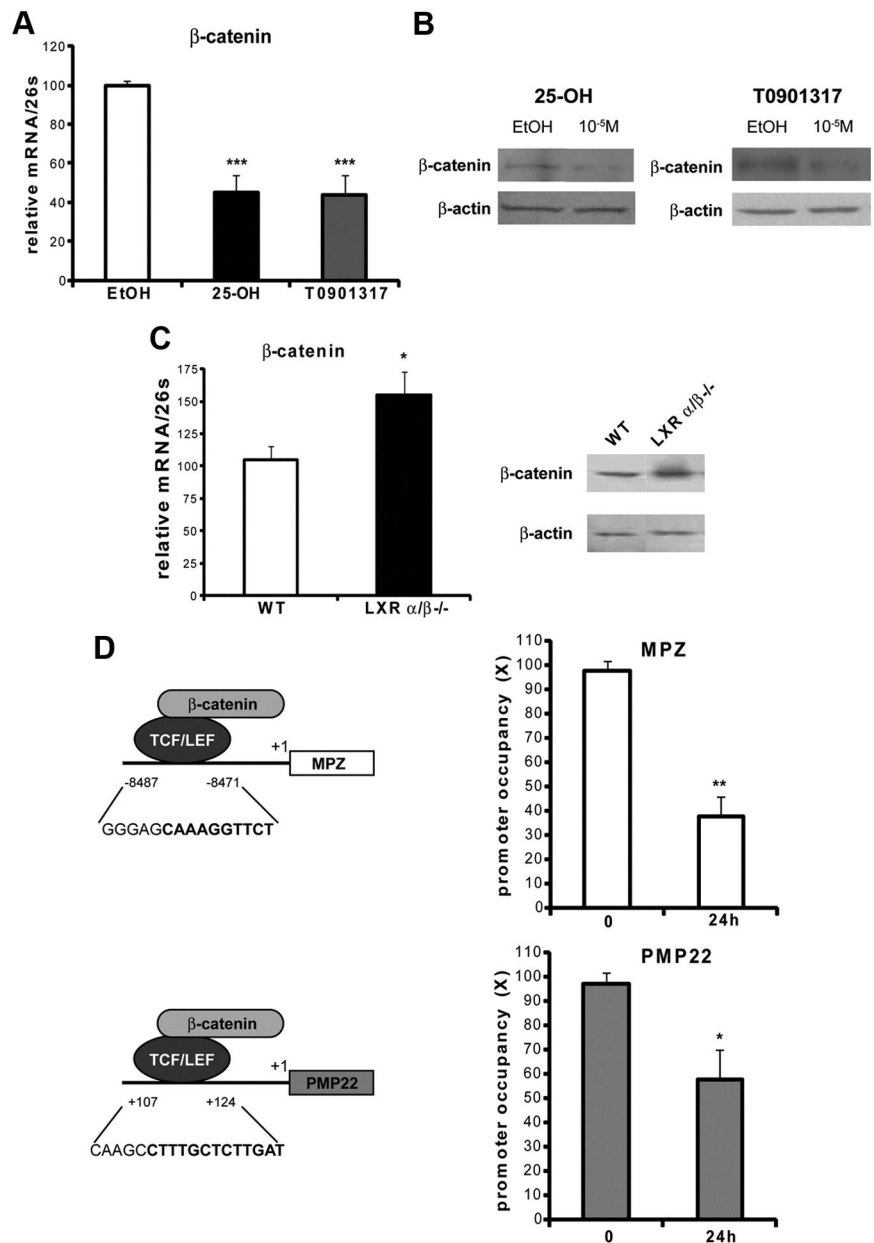


Figure 8. Effect of oxysterols on the recruitment of β -catenin at the levels of MPZ and PMP22 promoters. **A**, MSC80 cells were treated with ethanol (vehicle), 25-OH, or TO901317 at $10 \mu\text{M}$ during 24 h. Total RNA was extracted, and quantitative real-time PCR experiments were performed using primers recognizing β -catenin. The qRT-PCR was normalized using 26S RNA, and they represent the means \pm SEM of at least four independent experiments. *** $p < 0.001$ by Tukey's *post hoc* test after one-way ANOVA when compared with control. **B**, MSC80 cells were treated with ethanol (vehicle), 25-OH, or TO901317 at $10 \mu\text{M}$ during 24 h. Western blots were performed using anti- β -catenin antibodies to verify its expression in MSC80 cells. β -Actin was used to normalize the Western blots. **C**, Sciatic nerves were isolated from either 8-week-old male wild-type mice (WT) or $LXR\alpha/\beta^{-/-}$ animals. Western blots were performed using anti- β -catenin antibodies to verify its expression in sciatic nerves. β -Actin was used to normalize the Western blots. These results were reproduced in three independent experiments, and figures represent a typical experiment. Sciatic nerves were isolated from either 8-week-old male WT mice or $LXR\alpha/\beta^{-/-}$ animals. Total RNA was extracted, and quantitative real-time PCR experiments were performed using primers recognizing β -catenin. The real-time RT-PCR was normalized using 26S RNA, and they represent the mean \pm SEM of at least four independent experiments. **D**, TCF/LEF binding sites located in MPZ or PMP22 promoters have been identified previously (Tawk et al., 2011). To examine their occupancy, MSC80 cells were treated or not with 25-OH ($10 \mu\text{M}$) during 24 h and were then subjected to ChIP analysis using anti- β -catenin antibody or C23 antibody as a non-relevant antibody. Quantitative real-time PCR was performed to detect MPZ and PMP22 promoter regions, including TCF/LEF binding elements. Results are the mean of at least four independent experiments. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ by Tukey's *post hoc* test after one-way ANOVA when compared with control.

promoter occupancy by β -catenin might be hindered. ChIP analysis showed that β -catenin recruitment, at the level of the TCF/LEF present on MPZ and PMP22 promoters, was reduced by 6% and 40%, respectively, after 24 h of incubation with 25-OH

(Fig. 8D). No significant reduction of β -catenin promoter occupancy was detected between 1 and 8 h of treatment (data not shown). These results show that 25-OH exerts an inhibitory effect on Wnt signaling and impedes β -catenin binding on myelin gene promoters.

Discussion

Here, we demonstrate that the oxysterols 24(S)-OH, 25-OH, and 27-OH, their biosynthetic enzymes (CYP46A1, CH25OH, and CYP27A1), as well as their cognate receptors (LXR α and LXR β) are present in myelinating Schwann cells and in peripheral nerves, in which they may regulate vital functions by autocrine/paracrine mechanisms. Our results indeed show that 25-OH and the selective LXR agonist TO901317 are able to downregulate the expression of peripheral myelin genes in Schwann cells: they inhibit MPZ and PMP22 promoter activities, transcripts, and proteins. Their inhibitory effects are mediated by liganded LXR, as demonstrated by ChIP experiments, revealing an increased recruitment of LXR at the levels of MPZ and PMP22 promoters. LXR β , but not LXR α , is implicated in the inhibition of MPZ promoter activity by oxysterols, whereas both LXR α and LXR β mediate PMP22 promoter inhibition.

We also show that LXR α and LXR β are crucial for the correct myelination of peripheral nerve axons. The knock-out of both LXR α and LXR β led to a significant increase in the expression of MPZ and PMP22 transcripts, but to the opposite, to a decrease in myelin proteins and to thinner myelin sheaths. Thus, electron microscopy of sciatic nerves of LXR α/β ^{-/-} mice revealed an alteration of the phenotype of myelin sheaths surrounding axons, without affecting the diameters or the number of axons. This observation could be explained by a dysregulation of myelin protein gene expression in the absence of LXRs, because PMP22 and MPZ are dosage-sensitive genes and their coordinated expression is necessary for efficient myelination. Increase in PMP22 and MPZ transcripts in LXR α/β ^{-/-} mice may thus result in a less efficient myelination of axons. This observation is not surprising because several studies described a congenital hypomyelination of peripheral nerves attributable to MPZ overexpression and its consequent mistargeting to mesaxon membranes (Wrabetz et al., 2000; Yin et al., 2000). LXRs are known to play a key role in the homeostasis of cholesterol, a major lipid constituent of the myelin sheaths and required for myelin membrane (Saher et al., 2005). Elevated cholesterol levels are essential for efficient exiting of MPZ from the endoplasmic reticulum of Schwann cells into the growing myelin sheath (Saher et al., 2009). We have shown that cholesterol transporter ABCA1 is activated by 25-OH and TO901317 in Schwann cells and sciatic nerve. As ABCA1 enhances cholesterol efflux from Schwann cells, the intracellular cholesterol levels are decreased and, as a consequence, MPZ trafficking slowed. We assume that repression of the basal activity of myelin genes by LXR ligands probably avoids an accumulation of MPZ in the ER. Accordingly, LXR pathway must be considered as a central actor in myelination (1) by regulating the cholesterol levels in nerve and (2) by repressing the basal activity of myelin genes.

So far, the regulation of cholesterol metabolism by oxysterols has only been investigated within the context of neurodegenerative diseases, in particular of Alzheimer's disease (Lütjohann et al., 2000; Papassotiropoulos et al., 2002) and multiple sclerosis (Leoni et al., 2002; Teunissen et al., 2003). Also, it has been shown recently that LXR activation by a synthetic ligand results in increased levels of neurosteroids and protection of the sciatic nerve from neuropathy induced by diabetes (Cermenati et al., 2010).

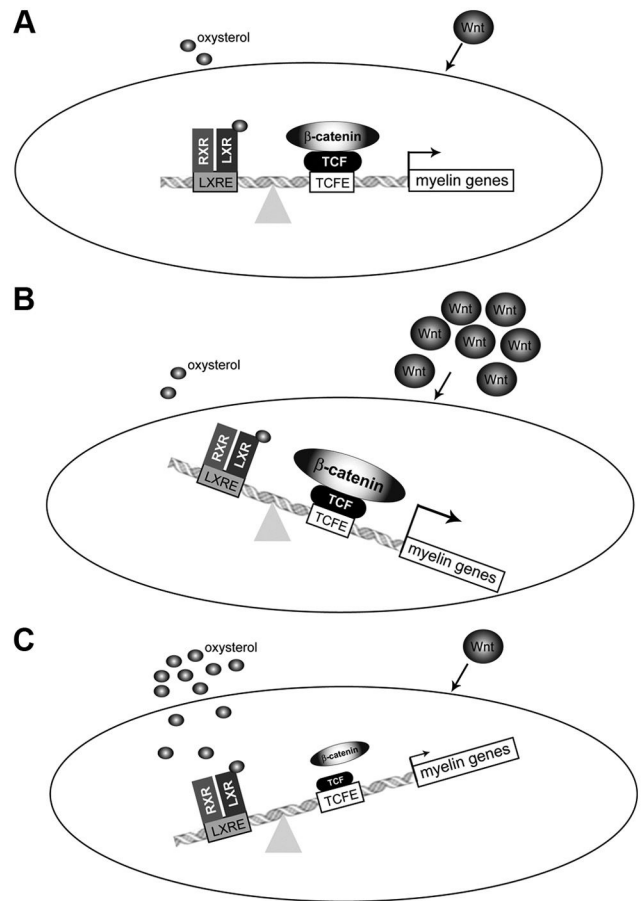


Figure 9. Schematic model of crosstalk between oxysterol and Wnt pathways on the expression of myelin genes MPZ and PMP22. **A**, At basal levels, the interplay between LXR and Wnt pathways induces the fine-tuning of myelin gene expression. Wnt ligands activate myelin genes by means of the canonical Wnt pathway. We have identified active TCF/LEF response elements (TCFE) on the level of MPZ and PMP22 promoters. These TCFEs bind TCF/LEF transcription factors that interact with β -catenin. Oxysterols are present in Schwann cells. They repress myelin gene expression by means of LXRs that bind to LXREs located near the TCFEs. Furthermore, oxysterols can decrease the amount of Wnt components in Schwann cells. Therefore, the amount of β -catenin recruited on the level of MPZ and PMP22 promoters is the result of a balance between Wnt and oxysterol pathways. **B**, When Wnt ligands are at high amounts, Wnt/ β -catenin pathway becomes predominant provoking the increase of β -catenin recruitment on myelin gene promoters. This will allow the expression myelin genes at high levels. **C**, When oxysterols reach high concentrations, they repress myelin gene expression by means of LXRs and decrease the amounts of Wnt/ β -catenin components in Schwann cells. In this case, the oxysterol/LXR pathway becomes predominant.

Our observations demonstrate for the first time a key role of LXR and its natural oxysterol or synthetic ligands in the myelination process. Accordingly, LXR pathways must be considered as central actors in myelination by regulating cholesterol turnover in peripheral nerves and by fine-tuning myelin gene transcription.

The study of signaling mechanisms involved in the repression of myelin genes has so far been neglected. Our result indicates that locally synthesized oxysterols can dampen the basal activity of myelin genes *in vitro* and *in vivo*. This is supported by several lines of evidence: (1) in LXR α/β knock-out animals, the expression levels of myelin genes are altered when compared with wild-type animals; and (2) the knock-down of LXRs by siRNA in Schwann cells enhanced the basal expression of myelin genes. Therefore, we assume that oxysterols present in Schwann cells and nerve fibers may contribute to the delicate regulation of myelin gene expression.

The inhibition of peripheral myelin genes by oxysterols does not implicate the classical mechanism of action of oxysterols. Usually, liganded LXR activate transcription of metabolic genes (e.g., ABC cassettes) after coactivator binding. Only in a few cases have liganded LXRs been shown to repress genes involved in inflammation [e.g., C reactive protein (Blaschke et al., 2006) or coding for metalloprotease 9 (Castrillo et al., 2003)] via a direct interaction with corepressors or other nuclear transcription factors (Castrillo et al., 2003).

A possible mechanism by which LXR ligands repress myelin genes involves the inhibition of the canonical Wnt signaling pathway. We indeed recently demonstrated that the Wnt/ β -catenin pathway is crucial for the expression of peripheral myelin genes (Tawk et al., 2011). We here show that the transcripts of the major components of the canonical Wnt pathway are inhibited by oxysterols (i.e., DVL, TCF/LEF). Moreover, β -catenin transcript and protein were also decreased by oxysterols in MSC80 cells, consistent with their enhanced expression in the sciatic nerves of *LXR α / β ^{-/-}* animals. ChIP analysis showed that β -catenin recruitment at the level of the MPZ and PMP22 promoters was reduced after a 24 h treatment with 25-OH or TO901317. The reduction of β -catenin could be explained by its potential recruitment by LXR: a direct interaction between LXRs and β -catenin, through Armadillo repeats, has been described (Uno et al., 2009). This is not surprising, because β -catenin could be a coregulator for several nuclear receptors (Fonte et al., 2005). TCF/LEF binding sites are close to LXR response elements in MPZ and PMP22 promoters.

Our observation that myelin genes are repressed by oxysterols has several effects. From a physiological and fundamental point of view, our results highlight the complexity of regulation of myelin genes. Two pathways account for the repression by LXR: binding of LXR to myelin gene promoters and inhibition of Wnt signaling pathway (Fig. 9). Schwann cells are able to produce Wnt ligands (Tawk et al., 2011) and oxysterols. Wnt ligands, by means of TCF/LEF and β -catenin, activate myelin genes, whereas oxysterols, via LXR, repress them (Fig. 9). Interestingly, in both MPZ and PMP22 promoters, TCF/LEF binding sites are close to LXR response elements. This localization could also account for the crosstalk between these pathways. The result of this complex interplay is the fine-tuning of myelin genes expression. It is noteworthy that a slight modification of peripheral myelin gene dosage provokes Charcot-Marie-Tooth type 1 pathology. Therefore, myelin gene regulation must be strictly controlled to avoid any over expression, leading to an alteration of myelin structure or demyelination. Our observations thus open new perspectives for the development of therapies targeting LXR and Wnt signaling mechanisms for the treatment of peripheral neuropathies.

References

- Andersson S, Gustafsson N, Warner M, Gustafsson JA (2005) Inactivation of liver X receptor beta leads to adult-onset motor neuron degeneration in male mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:3857–3862.
- Blaschke F, Takata Y, Caglayan E, Collins A, Tontonoz P, Hsueh WA, Tangirala RK (2006) A nuclear receptor corepressor-dependent pathway mediates suppression of cytokine-induced C-reactive protein gene expression by liver X receptor. *Circ Res* 99:e88–e99.
- Bochelen D, Mersel M, Behr P, Lutz P, Kupferberg A (1995) Effect of oxysterol treatment on cholesterol biosynthesis and reactive astrocyte proliferation in injured rat brain cortex. *J Neurochem* 65:2194–2200.
- Castrillo A, Joseph SB, Marathe C, Mangelsdorf DJ, Tontonoz P (2003) Liver X receptor-dependent repression of matrix metalloproteinase-9 expression in macrophages. *J Biol Chem* 278:10443–10449.
- Cermenati G, Giatti S, Cavaletti G, Bianchi R, Maschi O, Pesaresi M, Abbiati F, Volonterio A, Saez E, Caruso D, Melcangi RC, Mitro N (2010) Activation of the liver X receptor increases neuroactive steroid levels and protects from diabetes-induced peripheral neuropathy. *J Neurosci* 30:11896–11901.
- Chen JD, Evans RM (1995) A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature* 377:454–457.
- Cummins CL, Mangelsdorf DJ (2006) Liver X receptors and cholesterol homeostasis: spotlight on the adrenal gland. *Biochem Soc Trans* 34:1110–1113.
- Désarnaud F, Bidichandani S, Patel PI, Baulieu EE, Schumacher M (2000) Glucocorticosteroids stimulate the activity of the promoters of peripheral myelin protein-22 and protein zero genes in Schwann cells. *Brain Res* 865:12–16.
- Fonte C, Grenier J, Trousson A, Chauchereau A, Lahuna O, Baulieu EE, Schumacher M, Massaad C (2005) Involvement of β -catenin and unusual behavior of CBP and p300 in glucocorticosteroid signaling in Schwann cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:14260–14265.
- Garbay B, Heape AM, Sargueil F, Cassagne C (2000) Myelin synthesis in the peripheral nervous system. *Prog Neurobiol* 61:267–304.
- Hörlein AJ, Näär AM, Heinzel T, Torchia J, Gloss B, Kurokawa R, Ryan A, Kamei Y, Söderström M, Glass CK, Rosenfeld MG (1995) Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature* 377:397–404.
- Huuskonen J, Fielding PE, Fielding CJ (2004) Role of p160 coactivator complex in the activation of liver X receptor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:703–708.
- Janowski BA, Willy PJ, Devi TR, Falck JR, Mangelsdorf DJ (1996) An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha. *Nature* 383:728–731.
- Leoni V, Masterman T, Diczfalussy U, De Luca G, Hillert J, Björkhem I (2002) Changes in human plasma levels of the brain specific oxysterol 24S-hydroxycholesterol during progression of multiple sclerosis. *Neurosci Lett* 331:163–166.
- Liere P, Akwa Y, Weill-Engerer S, Eychenne B, Pianos A, Robel P, Sjövall J, Schumacher M, Baulieu EE (2000) Validation of an analytical procedure to measure trace amounts of neurosteroids in brain tissue by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 739:301–312.
- Liere P, Pianos A, Eychenne B, Cambourg A, Liu S, Griffiths W, Schumacher M, Sjövall J, Baulieu EE (2004) Novel lipoidal derivatives of pregnenolone and dehydroepiandrosterone and absence of their sulfated counterparts in rodent brain. *J Lipid Res* 45:2287–2302.
- Lütjohann D, Papassotiropoulos A, Björkhem I, Locatelli S, Bagli M, Oehring RD, Schlegel U, Jessen F, Rao ML, von Bergmann K, Heun R (2000) Plasma 24S-hydroxycholesterol (cerebrosterol) is increased in Alzheimer and vascular demented patients. *J Lipid Res* 41:195–198.
- Massaad C, Garlatti M, Wilson EM, Cadepond F, Barouki R (2000) A natural sequence consisting of overlapping glucocorticoid-responsive elements mediates glucocorticoid, but not androgen, regulation of gene expression. *Biochem J* 350:123–129.
- Niemann A, Berger P, Suter U (2006) Pathomechanisms of mutant proteins in Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuromolecular Med* 8:217–242.
- Papassotiropoulos A, Lütjohann D, Bagli M, Locatelli S, Jessen F, Buschfort R, Ptok U, Björkhem I, von Bergmann K, Heun R (2002) 24S-hydroxycholesterol in cerebrospinal fluid is elevated in early stages of dementia. *J Psychiatr Res* 36:27–32.
- Reynolds ES (1963) The use of lead citrate at a high pH as electron opaque stain in the electron microscope. *J Cell Biol* 17:208–212.
- Roa BB, Warner LE, Garcia CA, Russo D, Lovelace R, Chance PF, Lupski JR (1996) Myelin protein zero (MPZ) gene mutations in nonduplication type 1 Charcot-Marie-Tooth disease. *Hum Mutat* 7:36–45.
- Russell DW (2000) Oxysterol biosynthetic enzymes. *Biochim Biophys Acta* 1529:126–135.
- Saher G, Brügger B, Lappe-Siefke C, Möbius W, Tozawa R, Wehr MC, Wieland F, Ishibashi S, Nave KA (2005) High cholesterol level is essential for myelin membrane growth. *Nat Neurosci* 8:468–475.
- Saher G, Quintes S, Möbius W, Wehr MC, Krämer-Albers EM, Brügger B, Nave KA (2009) Cholesterol regulates the endoplasmic reticulum exit of the major membrane protein P0 required for peripheral myelin compaction. *J Neurosci* 29:6094–6104.
- Schultz JR, Tu H, Luk A, Repa JJ, Medina JC, Li L, Schwendner S, Wang S,

- Thoolen M, Mangelsdorf DJ, Lustig KD, Shan B (2000) Role of LXRs in control of lipogenesis. *Genes Dev* 14:2831–2838.
- Tawk M, Makoukji J, Belle M, Fonte C, Trousson A, Hawkins T, Li H, Ghandour M, Schumacher M, Massaad C (2011) Wnt/ β -catenin signaling is an essential and direct driver of myelin gene expression and myelinogenesis. *J Neurosci* 31:3729–3742.
- Teunissen CE, Dijkstra CD, Polman CH, Hoogervorst EL, von Bergmann K, Lütjohann D (2003) Decreased levels of the brain specific 24S-hydroxycholesterol and cholesterol precursors in serum of multiple sclerosis patients. *Neurosci Lett* 347:159–162.
- Trousson A, Bernard S, Petit PX, Liere P, Pianos A, El Hadri K, Lobaccaro JM, Said Ghandour MS, Raymondjean M, Schumacher M, Massaad C (2009) 25-hydroxycholesterol provokes oligodendrocyte cell line apoptosis and stimulates the secreted phospholipase A2 type IIA via LXR beta and PXR. *J Neurochem* 109:945–958.
- Uno S, Endo K, Jeong Y, Kawana K, Miyachi H, Hashimoto Y, Makishima M (2009) Suppression of beta-catenin signaling by liver X receptor ligands. *Biochem Pharmacol* 77:186–195.
- Wang H, Zhang Y, Yehuda-Shnaidman E, Medvedev AV, Kumar N, Daniel KW, Robidoux J, Czech MP, Mangelsdorf DJ, Collins S (2008) Liver X receptor alpha is a transcriptional repressor of the uncoupling protein 1 gene and the brown fat phenotype. *Mol Cell Biol* 28:2187–2200.
- Wrabetz L, Feltri ML, Quattrini A, Imperiale D, Previtali S, D'Antonio M, Martini R, Yin X, Trapp BD, Zhou L, Chiu SY, Messing A (2000) P(0) glycoprotein overexpression causes congenital hypomyelination of peripheral nerves. *J Cell Biol* 148:1021–1034.
- Yin X, Kidd GJ, Wrabetz L, Feltri ML, Messing A, Trapp BD (2000) Schwann cell myelination requires timely and precise targeting of P(0) protein. *J Cell Biol* 148:1009–1020.

Liver X Receptors promote myelination and remyelination in the cerebellum.

**Delphine Meffre¹, Ghjuvan'Ghjacumu Shackelford¹, Amalia Trousson^{1, 2}, Abdel M
Ghoumari³, Philippe Liere³, Michael Schumacher³, Frédéric Charbonnier¹, Julien Grenier¹
and Charbel Massaad¹**

Article en révision chez **Cell Reports**

Liver X Receptors promote myelination and remyelination in the cerebellum.

Delphine Meffre¹, Ghjuvan'Ghjacumu Shackelford¹, Amalia Trousson^{1, 2}, Abdel M Ghoumari³, Philippe Liere³, Michael Schumacher³, Frédéric Charbonnier¹, Julien Grenier¹ and Charbel Massaad¹

¹Paris Descartes University, UMR 8194 CNRS, 45 rue des Saints-Pères, 75270, Paris Cedex 6, France

²UMR6547, CNRS and Blaise Pascal University, and Centre de Recherche en Nutrition Humaine d'Auvergne, 24 avenue des Landais, 63177, Aubière, France

³UMR788, Inserm and Paris-Sud University, 80 rue du Général Leclerc, 94276 Le Kremlin-Bicêtre Cedex, France

Address correspondence to: Pr Charbel MASSAAD, CNRS UMR 8194, Université Paris Descartes, 45 rue des Saints-Pères, 75270, Paris Cedex 6, France. Phone/Fax: 33 1 42 86 22 22. E-mail: charbel.massaad@parisdescartes.fr

| **Running title:** LXR in oligodendrocytes

Summary

The identification of new pathways governing myelination provides innovative avenues for remyelination. Liver X receptors (LXRs) are nuclear receptors activated by oxysterols. Their role in myelination and remyelination processes is poorly understood. Here, we show that LXRs and their ligands are present in the cerebellum and oligodendrocytes to control myelination. Our *in vivo* and *in vitro* data demonstrate that LXR stimulates myelin genes expression (promoter, mRNA and protein). Moreover, we highlight that LXRs are crucial for normal myelination process as LXR-KO mice exhibit thinner myelin sheaths and reduced myelin genes expression. Interestingly, by using demyelinated organotypic cultures of cerebellum, we show that oxysterols enhance oligodendrocyte differentiation and promote remyelination, *via* LXR. Our data reveal LXRs as new positive modulators of myelination, and pharmacological targets for remyelination.

Keywords: LXR/myelination/myelin diseases/oligodendrocytes/oxysterols

Highlights:

- Oxysterols and LXR are present in the cerebellum and in oligodendrocytes
- LXR invalidation impairs normal myelin sheaths thickness and myelin gene expression
- Oxysterols stimulate myelin gene (PLP, MBP) expression *in vivo* and *in vitro*
- Oxysterols promote ex vivo remyelination in a LXR-dependant manner

INTRODUCTION

Myelin sheaths, synthesized by oligodendrocytes in central nervous system (CNS), form an insulating layer around axons, which enhances conduction velocity of electrical impulses. This structure is particularly rich in cholesterol and is stabilized by specific myelin proteins such as Proteolipid Protein (PLP) and Myelin Basic Protein (MBP). The maintenance of myelin requires continuous turnover of its components throughout life (Baumann and Pham-Dinh et al., 2001). Myelination is a fine-tuned process that involves complex crosstalk between several signaling pathways.

Demyelination in the CNS can occur as a result of oligodendrocyte cell death or injury and is usually accompanied or followed by axonal degeneration, functional impairments and clinical disability. One of the most frequent demyelinating pathologies is multiple sclerosis (MS). It is thought to be an autoimmune disorder that targets myelin. Currently available treatments for MS are modestly efficacious, and there is no cure (Wekerle et al., 2002).

Remyelination is critical for restoring electrical impulse conduction and protecting axons from degeneration (Kornek et al., 2003, Liebetanz and Merkler et al., 2006, Smith and Jeffery et al., 2006). Experimental animal models of CNS demyelination indicate that remyelination is mediated by new oligodendrocytes generated from oligodendrocyte progenitor cells (OPCs) (Loughlin et al., 1997). The eventual failure of remyelination may result from the generation of a non-permissive environment or intrinsic deficits in the remyelinating cells. Thus, therapeutic agents that act on myelin maintenance and remyelination are predicted to be important determinants of long-term functional outcome in demyelinating diseases.

Liver X Receptors (LXR) are members of the nuclear receptor superfamily (Janowski et al., 1996). There are two isoforms of LXR: LXR α and LXR β . They regulate gene expression by binding to responsive elements. In the absence of ligands, LXRs bind to corepressors (Chen and Evans et al., 1995, Horlein et al., 1995). In response to ligand binding, LXRs form

heterodimers with retinoid X receptor (RXR) and transactivate gene expression by interacting with coactivators (Huuskonen et al., 2004). The natural ligands of LXRs are oxysterols originating from the oxidation of cholesterol (e.g. 24(S)- hydroxycholesterol (24(S)-OH), 25-hydroxycholesterol (25-OH)...). The synthetic agonist TO901317 (TO9) also potently activates those receptors.

Studies with transgenic mice revealed important roles of LXRs within the nervous system (Andersson et al., 2005). LXR α / β -double knockout (LXR dKO) mice show several defects like axonal atrophy, neuronal loss, reduction in ventral midbrain neurogenesis (Sacchetti et al., 2009), astrogliosis, and lipid accumulation in specific brain regions (Wang et al., 2002, Andersson et al., 2005). We have recently shown that, in the peripheral nervous system, LXRs inhibit myelin gene expression by mechanisms involving Wnt/ β -catenin pathway (Makoukji et al., 2011).

The aim of this study is to understand the role of LXRs in myelination and remyelination of the CNS. We established that the expression level of the two major central myelin genes (*PLP* and *MBP*) is stimulated by LXR. LXR dKO mice exhibited thinner myelin sheaths and decreased myelin gene expression in the cerebellum. Finally, using organotypic cultures of cerebellum, we showed that LXR activation enhances remyelination after lysolecithin-induced demyelination. Our findings thus represent a conceptual advance in the transcriptional control of myelin gene expression, and give new insight on the role of LXR signaling in myelination and remyelination.

RESULTS AND DISCUSSION

Oxysterols and LXR pathway components are present in the cerebellum and in oligodendrocytes

Cholesterol can be metabolized into various oxysterols, namely 24(S)-OH, 25-OH, or 27-OH, by means of cholesterol hydroxylases: cytochrome 46A1, 25-hydroxylase, and 27-hydroxylase, respectively (Russell et al., 2000). First, we analyzed by gas chromatography/mass spectrometry the presence of 24(S)-OH, 25-OH and 27-OH in the cerebellum. We found that the cerebellum contains those oxysterols: 1841 ± 426 ng of 24(S)-OH per g of cerebellum (approximately $4.6 \cdot 10^{-8}$ M), 138 ± 8 ng/g for 25-OH (approximately $3.5 \cdot 10^{-9}$ M) and 580 ± 32 ng/g of 27-OH (approximately $1.5 \cdot 10^{-8}$ M) (Fig 1A). The invalidation of LXR did not alter the amounts of oxysterols in the cerebellum (Fig. 1A). We demonstrate that the transcripts of their biosynthetic enzymes are expressed in the cerebellum (Fig. 1B). Finally, the nuclear receptors LXR α and β were both expressed in the cerebellum, with a predominant expression of the β isoform (Fig. 1C). Accordingly to these data, we previously showed that oligodendrocytes contain 24(S)-OH, 25-OH, and 27-OH, express their biosynthetic enzymes and mainly LXR β (Trousson et al., 2009).

Effect of LXR invalidation on myelin gene expression and myelin structure in vivo

We studied the structure of myelin sheaths in the cerebellum of adult wild type (WT) and LXR dKO mice using electron microscopy. Electron micrographs revealed that myelination status is altered in the cerebellum of LXR dKO animals (Fig. 2A and 2B). We detected thinner myelin sheaths around the axons as reflected by the higher g-ratio (axonal perimeter/outer perimeter) in LXR dKO animals (0.8292 ± 0.0055) when compared to WT (0.8069 ± 0.0049) (Fig. 2C).

We analyzed in the cerebellum the effect of the invalidation of both LXRs on the expression of the two major central myelin proteins, PLP and MBP. As shown in Figure 2D, the cerebellum of LXR dKO mice showed a significant 80% decrease in the expression of ABCA1, a LXR target gene used as a positive control. Concomitantly, we observed decreased amounts of PLP and MBP transcripts (-50 %). Those results were confirmed at the protein level (Fig. 2E): quantification of the Western blots showed that PLP and MBP protein amounts were clearly reduced in LXR dKO mice when compared to WT animals (-21.7 % \pm 6.8 and -31,6 % \pm 7.9, respectively). Altogether, these results suggest that LXR signaling is an important actor of cerebellar myelin gene expression and myelination.

LXRs activation enhances myelin gene expression

We next tested the influence of LXRs activation on the expression of central myelin genes *in vivo*. For that purpose, we quantified by RT-qPCR the expression of MBP and PLP levels in the cerebellum of WT mice forced-fed with either LXR agonist TO901317 (TO9, 45mg/kg during 16h) or vehicle (methyl cellulose). TO9 administration was effective, according to the 15-folds increase of ABCA1 mRNA expression. We observed a 4-fold increase in MBP and a 5-fold increase of PLP mRNA expression when mice were treated with TO9 (Fig. 3A). At the protein levels, TO9 increased the amount of PLP (1.8-fold increase after WB quantification) and MBP (2.2-fold increase) in the cerebellum (Fig. 3B).

To confirm that the activation of myelin genes by TO9 was mediated by LXR, we treated LXR dKO mice with TO9 and quantified the expression of PLP, MBP and ABCA1 transcripts in the cerebellum. PLP, MBP and ABCA1 expression was not significantly affected by TO9 in LXR dKO treated mice (Fig. 3C). These results highlight that in the cerebellum, LXRs positively regulate myelin genes expression.

We analyzed the effects of TO9 or the natural oxysterol 25-OH on the expression of PLP and MBP in primary oligodendrocyte-enriched cultures and in the 158N oligodendroglial cell line. The incubation of primary oligodendrocyte cultures with 10 μ M of TO9 for 24h enhanced by 4-fold the amount of ABCA1 mRNA (Fig. 3D). TO9 moderately increased PLP

and MBP by 150 % and 120 %, respectively. 25-OH exhibited similar effects on PLP, and MBP expression.

We confirmed the stimulation of PLP transcripts by TO9 and 25-OH (10 μ M) in oligodendroglial cell line (158N) (Fig. 3E). However, MBP mRNA expression level appeared too weak to perform reproducible transcript quantification. To decipher the molecular mechanism of LXR-induced myelin genes expression, we performed promoter activity experiments. 158N cells were transiently transfected with PLP-luciferase reporter plasmid and incubated with TO9 or 25-OH (10 μ M). We observed a 1.5-fold stimulation of PLP promoter activity by both TO9 and 25-OH (Fig. 3F). These results show that LXRs positively regulate myelin genes expression through promoter activation.

In summary, we showed that oxysterols, their biosynthetic enzymes, as well as their cognate receptors (LXR α and β) are present in the cerebellum and oligodendrocytes where they regulate vital functions. As a matter of fact, we showed that oxysterols act, by means of LXRs, to stimulate the expression of central myelin genes (*PLP* and *MBP*) and to allow normal myelin sheaths thickness. Therefore, we speculate that the endogenous oxysterols contribute to the myelination process through modulation of the basal expression of myelin proteins *via* LXR signaling pathway.

LXR activation increases remyelination in cerebellum organotypic cultures

The results described above prompted us to address the question of a potential therapeutic use of LXR ligands in the treatment of demyelinating events. For that purpose, we induced a transient demyelination in an *ex vivo* model of cultured cerebellar slices using lysolecithin. We then treated the slices with either TO9 or 25-OH (10 μ M, 72h) and assessed remyelination status. Figure 4A showed that Purkinje cell axons, stained with CaBP antibody (red), were not affected by lysolecithin treatment. In contrast, myelin sheaths, stained with MBP antibody (green), clearly presented a sparse staining, featuring damaged myelin

sheaths. Interestingly, the treatment of lysolecithin-demyelinated slices with TO9 or 25-OH reverted the demyelinated phenotype by restoring myelinated axons (Fig. 4A, right panels).

We confirmed those observations by counting the number of axons and myelinated fibers (MBP⁺/CaBP⁺ staining). As shown in Figure 4B, the density of axons was unaffected by lysolecithin and/or TO9 or 25-OH treatments, indicating no neuronal effect. As expected, lysolecithin induced massive demyelination leading to 60% decrease of Purkinje myelinated axons (Fig. 4C). Moreover, TO9 treatment did induce remyelination process as it restored the percentage of myelinated axons to reach normal levels (approximately 75%). 25-OH exerted similar but less potent remyelinating effect (Fig. 4C).

Concomitantly, we studied the effect of TO9 after demyelination on myelin genes expression. PLP and MBP transcripts were decreased after lysolecithin treatment by 45 % and 50 %, respectively, while LXR signaling was not affected according to stable ABCA1 expression (Fig. 4D). Figure 4E shows that in demyelinated slices, TO9 or 25-OH activated LXR (confirmed by 4-fold increase of ABCA1 expression). They potently stimulated PLP and MBP mRNA expression (by 2.5 and 5 times for TO9 and 25-OH, respectively). These observations were confirmed at the protein level (Fig. 4F): lysolecithin treatment led to decreased PLP and MBP protein amounts while TO9 and 25-OH increased the expression of both genes by 2-fold and 1.5 fold, respectively.

We next investigated the effect of TO9 or 25-OH on oligodendroglial cell maturation in either normal (Fig. 4G) or lysolecithin-demyelinated (Fig. 4H) cerebellum organotypic slices. The number of immature oligodendrocyte (Nkx2.2 expressing cells) and mature oligodendrocytes (MBP positive cells) were determined in each condition. In normal slices, TO9 or 25-OH increased by 3-fold the number of Nkx2.2 positive cells without affecting the number of mature oligodendrocytes (Fig. 4G). Interestingly, after demyelination, TO9 enhanced the number of both immature and mature oligodendrocytes (Fig. 4H). In those conditions, 25-OH increased mature oligodendrocytes number but not Nkx2.2 positive cell population (Fig. 4H). These results highlight the ability of oxysterols to modulate

oligodendrocytes maturation. Moreover, they support a differential effect between the natural oxysterol and the synthetic LXR ligand, depending on physiopathological conditions.

The presence of LXRs is crucial for remyelination by TO901317

We tested the implication of LXRs in the remyelinating properties of TO9 and 25-OH. LXR dKO cerebellum slices were demyelinated using the same protocol as for WT. Lysolecithin treatment led to a clear disorganization of the myelin network (Fig. 4I) but did not significantly affect the number of axons (Fig. 4J). Demyelination caused a drastic loss of almost 80 % of myelinated fibers (Fig. 4K). Notably, TO9 or 25-OH did not significantly restore myelin network: MBP staining still appeared sparse (Fig. 4I) and the quantification revealed that neither TO9 nor 25-OH were able to increase the percentage of myelinated fibers (Fig. 4K). Altogether these results demonstrate that TO9 and 25-OH improve remyelination *via* LXR activation.

Our data suggest that the remyelination process induced by oxysterols is mediated by LXR pathway to enhance myelin genes expression and oligodendrocytes differentiation. Given that the modulation of the LXR pathway is already beneficial for the treatment of several pathologies of the nervous system (e.g. stroke (Chen et al., 2010), Alzheimer's disease (Cui et al., 2012), Parkinson disease (Sacchetti et al., 2009), and Experimental Autoimmune Encephalitis (Hindinger et al., 2006, Xu et al., 2009, Cui et al., 2012)), our observations open new perspectives for the development of therapies targeting LXR for the treatment of demyelinating diseases affecting the cerebellum such as multiple sclerosis.

CONCLUSION

Our results demonstrate that LXRs are important actors of the re/myelination process and potent activators of myelin gene expression in the cerebellum. Conversely, we previously showed that LXRs repress peripheral myelin gene expression in Schwann cells (Makoukji et al., 2011). This dual effect of LXR between the CNS and PNS could be due to differential regulation of the Wnt pathway, a common stimulator for myelin gene expression in both CNS and PNS (Tawk et al., 2011, Makoukji et al., 2012). Altogether, those data confirm a cell- and tissue-specific regulation of myelin genes by LXR.

From a physiological and fundamental point of view, our results highlight the complexity of the regulation of myelin genes and show, for the first time, the implication of LXR in myelin gene expression. Targeting nuclear receptors to stimulate remyelination is a challenging opportunity. We have shown that the modulation of steroid receptors (progesterone and glucocorticoid receptors) stimulates remyelination (Hussain et al., 2011). Retinoic X Receptor (RXR) could also be a good candidate for promoting remyelination. The administration of 9-cis-retinoic acid to demyelinated cerebellar slices and to rats after demyelination caused an increase of remyelinated axons (Huang et al., 2011). To modulate transcription, LXR must form a heterodimer with RXR. Thus, our findings on LXR and those of Franklin's group on RXR suggest that LXR/RXR pathway is a promising avenue for remyelination strategies (Huang et al., 2011).

EXPERIMENTAL PROCEDURES

In vitro and ex vivo culture - The immortalized mouse oligodendrocyte cell line 158N was transiently transfected by using Effecten reagent (Qiagen) as previously described by (Trousson et al., 2009) and promoter activity was assayed as described in (Massaad et al., 2000). Primary glial cells were prepared from P1 mouse brain (Tawk et al., 2011) and were grown during 7 days *in vitro* (DIV). Organotypic slices of cerebellum (350 µm) were prepared from P10 mice as described in (Hussain et al., 2011). After 7 DIV, they were demyelinated with lysolecithin overnight (0,5 mg/ml), and treated for 72h with ethanol (EtOH), 25-hydroxycholesterol (25-OH) or TO901317 (10 µM).

Animals - Eight-week-old male mice LXR dKO and their wild-type controls (provided by Dr J.M. Lobaccaro (Clermont-Ferrand, France)) were forced-fed with 45 mg/kg TO901317 or vehicle (methyl cellulose, veh) 16h before the sacrifice (Herzog et al., 2007). Cerebella were collected and frozen in liquid nitrogen. All aspects of animal care were approved by the Regional Ethic Committee (authorization 86/609/EEC). Each experiment was made to minimize the number of animals used and the suffering of animals.

Plasmids and chemicals - PLP-luc was provided by Dr WB Macklin (Ohio, USA). 25-OH and lysolecithin were purchased from Sigma-Aldrich and TO901317 from BertinPharma (France).

Oxysterols quantification by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS)- Cerebella from either WT or LXR dKO animals (n=4/group) were collected and oxysterols were extracted with 10 volumes MeOH/CHCl₃ (1/1 v/v). Thirty ng of ²H₁₀-24S-OH cholesterol, as internal standard, and 50 µg butylated hydroxytoluene (BHT) were added into extracts for oxysterols quantification and for avoiding cholesterol autoxidation processes, respectively. Details of oxysterol extraction and derivatization are exposed in (Trousson et al., 2009).

Western Blot, Immunohistochemistry, semi- and quantitative RT-PCR - Western blot, semi-quantitative RT-PCR and RT-qPCR, were performed as previously described (Makoukji et al., 2011, Tawk et al., 2011) and immunohistochemistry, as exposed in (Hussain et al., 2011). See also SI Methods.

Methylene blue/Azur II staining and transmission electron microscopy – Sample preparation and EM were performed as described by (Makoukji et al., 2011) and in in SI Methods.

Statistical analysis

Unless otherwise specified, two group comparisons were performed by the Student test. Means of multiple treated groups were compared by one-way analysis of variance (ANOVA). When the ANOVA showed that there were significant differences between the groups, Tuckey 's post-hoc tests were used to identify the sources of these differences. A p value ≤ 0.05 was considered as statistically significant. Analyses were performed with GraphPad Prism 4 Software, and we indicated * for $P < 0.05$, ** for $P < 0.01$, and *** for $P < 0.001$.

Acknowledgments:

This work was funded by Inserm, CNRS, Paris Descartes University, Paris Sud University, the Fondation pour l'Aide à la Recherche sur la Sclérose en Plaques (ARSEP) and the Association Française contre les Myopathies (AFM). DM received a post-doctoral fellowship from the NeRF (Neuropole de Recherche Francilien) and the ARSEP. GGS received PhD fellowships from the French Ministry of Research (MNRT). The authors greatly acknowledge S Zahra for her help in g-ratio determination, JM Petit from the Biomedical Imaging Facility (SCM) and Dr A Schmitt of the Cochin Imaging Facility.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Oxysterols, their biosynthetic enzymes and their receptors are present in the cerebellum.

(A) Cerebella were dissected from either WT or LXR dKO eight-week-old male mice (n=4/group). 24(S)-hydroxycholesterol (24(S)-OH), 25-hydroxycholesterol (25-OH) and 27-hydroxycholesterol (27-OH) were quantified by GC/MS as described in Trousson *et al.* 2009¹⁸. Results are expressed in ng of oxysterol per g of tissue (ng/g). Data represent the mean \pm SEM. (B) Total RNA was extracted from cerebella of eight-week-old male mice and PCR experiments were performed using primers recognizing either CYP46A1 (Cyp46), 25-hydroxylase (25-OHase), 27-hydroxylase (27-OHase) or (C) LXR α and LXR β . The RT-PCR was normalized using 18s or 26s mRNA. Results represent the means \pm SEM of at least three independent experiments performed in duplicate. *** P<0.001, compared by Student's t-test.

Figure 2: Invalidation of LXRs alters myelin structure and decreases myelin genes expression in the cerebellum.

Eight-week-old male WT and LXR dKO mice were sacrificed and their cerebella were dissected. Ultra-thin (50-90 nm) cross-sections were prepared from epon-embedded cerebellum and stained with aqueous uranyl acetate, followed by Reynolds lead citrate. Representative electron micrographs are presented. (A) Low magnification electron micrographs. Scale bar = 2 μ m. (B) High magnification electron micrographs of a representative axon and its myelin layers. Scale bar = 50 nm. (C) Myelin thickness was estimated by g-ratio (axonal perimeter/outer perimeter) determination. Data are given as means \pm SEM and compared with Student's t test (** P<0.01 with n=100/animal, 3 animals/group). (D) Total RNA was extracted from cerebella and quantitative real-time PCR experiments were performed using primers recognizing PLP, MBP or ABCA1 (positive control). The RT-PCR was normalized using GAPDH mRNA and data represent the mean \pm SEM (n=5/group). ** P<0.01, *** P<0.001 compared by Student's t test. (E) Proteins were

extracted from the cerebellum and Western Blots were performed using PLP and MBP antibodies (n=4/group). β -actin was used to normalize the blots. Figures represent a typical experiment. Western blots were quantified by using NIH Image J Software. ** P<0.01, *** P<0.001 compared by Student's t test.

Figure 3: TO901317 treatment enhances myelin gene expression *in vivo* and *in vitro*.

Eight-week-old WT mice were forced-fed with TO9 (45 mg/kg) or placebo and sacrificed 16 hours later for biochemical analysis. Total RNA was extracted from the cerebellum. (A) RT-qPCR experiments were performed using primers recognizing PLP, MBP or ABCA1 mRNA. The RT-PCR was normalized using GAPDH mRNA and data represent the mean \pm SEM. (*p<0.05, **: p<0.01 compared by Student's t test, with n=5/group). (B) Western-blot experiments using cerebellum proteins extracted from adult WT forced-fed with either vehicle or TO9 (n=5/group). PLP and MBP antibodies were used to highlight myelin proteins and β -actin for normalization. The blots represent a typical experiment. Western blots were quantified by using NIH Image J Software. * P<0.05 compared by Student's t test. (C) LXR dKO mice were forced-fed with TO9 or vehicle and sacrificed 16 hours later for cerebellar mRNA analysis using RT-qPCR experiments, as in (A). Data represent the mean \pm SEM, compared by Student's t-test with n=5/group. (D) Primary cultures enriched in oligodendrocytes were grown in culture for 7 days *in vitro* (7 DIV) and then treated with Ethanol (control) or TO9 (10 μ M) or 25-OH (10 μ M) during 24 h. Total RNA was extracted and RT-qPCR experiments were performed using primers recognizing PLP, MBP or ABCA1. The RT-qPCR was normalized using 26S mRNA and data represent the mean \pm SEM of at least five independent experiments. (E) 158N oligodendrocyte cells were treated with Ethanol (control) or TO9 (10 μ M) or 25-OH (10 μ M) during 24 h. Total RNA was extracted and RT-qPCR experiments were performed using primers recognizing PLP or ABCA1. The RT-qPCR was normalized using 26S mRNA and data represent the mean \pm SEM of at least five independent experiments. (F) 158N cells were transiently transfected with PLP-Luc. Sixteen hours after transfection, cells were incubated with TO9 or 25-OH (10 μ M) for 24 h, and then

luciferase and β -galactosidase activities were quantified. Results represent the means \pm SEM of at least six independent experiments performed in duplicate. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared by Student's t-test.

Figure 4: LXR activation improves remyelination of demyelinated organotypic cerebellum cultures.

After 7 days *in vitro* (DIV), organotypic slices of P10 mouse cerebellum were demyelinated by lysolecithin 0.5 mg/ml overnight. Afterward, the slices were treated for 3 DIV with TO9 or 25-OH (10 μ M). After double immunostaining (A) for MBP and Calbindin Protein (CaBP), images were acquired with a confocal Zeiss LSM 510 (Scale bar: 20 μ m) and quantified for (B) axon number, and (C) percentage of myelinated fibers (*** $P < 0.001$ analyzed by ANOVA one-way followed by Tukey's post-hoc test, $n = 18/\text{group}$). (D, E) Total RNA was extracted and RT-qPCR experiments were performed using primers recognizing PLP, MBP and ABCA1. The RT-PCR was normalized using 26S mRNA. Results represent the means \pm SEM of at least three independent experiments performed in duplicate. * $P < 0.05$, compared by Student's t-test. (F) Proteins were extracted from the cerebellar slices and Western Blots were performed using anti-PLP and anti-MBP antibodies. β -actin was used to normalize the blots. Western blots were quantified by using NIH Image J Software. These results were reproduced at least in three independent experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared by Student's t-test. Organotypic slice treated with (G) vehicle or (H) demyelinated by lysolecithin were double immunostained for Nkx2.2 and MBP. The images were acquired with confocal Zeiss LSM 510. The numbers of immature oligodendrocytes (immature oligo, Nkx2.2 positive) and mature oligodendrocytes (mature oligo, MBP immunoreactive cells) were quantified with NIH Image. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared by Student's t-test, $n = 12/\text{group}$. (I) Organotypic slices of P10 LXR dKO mouse cerebellum were demyelinated and treated by TO9 and 25-OH as for WT in (A). After double immunostaining for MBP and Calbindin Protein (CaBP), images were acquired with a confocal Zeiss LSM 510. Scale bar: 20 μ m. (J) Axon number and (K) percentage of myelinated fibers were

quantified with NIH Image. *** $P < 0.001$, analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test. N=18/group.

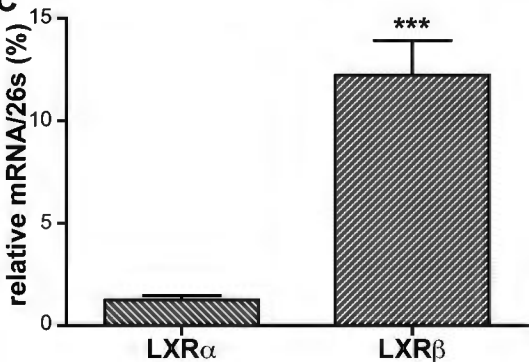
REFERENCES

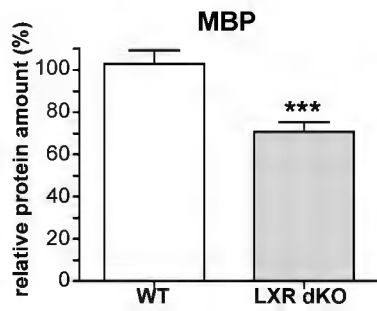
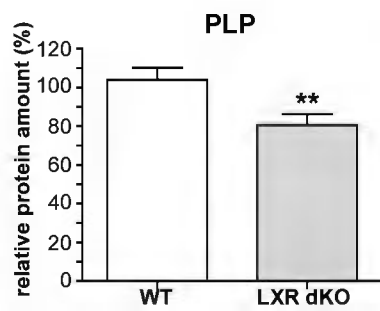
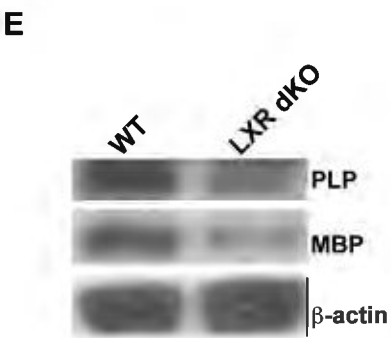
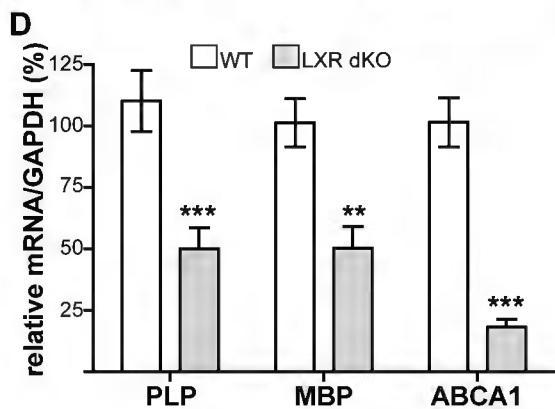
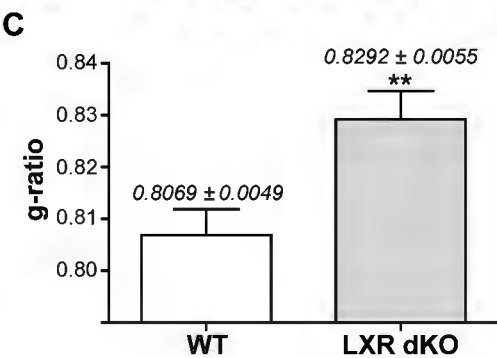
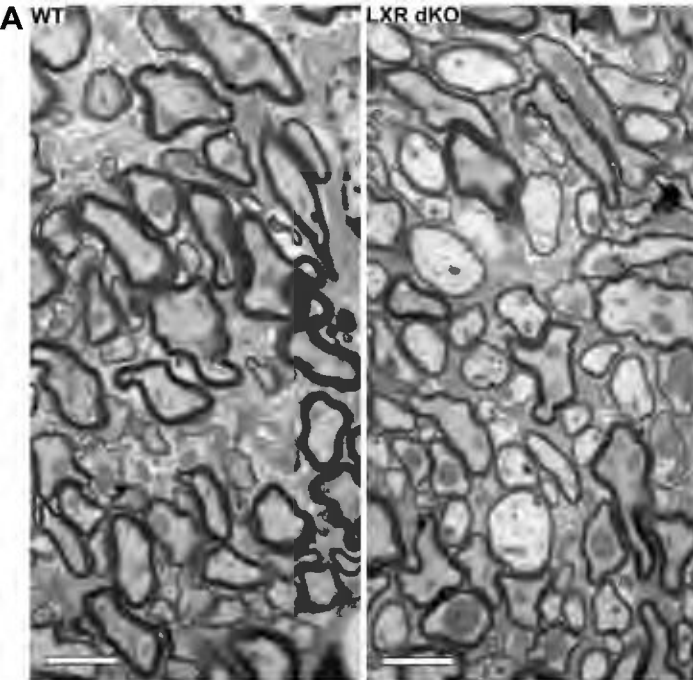
- Andersson S, Gustafsson N, Warner M, Gustafsson JA (2005) Inactivation of liver X receptor beta leads to adult-onset motor neuron degeneration in male mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:3857-3862.
- Baumann N, Pham-Dinh D (2001) Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol Rev* 81:871-927.
- Chen J, Zacharek A, Cui X, Shehadah A, Jiang H, Roberts C, Lu M, Chopp M (2010) Treatment of stroke with a synthetic liver X receptor agonist, TO901317, promotes synaptic plasticity and axonal regeneration in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 30:102-109.
- Chen JD, Evans RM (1995) A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature* 377:454-457.
- Cui W, Sun Y, Wang Z, Xu C, Peng Y, Li R (2012) Liver X receptor activation attenuates inflammatory response and protects cholinergic neurons in APP/PS1 transgenic mice. *Neuroscience* 210:200-210.
- Herzog B, Hallberg M, Seth A, Woods A, White R, Parker MG (2007) The nuclear receptor cofactor, receptor-interacting protein 140, is required for the regulation of hepatic lipid and glucose metabolism by liver X receptor. *Mol Endocrinol* 21:2687-2697.
- Hindinger C, Hinton DR, Kirwin SJ, Atkinson RD, Burnett ME, Bergmann CC, Stohlman SA (2006) Liver X receptor activation decreases the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci Res* 84:1225-1234.
- Horlein AJ, Naar AM, Heinzl T, Torchia J, Gloss B, Kurokawa R, Ryan A, Kamei Y, Soderstrom M, Glass CK, et al. (1995) Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature* 377:397-404.
- Huang JK, Jarjour AA, Nait Oumesmar B, Kerninon C, Williams A, Krezel W, Kagechika H, Bauer J, Zhao C, Evercooren AB, Chambon P, Ffrench-Constant C, Franklin RJ (2011) Retinoid X receptor gamma signaling accelerates CNS remyelination. *Nat Neurosci* 14:45-53.
- Hussain R, El-Etr M, Gaci O, Rakotomamonjy J, Macklin WB, Kumar N, Sitruk-Ware R, Schumacher M, Ghoumari AM (2011) Progesterone and Nestorone facilitate axon remyelination: a role for progesterone receptors. *Endocrinology* 152:3820-3831.
- Huuskonen J, Fielding PE, Fielding CJ (2004) Role of p160 coactivator complex in the activation of liver X receptor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:703-708.
- Janowski BA, Willy PJ, Devi TR, Falck JR, Mangelsdorf DJ (1996) An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha. *Nature* 383:728-731.
- Kornek B, Bernert G, Balassy C, Geldner J, Prayer D, Feucht M (2003) Glatiramer acetate treatment in patients with childhood and juvenile onset multiple sclerosis. *Neuropediatrics* 34:120-126.
- Liebetanz D, Merkler D (2006) Effects of commissural de- and remyelination on motor skill behaviour in the cuprizone mouse model of multiple sclerosis. *Exp Neurol* 202:217-224.
- Loughlin AJ, Copelman CA, Hall A, Armer T, Young BC, Landon DN, Cuzner ML (1997) Myelination and remyelination of aggregate rat brain cell cultures enriched with macrophages. *J Neurosci Res* 47:384-392.
- Makoukji J, Belle M, Meffre D, Stassart R, Grenier J, Shackleford G, Fledrich R, Fonte C, Branchu J, Goulard M, de Waele C, Charbonnier F, Sereda MW, Baulieu EE, Schumacher M, Bernard S, Massaad C (2012) Lithium enhances remyelination of peripheral nerves. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Makoukji J, Shackleford G, Meffre D, Grenier J, Liere P, Lobaccaro JM, Schumacher M, Massaad C (2011) Interplay between LXR and Wnt/beta-catenin signaling in the negative regulation of peripheral myelin genes by oxysterols. *J Neurosci* 31:9620-9629.
- Massaad C, Paradon M, Jacques C, Salvat C, Bereziat G, Berenbaum F, Olivier JL (2000) Induction of secreted type IIA phospholipase A2 gene transcription by interleukin-1beta. Role of C/EBP factors. *J Biol Chem* 275:22686-22694.

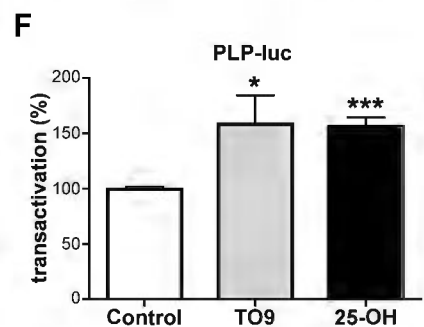
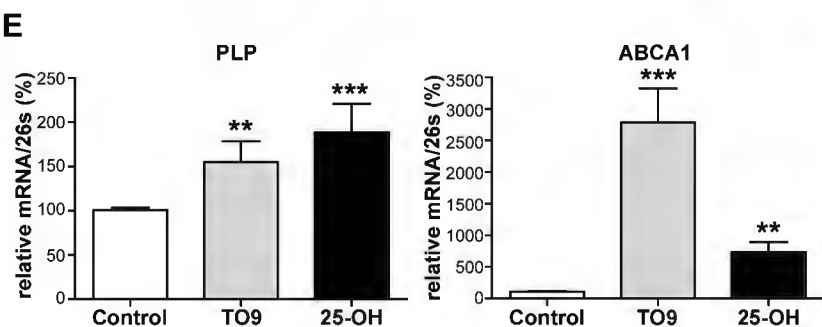
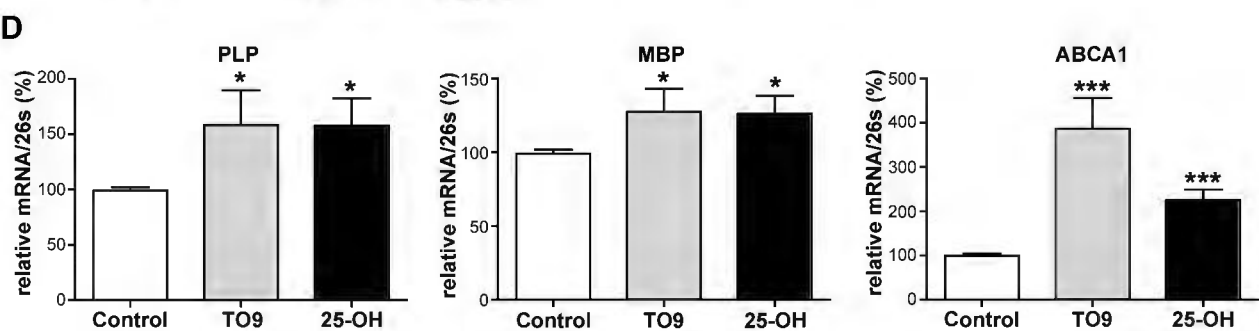
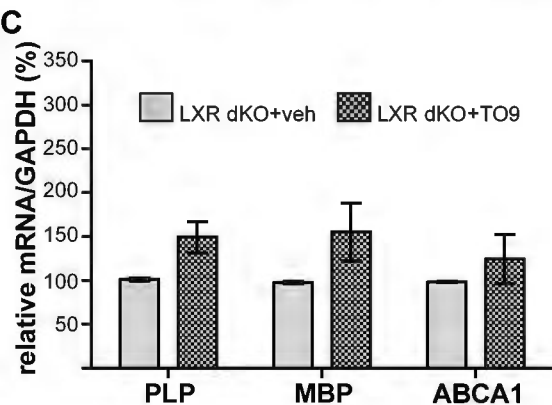
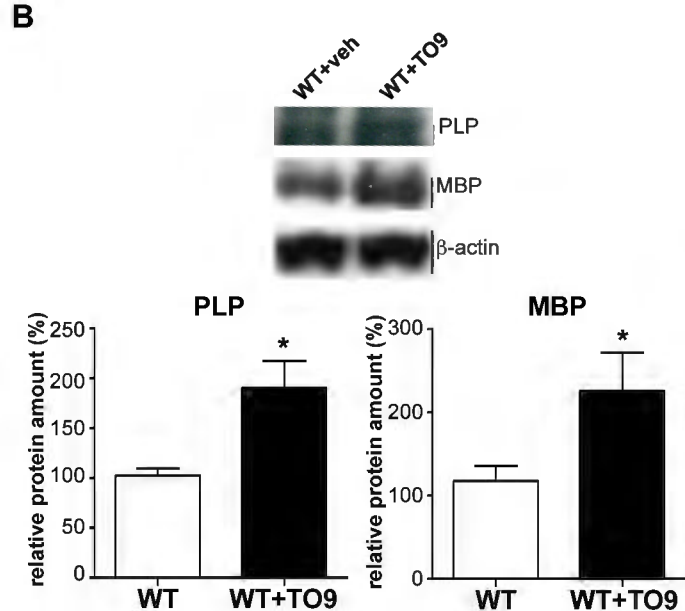
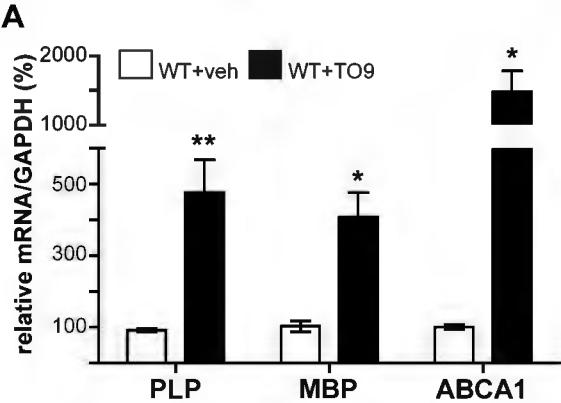
- Russell DW (2000) Oxysterol biosynthetic enzymes. *Biochim Biophys Acta* 1529:126-135.
- Sacchetti P, Sousa KM, Hall AC, Liste I, Steffensen KR, Theofilopoulos S, Parish CL, Hazenberg C, Richter LA, Hovatta O, Gustafsson JA, Arenas E (2009) Liver X receptors and oxysterols promote ventral midbrain neurogenesis in vivo and in human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 5:409-419.
- Smith PM, Jeffery ND (2006) Histological and ultrastructural analysis of white matter damage after naturally-occurring spinal cord injury. *Brain Pathol* 16:99-109.
- Tawk M, Makoukji J, Belle M, Fonte C, Trousson A, Hawkins T, Li H, Ghandour S, Schumacher M, Massaad C (2011) Wnt/beta-catenin signaling is an essential and direct driver of myelin gene expression and myelinogenesis. *J Neurosci* 31:3729-3742.
- Trousson A, Bernard S, Petit PX, Liere P, Pianos A, El Hadri K, Lobaccaro JM, Ghandour MS, Raymondjean M, Schumacher M, Massaad C (2009) 25-hydroxycholesterol provokes oligodendrocyte cell line apoptosis and stimulates the secreted phospholipase A2 type IIA via LXR beta and PXR. *J Neurochem* 109:945-958.
- Wang L, Schuster GU, Hultenby K, Zhang Q, Andersson S, Gustafsson JA (2002) Liver X receptors in the central nervous system: from lipid homeostasis to neuronal degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:13878-13883.
- Wekerle H (2002) Tackling multiple sclerosis. *Nature* 420:39-40.
- Xu J, Wagoner G, Douglas JC, Drew PD (2009) Liver X receptor agonist regulation of Th17 lymphocyte function in autoimmunity. *J Leukoc Biol* 86:401-409.

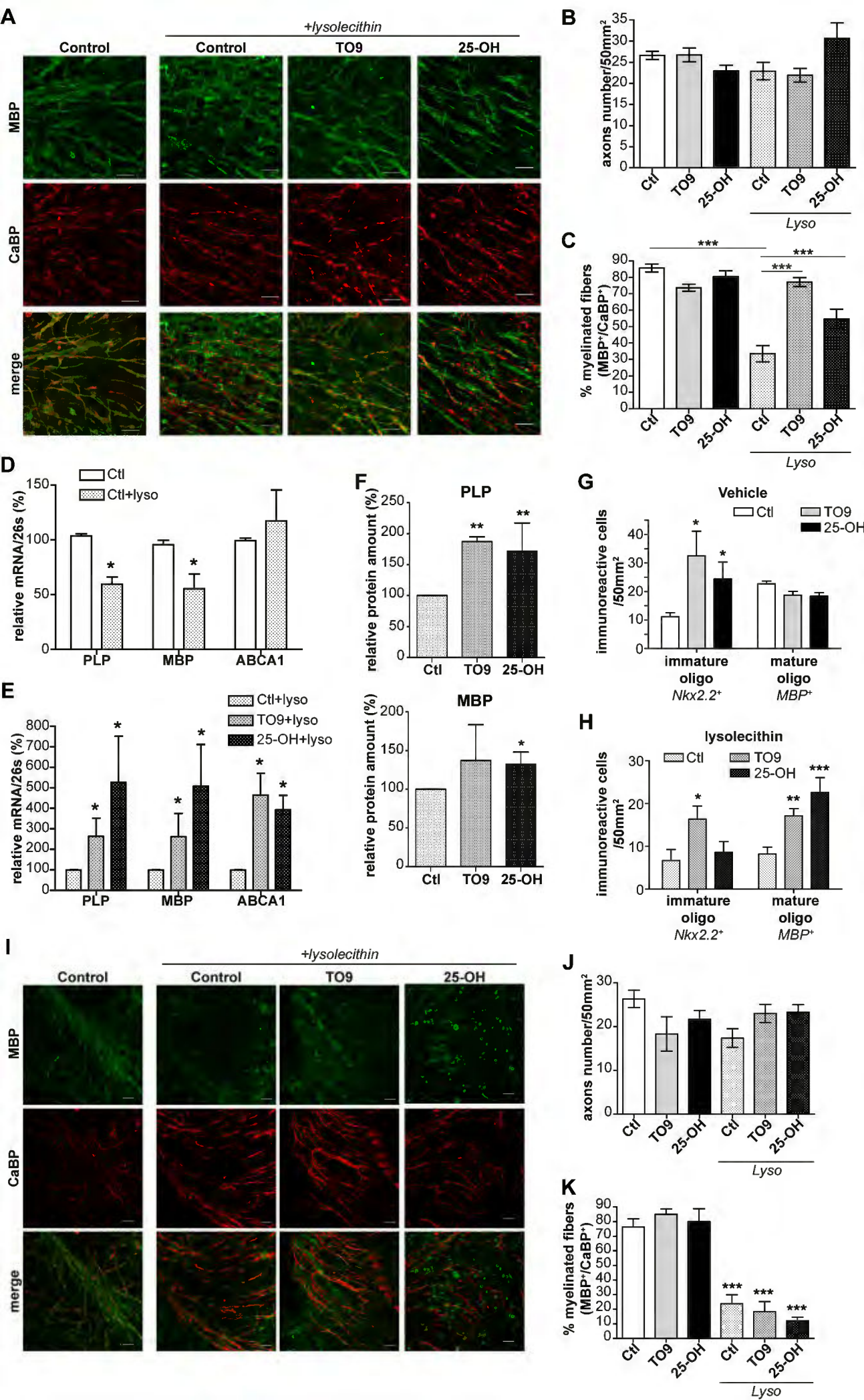
A

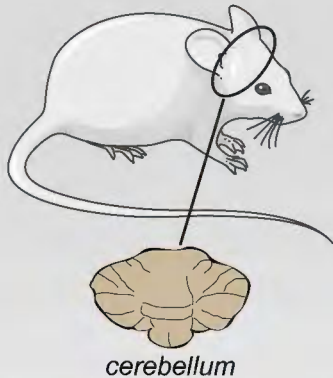
| ng oxysterol /g tissue | <i>cerebellum</i> | |
|---------------------------|-------------------|-----------|
| | wild type | LXR dKO |
| 24(S)-OH | 1841 ± 426 | 1741 ± 97 |
| 25-OH | 138 ± 8 | 172 ± 11 |
| 27-OH | 580 ± 32 | 846 ± 16 |

B**C**









LXR dKO

WT+oxysterols

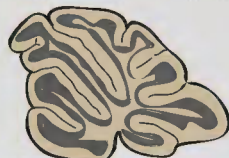
↓
decreased
myelin genes
expression

↓
thinner
myelin sheaths

↓
myelination

↓
increased
myelin genes
expression

organotypic cerebellum slices



demyelination

lysolecithin



+ oxysterols

increased
myelin genes
expression

increased
cell proliferation

increased
cell maturation

↓
remyelination

Supplementary information

SI Methods

Quantitative RT-PCR Experiments. Total RNA from cultured cells, organotypic slices or cerebellum were obtained by using TRIzol reagent (Invitrogen). One microgram was reverse-transcribed with random primers from Promega and reverse transcriptase M-MLV-RT from Invitrogen. Quantitative real-time PCR was performed with standard protocols using SYBRGreen ROX Mix (ABgene) as a fluorescent detection dye in ABI PRISM 7000, as described previously [1]. The primer sequences used in real time PCR experiments were as follows: 25-OHase sense: ACCCACTCACCATCTTTAC, 25-OHase antisense: GCCCAGCATTTTGTCCCA, 27-OHase sense: AGACCATCGGCACCTTTC, 27-OHase antisens: GCACCACACCAGTCACTT, CYP46A1 sens: ATGCCAGGGAAGAGAAAGC, CYP46A1 antisense: CTTTGAGGATCTGCGTGAG, 26S sense: AGGAGAAACAACGGTCGTGCCAAAA, 26S antisense: GCGCAAGCAGGTCTGAATCGTG, ABCA1 sense: CTGTTTCCCCCAACTTCTG, ABCA1 antisense: TCTGCTCCATCTCTGCTTTC, GAPDH sense: GTGGACCTCATGGCCTACAT, GAPDH antisense: TGTGAGGGAGATGCTCAGTG, MBP sense: CACACACGAGAACTACCCA, MBP antisense: GGTGTTTCGAGGTGTCACAA, PLP sense: AGCAAAGTCAGCCGCAAAC, PLP antisense: CCAGGGAAGCAAAGGGGG.

Western Blot. Western blots were performed as described by [2]. We used primary antibodies against PLP (1/1000, Abcam), MBP (1/500, Millipore) and β -actin (1/10000, for normalization) and secondary antibodies HRP-conjugated IgG (Upstaste).

Immunocytochemistry- The organotypic cultures were fixed in 4 % PFA for 1 h at room temperature. Slices were incubated for 1 h in PBS 0.12 M (pH 7.4) containing 0.25 % Triton-X, 0.2% gelatin, 0.1 % sodium azide (PBS-GTA) and lysine (0.1 M), before the overnight incubation with the primary antibodies: rabbit polyclonal antibody against Calbindin protein (CaBP, 1/10.000; Swant, Bellinzona, Switzerland), monoclonal antibody against MBP (1/1000, Chemicon International, Temecula, CA, USA), monoclonal antibody against Nkx2.2 (1/30, Developmental Studies Hybridoma Bank). The following secondary antibodies were used for 2h: goat anti-rabbit CY3 (1/500 dilution; Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc, West Baltimore Pike, MD, USA) and goat anti-mouse Alexa Fluor488 (1/1000 dilution, Molecular Probes, Leiden, the Netherlands). Organotypic slice culture staining was observed using a confocal Zeiss LSM 510 (Carl Zeiss Inc., Germany) image analyzing system. Images were acquired with confocal configuration (488 nm and 543 nm excitations) and processed with LSM Image Browser, version 4.2. For quantification of myelin segment (MBP positive staining) and axonal segment (CaBP positive staining), a region of interest was located around the apical ends of each lobule. Axonal number (CaBP+) and percentage of myelinated fibers (MBP+/CaBP+) were performed with NIH Image software from at least three random fields (50 μ m²) per slice. At least 18 slices per treatment were analyzed.

Methylene Blue/Azure II Staining and Transmission EM. Eight-week-old mice were deeply anesthetized by intraperitoneal injection of 40 mg/kg ketamine and 30 mg/kg xylazine and then intracardially perfused with 4 % paraformaldehyde, 2,5 % glutaraldehyde and 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4. Tissues were dissected and immersed in the same fixative solution at 4°C overnight, washed in phosphate buffer, postfixed in 2 % osmium tetroxide, dehydrated in graded ethanol series, and embedded in epoxy resin. Semithin sections were cut with a

glass knife at (0.5-1 μ m) and stained with methylene blue/azur II. For electron microscopy, ultrathin sections (50–90 nm) were cut on an ultramicrotome (8800 Ultratome III, LKB Bromma) and collected on 300-mesh nickel grids. Staining was performed on drops of 4 % aqueous uranyl acetate, followed by Reynolds's lead citrate [3]. Ultrastructural analyses were performed in a JEOL jem-1011 electron microscope and digitalized with DigitalMicrograph software. Image acquisition was performed at the Cochin Imaging Facility. Electron microscopy images were used for calculating the g-ratio and the number of myelinated axons using NIH ImageJ software. At least 100 randomly selected myelinated axons were analyzed per animal. At least three animals were used per genotype. Healthy axons were defined on the basis of the presence of intact membranes and the normal complement of organelles.

1. Makoukji J, Shackleford G, Meffre D, Grenier J, Liere P, Lobaccaro JM, Schumacher M, Massaad C (2011) Interplay between LXR and Wnt/beta-catenin signaling in the negative regulation of peripheral myelin genes by oxysterols. *J Neurosci* 31: 9620-9629
2. Tawk M et al (2011) Wnt/beta-catenin signaling is an essential and direct driver of myelin gene expression and myelinogenesis. *J Neurosci* 31: 3729-3742
3. Reynolds ES (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* 17: 208-212

Differential regulation of Wnt/beta-catenin signaling
by Liver X Receptors in Schwann cells and
oligodendrocytes

Ghjuvan'Ghjacumu Shackleford ^a, Joelle Makoukji ^a, Julien Grenier ^a, Philippe
Liere ^b, Delphine Meffre ^{a,*}, Charbel Massaad ^a

Biochemical Pharmacology 86 (2013) 106–114



Differential regulation of Wnt/beta-catenin signaling by Liver X Receptors in Schwann cells and oligodendrocytes



Ghjuvan'Ghjacumu Shackelford^a, Joelle Makoukji^a, Julien Grenier^a, Philippe Liere^b, Delphine Meffre^{a,*}, Charbel Massaad^a

^a University Paris Descartes, UMR 8194 CNRS, 45 rue des Saints-Pères, 75270, Paris Cedex 6, France

^b University Paris Sud, UMR 788 Inserm, 80 rue du Général Leclerc, 94276, Le Kremlin Bicêtre Cedex, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 January 2013

Accepted 27 February 2013

Available online 13 March 2013

Keywords:

Myelination

LXR

Oxysterol

Wnt/beta-catenin signaling

Myelin genes

SCHWANN cells

Oligodendrocyte

ABSTRACT

Oxysterols are reactive molecules generated by the oxidation of cholesterol. Their implication in cholesterol homeostasis and in the progression of neurodegenerative disorders is well known. Here, we study the role of oxysterols and their nuclear receptors, Liver X Receptor (LXR), in myelinating glial cells of the central and peripheral nervous systems. First, we show by gas chromatography/mass spectrometry that the brain, sciatic nerve, oligodendrocytes and Schwann cells contain 24(S)-hydroxycholesterol, 25-hydroxycholesterol (25-OH) and 27-hydroxycholesterol, and they express their biosynthetic enzymes. We observed a differential effect of 25-OH toward myelin genes (*MPZ* and *PMP22*) expression: 25-OH inhibits *MPZ* and *PMP22* in Schwann cell line but not in oligodendrocyte cell line. Importantly, the invalidation of LXR in mice enhanced *MPZ* and *PMP22* transcripts expression in the sciatic nerve, but inhibited their expression in the brain. We have previously reported that Wnt signaling pathway is crucial for myelin gene expression. We show that the transcripts of Wnt components (*Disheveled*, *TCF3*, *beta-catenin*) are strongly repressed by oxysterols in Schwann cells but are activated in oligodendrocytes. Furthermore, we show by immunofluorescent labeling that beta-catenin is re-localized on the level of the Golgi apparatus of Schwann cells after incubation with 25-OH. We did not observe such an unusual localization of beta-catenin in oligodendrocytes. Our findings reveal a complex cross-talk between LXR and Wnt/beta-catenin pathway in myelinating glial cells.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Oxysterols are natural compounds originating from the enzymatic oxidation of cholesterol. 24(S)-hydroxycholesterol (24(S)-OH), 25-hydroxycholesterol (25-OH) and 27-hydroxycholesterol (27-OH) are respectively synthesized by means of the cholesterol hydroxylase CYP46A1, 25-hydroxylase and 27-hydroxylase [1]. They are implicated in cholesterol turnover, inflammation and in neurodegenerative diseases.

The levels of oxysterols are altered in Alzheimer's disease (AD) [2] and multiple sclerosis (MS) [3]. In particular, the concentration of 24(S)-OH is increased in plasma and cerebrospinal fluid during AD early stages [2,4], whereas it is reduced in plasma at late stages [5]. Furthermore, 24(S)-OH concentrations are also modified in MS patients [3,6]. Glial cells are also targets for the oxysterols action, which inhibits astrocyte proliferation after brain injury [7] and cause oligodendrocyte apoptosis [8].

Some oxysterols (i.e. 24(S)-OH, 25-OH) are natural ligands for Liver X Receptors (LXRs) [9], which have two isoforms: LXR α and LXR β . LXRs form heterodimers with retinoic X receptor (RXR), the nuclear receptor for 9-*cis* retinoic acid. They regulate gene expression by binding to specific responsive elements [10]. LXRs are expressed in Schwann cells and oligodendrocytes [8,11]. LXR double KO (LXR dKO) mice exhibited a lipid homeostasis alteration in the brain, resulting in a loss of neurons, astrocytic proliferation, disorganized myelin sheaths [12] and lipid accumulation in specific brain regions.

Myelin sheaths are essential for the efficient conduction of action potentials and support the integrity of axons in the vertebrate nervous system. The myelination of axons is carried out during development by Schwann cells in the peripheral nervous system (PNS) and by oligodendrocytes in the central nervous system (CNS). Myelination involves the extension of large sheaths of membranes and their wrapping around axons, accompanied by the coordinated synthesis of a variety of myelin components, including myelin-specific proteins [13,14].

The expression of the peripheral myelin genes Myelin Protein Zero (*MPZ*) and Peripheral Myelin Protein-22 (*PMP22*) is tightly

* Corresponding author. Tel.: +33 1 42 86 22 73; fax: +33 1 42 86 22 73.
E-mail address: delphine.meffre@parisdescartes.fr (D. Meffre).

regulated in Schwann cells [15]. MPZ and PMP22 are also expressed in the brain, but at smaller amounts than in the nerve [16–18]. A slight change in PMP22 or MPZ expression has a deep impact on the development and preservation of nerve fibers and their myelin sheaths, as observed in Charcot-Marie-Tooth disease [19,20]. We have shown that steroid hormones [21] and more recently that the canonical Wnt/beta-catenin signaling pathway is a direct driver of myelin gene expression [22].

Wnt signaling is known to play a key role in neurogenesis and the fate of neural progenitors [23,24]. Moreover, it has been identified as a major regulator of neuronal circuit formation during development. It is also involved in neuron positioning, polarization, axon and dendrite development and synaptogenesis [25]. Wnt ligands bind to the frizzled membrane receptors (FZD), which interact with coreceptors named the arrow/low-density lipoprotein receptor-related proteins (LRP) [26]. Wnt signaling through FZD and LRP activates the cytoplasmic phosphoprotein dishevelled (DSH), which prevents beta-catenin degradation. The stabilized beta-catenin enters the nucleus, where it regulates gene transcription by interacting with transcription factors called the T-cell factor/lymphoid-enhancer factors (TCF/LEF).

The selective inhibition of Wnt components by siRNA or dominant negative forms inhibits the expression of myelin genes in mouse Schwann cells and in oligodendrocytes. Moreover, the activation of Wnt signaling by recombinant Wnt ligands increases the transcription of myelin genes. Importantly, loss-of-function analyses in zebrafish embryos show, *in vivo*, a key role for Wnt/beta-catenin signaling in the initiation of myelination and in myelin sheath compaction in the central and peripheral nervous systems. Inhibition of Wnt/beta-catenin signaling resulted in hypomyelination [22].

Our aim is to study the cross-talk between oxysterols/LXRs and Wnt pathway in the regulation of myelin genes. We show that oxysterols are produced in the brain, and in oligodendrocytes (CNS) as well as in the sciatic nerves and Schwann cell line (PNS). They inhibit myelin genes (MPZ and PMP22) in the PNS but not in the CNS. This differential effect on myelin genes is likely due to an opposite regulation of the Wnt components by oxysterols. Therefore, we highlighted a complex dialogue between LXR and Wnt/beta-catenin pathways in myelinating glial cells.

2. Materials and methods

2.1. Cell culture

The mouse Schwann cell line (MSC80) and mouse oligodendrocyte cell line (158 N) were maintained in Dulbecco's minimal essential medium (DMEM) supplemented with decomplexed fetal calf serum (Hyclone-Perbio) (10% for MSC80 cells and 5% for 158 N cells), 1% penicillin, 1% streptomycin (Gibco), 1% Glutamine and 0.2% Fungizone. All cultures were grown at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂.

2.2. Plasmids and chemicals

MPZ-luc was graciously provided by Dr G. Lemke (San Diego, USA) [27] and PMP22-luc by Dr P. Patel (Houston, USA) [28]. 25-OH was purchased from Sigma–Aldrich (France).

2.3. Transient transfections

MSC80 and 158 N cells were transiently transfected using Effecten reagent (QIAGEN). One day prior to the transfection, cells (1.5×10^5 cells/well) were grown into 6-well plate. The MPZ-Luc or the PMP22-luc plasmid (0.4 µg), the CMV-beta-Galactosidase expression vector (0.1 µg) were mixed with a solution containing

Effecten reagents in DMEM. The mixture was then added to the cells and incubated overnight. Sixteen hours after transfection, the medium was replaced by DMEM containing 25-OH (10 µM) or ethanol (vehicle). Luciferase activity was determined using the enzymatic method described in Massaad et al. [29]. The beta-galactosidase activity was used to normalize the transfection efficiency.

2.4. Animals

LXR dKO mice and their wild-type controls (kindly provided by Dr J.M. Lobaccaro, Clermont-Ferrand, France) were maintained on a mixed strain background (C57BL/6:129 Sv) and housed in a temperature-controlled room with a 12 h light/dark cycle [30]. All experiments were performed on age-matched (8 weeks old) male mice. Animals were fed *ad libitum* with water and Global-diet[®] 2016S from Harlan (Gannat, France) containing 16% protein, 4% fat, 60% carbohydrates. To reduce the effect of stress, the elapsed time between the capture of a mouse and its sacrifice by decapitation was under 30 seconds. Brain and sciatic nerves were collected and frozen in liquid nitrogen. All aspects of animal care were approved by the Regional Ethic Committee (authorization 86/609/EEC).

2.5. Quantitative and semi quantitative RT-PCR experiments

Total RNA was obtained using RNA NOW (Ozyme, France). One microgram was reverse transcribed with random primers from Promega (Charbonnières, France) and reverse transcriptase M-MLV-RT from Invitrogen (Cergy Pontoise, France). PCR experiments were performed using Taq DNA polymerase purchased from Promega (Charbonnières, France) and primers specific to each gene from Operon (Cologne, Germany). PCR products were analyzed on agarose gel (2%) and visualized under UV.

Quantitative real time PCR was performed with standard protocols using SYBR[®]Green ROX Mix (ABgene, France) as a fluorescent detection dye in ABI PRISM[®] 7000 in a final volume of 10 µl which also contains 300 nM primers (Operon, Cologne, Germany) and 20 ng of reverse transcribed RNA in 384-well plates. To characterize the generated amplicons and to control the contamination by unspecific by-products, a melting curve analysis was applied. Each reaction was performed in triplicate and the mean of at least three independent experiments was calculated. All results were normalized to the 26S mRNA level and calculated using the Delta Ct method. The primer sequences used in real time PCR are listed below:

18S F: 5'CTACCACATCCAAGGAAGGC3'
 18S R: 5'CTCGGGCCTGCTTTGAACAC3'
 26S F 5'AGGAGAAACAACGGTCTGTCCAAAA3'
 26S R 5'GCGCAAGCAGGTCTGAATCGTG3'
 CYP46A1 F: 5'ATGCCAGGAAGAGAAAGC3'
 CYP46A1 R: 5'CTTTGAGGATCTGCGTGAG3'
 25-OHase F: 5'ACCCACTCACCATCTTTAC3'
 25-OHase R: 5'GCCAGCATTGTGCCA3'
 27-OHase F: 5'AGACCATCGGCACCTTTC3'
 27-OHase R: 5'GCACCACACCAGTCACTT3'
 MPZ F 5'GTCAAGTCCCCAGTAGAA3'
 MPZ R 5'AGGAGCAAGAGGAAAGCAC3'
 PMP22 F 5'AATGGACACAGACTGATC3'
 PMP22 R 5'CCTTTGGTGAGAGTGAAGAG3'
 DVL3 F: 5'CCGATGAGGATGATCCACC3'
 DVL3 R: 5'TGAGGCCTGCTCTGTCTCTG3'
 TCF3 F: 5'ACCCCTTCTGATGATTCC3'
 TCF3 R: 5'CGACCTTGTGCTCTTGACT3'
 Beta-catenin F: 5'GCCACAGGATTACAAGAAGC3'
 Beta-catenin R: 5'CCACCAGAGTGAAGAAGACG3'

2.6. Antibodies

Primary antibodies against beta-actin (rabbit polyclonal) was purchased from Abcam; beta-catenin (mouse monoclonal) from BD Biosciences; GAPDH (mouse monoclonal) from Millipore, Giantin (rabbit polyclonal) from Covance. Secondary antibodies used for western blotting were: HRP-conjugated goat anti-mouse IgG and HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG (Millipore). Secondary antibodies used for immunocytochemistry were: Alexa Fluor[®] 488 donkey anti-mouse IgG (Molecular Probes) and CyTM3 conjugated AffiniPure donkey Anti-Rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch).

2.7. Western blot

Protein content was determined using the "RC DC" protein assay kit (BioRad) with BSA as standard. Aliquots of 30 µg of total brain, sciatic nerve, MSC80 or 158 N extracts treated with ethanol (vehicle) or 25-OH (10 µM) were used for each sample. Homogenate proteins were separated on 15% SDS-polyacrylamide gels by electrophoresis and blotted onto PVDF (polyvinylidene difluoride) membranes. Non specific binding sites in the transblots were blocked at 4 °C overnight with 2% ECL Advance blocking agent (Amersham) with 0.1% Tween 20 (Invitrogen) in PBS. Membranes were then incubated at room temperature for 2 h with the following primary antibodies diluted in a mixture of 2% ECL Advance blocking agent and PBS-Tween 0.1%: beta-catenin antibody (1/1000) and β-actin and GAPDH antibody (1/10 000). They were then incubated at room temperature for 1h30 with the appropriate secondary antibody diluted in 2% blocking buffer/PBS-Tween 0.1% (anti-rabbit: 1:20 000; anti-mouse: 1:20 000), followed by ECL Plus western blotting detection (Amersham) before exposure to radiographic film Hyperfilm ECL (Amersham). Western blots were quantified by means of NIH Image J Software.

2.8. Oxysterols quantification by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS)

MSC80 or 158 N cells (35×10^6) and their corresponding media as well as brains and sciatic nerves were extracted separately with 10 volumes MeOH/CHCl₃ (1/1 v/v). Thirty ng of ²H₁₀-24S-OH cholesterol, as internal standard, and 50 µg of butylated hydroxytoluene (BHT) were added into extracts for oxysterols quantification and for avoiding cholesterol autoxidation processes, respectively.

Cholesterol was separated from oxysterols by solid-phase extraction. Samples were applied in CH₃CN/Isopropanol (1/1 v/v) to a 500 mg C18 cartridge (International Sorbent Technology, Mid Glamorgan, UK) and oxysterols were eluted with 12 ml CH₃CN/Isopropanol/H₂O (55/25/25 v/v/v). This fraction was further purified by means of a second solid-phase extraction with a recycling procedure [31].

The oxysterol fraction was filtered through a 0.45 µm Gelman PVDF membrane and was purified by high performance liquid chromatography (ThermoFisher Scientific, San Jose, CA, USA) and collected with a fraction collector (Gilson). HPLC was achieved with a Lichrosorb Diol column as described [32].

The oxysterols-containing fraction from HPLC was derivatized with N-methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamide (MSTFA) to form the di-trimethylsilyl ether derivatives of oxysterols.

Derivatized cells and media extracts as well as derivatized calibration solutions were injected with an AS 2000 autosampler (Thermo Electron Corporation, San Jose, USA) into the GC/MS system which consisted of a TraceGC gas chromatograph coupled with an Automass Solo mass spectrometer.

GC was performed in the splitless mode with a BPX5 capillary column (SGE, Australia). The temperature in the oven was initially 50 °C for 1 min and then ramped to 340 °C at 20 °C/min.

The mass spectrometer was operated in the electronic impact mode. Identification of each oxysterol was supported by its retention time and two diagnostic ions in the single ion monitoring (SIM) mode. Quantification was performed according to the major diagnostic ion.

2.9. Immunocytochemistry experiments

MSC80 and 158 N cells were seeded at the density of 50 10⁴ cells in 4 cm² glass Lab-Tek wells (Nunc). The cells were incubated with ethanol (vehicle) or 25-OH (10⁻⁵ M) for 24 h. The cells were then washed and fixed with PFA 4% for 20 min at room temperature. Then the cells were permeabilized with Triton 1× for 30 min at room temperature. The cells then were incubated with beta-catenin primary antibody (dilution 1:250) and Giantin (1/1000) overnight at 4 °C and labeled with Alexa 488 (donkey anti mouse) (1/500), Cy3 (donkey anti rabbit) (1/400) and TO-PRO-3 (1/1000) for one hour at room temperature. The slides were imaged using a confocal microscope LSM (Carl Zeiss Inc.) with a 63x (NA:1.4) oil lens.

Images were analyzed by means of LSM 510 off line Software. For each image, we have drawn a line that passes by the cytoplasm, Golgi apparatus and the nucleus. The LSM510 software allows, for each wavelength, the measurement of the intensity for each pixel of the image. The results are expressed as the intensity of the fluorescence for each channel along the distance of this line. The orthogonal view allows a 3D exploration of the sample.

2.10. Statistical analysis

Two groups comparisons were performed by the Student test. A P value of ≤0.05 was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Oxysterols are present in myelinating glial cells

We examined the presence of some oxysterols in brain and nerve tissue as well as in the myelinating glial cells: MSC80 (mouse Schwann cell line) and 158 N (oligodendrocyte cell line). In the brain, the concentration of 24(S)-OH was high (10,350 ± 5.4 ng of oxysterols per g of tissue which is approximately 25 µM), while 25-OH and 27-OH were less prominent (65.7 ± 1.1 ng/g and 206.1 ± 5.4 ng/g, respectively) (Fig. 1A). The levels of 24(S)-OH, 25-OH and 27-OH were detected in 158 N cells and in their culture medium. 24(S)-OH prevailed over 25-OH in the cells (50.8 ± 7.2 vs. 28.4 ± 2.4 ng/40.10⁶ cells) while both oxysterols were present at equivalent amounts in the medium. 27-OH was present at a lower amount than 24(S)-OH and 25-OH in the cells and the culture medium. 24(S)-OH, 25-OH and 27-OH were also present in mouse sciatic nerves (Fig. 1A) (ex: 24(S)-OH is at 173.6 ± 12.1 ng of oxysterol per g of tissue which is about 0.5 µM). Those oxysterols were also detected in MSC80 cell lysates and in their culture media at lower amounts than in oligodendrocyte cell line (Fig. 1A).

In brain, essentially in neurons, cholesterol can be metabolized into various oxysterols, mainly 24(S)-OH, 25-OH or 27-OH, by means of cholesterol hydroxylases enzymes, CYP46A1, 25-hydroxylase and 27-hydroxylase, respectively [1]. Transcripts of each of these enzymes were detected by RT-PCR in mouse brain, sciatic nerve, 158 N and MSC80 cells (Fig. 1B). Therefore, we believe that there is a de novo production of oxysterols in oligodendrocytes and in Schwann cells.

A

| Oxysterols | Brain (ng oxysterol/g tissue) | Oligodendrocyte Cell Line (158N) (ng oxysterol/40.10 ⁶ cells) | | Sciatic nerve (ng oxysterol/g tissue) | Schwann Cell Line (MSC80) (ng oxysterol/40.10 ⁶ cells) | |
|--------------|----------------------------------|--|---------------|--|---|------------|
| | | lysate | medium | | lysate | medium |
| | | 24(S)-OH | 10350.1 ± 5.4 | | 50.8 ± 7.2 | 44.4 ± 4.4 |
| 25-OH | 65.7 ± 1.1 | 28.4 ± 2.4 | 42.8 ± 4.4 | 199.1 ± 19.7 | 3.5 ± 0.5 | 6.4 ± 0.5 |
| 27-OH | 206.1 ± 5.4 | 4.8 ± 0.8 | 15.2 ± 3.1 | 185.8 ± 40.4 | 5.0 ± 0.5 | 15.5 ± 0.8 |

B

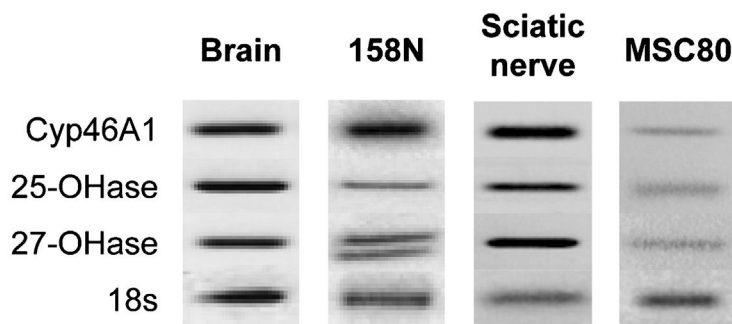


Fig. 1. (A) Detection of 24-S-Hydroxycholesterol, 25-Hydroxycholesterol and 27-Hydroxycholesterol. The brain and the sciatic nerves were isolated from 8 weeks-old male mice. The oxysterols were extracted as described in Section 2. Results are expressed in ng per g of tissue. 158 N or MSC80 cells were cultured in normal conditions during 72 h. Then, medium and cells were separated to measure oxysterols by GC/MS analysis. Results are expressed in ng per 40 millions cells and represent the mean \pm SEM of four independent experiments performed in duplicate. 24(S)-OH: 24-S-Hydroxycholesterol, 25-OH: 25-Hydroxycholesterol, 27-OH: 27-Hydroxycholesterol. (B) Detection of Cyp46A1, 25-hydroxylase and 27-hydroxylase mRNAs in brain, sciatic nerve, 158 N and MSC80 cells. Total RNA was extracted from the brain and the sciatic nerves of 8 weeks-old male mice. 158 N and MSC80 cells were cultured and were harvested and total RNA was prepared. RT-PCR were performed by using specific primers recognizing Cyp46A1, 25-hydroxylase (25-OHase) and 27-hydroxylase (27-OHase) and normalized by using 18S. PCR products were analyzed on agarose gel (2%) and visualized under UV.

3.2. 25-OH and LXR differentially regulate MPZ and PMP22 expression in the central and peripheral nervous systems.

We assayed the expression of MPZ and PMP22 transcripts in the sciatic nerve of wild-type and LXR α/β $-/-$ (LXRdKO) animals. As PMP22 [16] and MPZ [17,18] are also present in the CNS, we also analyzed the expression of these transcripts in the brain. We evaluated the effect of 25-OH on their expression. In the sciatic nerve, the invalidation of LXR α/β enhanced the transcripts of MPZ and PMP22 by 90% and 60%, respectively (Fig. 2A). In the brain, we observed a 30% inhibition of MPZ and PMP22 expression in the brain of LXR dKO animals (Fig. 2B).

To assess whether 25-OH exerts its effect at the level of the MPZ and PMP22 promoters, we performed transient transfection assays. MSC80 cells were transfected with either MPZ promoter-luciferase reporter (MPZ-Luc) or PMP22 promoter-luciferase reporter (PMP22-Luc) constructs and then incubated with 10 μ M of 25-OH during 24 h. 25-OH reduced by 40% MPZ and PMP22 promoter activities (Fig. 2C). In 158 N, 25-OH failed to exert any significant effect on MPZ or PMP22 promoters (Fig. 2D).

3.3. Oxysterols inhibit canonical Wnt signaling in Schwann cells but not in oligodendrocytes.

We have shown that the Wnt/beta-catenin signaling pathway is a major driver of myelin gene expression [22]. For that reason, we examined whether oxysterols can modulate Wnt signaling in

Schwann cells and oligodendrocytes. By RT-qPCR, we showed that the transcripts of the major components of the canonical Wnt pathway are inhibited by 25-OH in MSC80 cells: Disheveled 3 (-75%), TCF3 (-50%) (Fig. 3A). Interestingly, in 158 N cells, we obtained opposite results: 25-OH stimulated by 2-folds DVL3 and TCF3 transcripts (Fig. 3B).

Beta-catenin, the central protein of the canonical Wnt pathway, was also affected by 25-OH. In MSC80 cells, 25-OH inhibited beta-catenin transcript (-50%) and protein (-88%) expression (Fig. 3C). This observation was confirmed in the sciatic nerves of adult LXR dKO mice, where beta-catenin transcript was increased by 50%, and beta-catenin protein expression stimulated by 2.5-folds (Fig. 3E).

To the opposite, 25-OH stimulated the expression of beta-catenin transcript by 2-folds in 158 N oligodendroglial cells (Fig. 3D), but beta-catenin protein expression was inhibited by 25-OH (-50%) suggesting a post-translational effect in 158 N cells (Fig. 3D). In the brain of LXR dKO mice, we observed an inhibition of beta-catenin transcript (-25%). Here also, beta-catenin protein had an opposite behavior compared to its transcript: it was stimulated by 50% in the brain of LXR dKO animals (Fig. 3F).

3.4. Unusual localization of beta-catenin in Schwann cells after 25-OH treatment

We analyzed the localization of beta-catenin in Schwann cells after incubation with 25-OH. In control cells, beta-catenin was

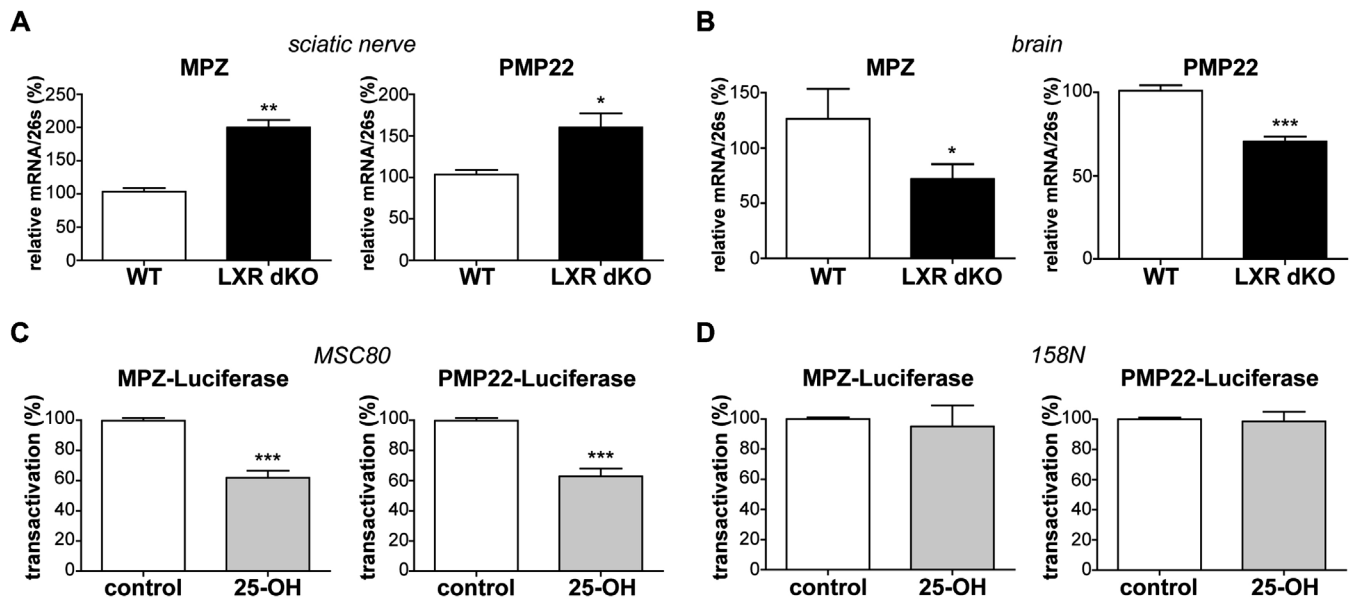


Fig. 2. Effects of 25-OH and LXR on the expression of MPZ and PMP22. *Expression of myelin genes in adult LXRdKO mice:* 8 weeks-old male LXRdKO mice were sacrificed and then their sciatic nerves (A) and brains (B) were dissected ($n = 6$ per group). Total RNA was extracted and quantitative real-time PCR experiments were performed using primers recognizing MPZ or PMP22. The RT-qPCR was normalized using 26S RNA and they represent the mean \pm SEM. * $P < .05$, ** $P < .01$, *** $P < .001$ by Student's tests when compared to control. *Effect of 25-OH on MPZ and PMP22 promoter activities in myelinating glial cells:* MSC80 (C) and 158 N cells (D) were transiently transfected with MPZ-Luc or PMP22-Luc constructs. Sixteen hours after transfection, cells were incubated with ethanol (vehicle) or 25-OH at 10 μ M for 24 h, and then β -galactosidase and luciferase activities were analyzed. Results represent the means \pm SEM of at least 4 independent experiments performed in duplicate. *** $P < .001$ by Student's tests when compared to control.

mainly localized in the membrane and the cytoplasm, and a small fraction was nuclear (Fig. 4A). When the cells were incubated with 25-OH during 24 h, we observed a relocalization of a part of beta-catenin in a structure near the nucleus that resembles to the Golgi apparatus (Fig. 4A and B). To confirm that 25-OH triggers a partial localization of beta-catenin into the Golgi apparatus, we performed immunocytochemistry experiments using beta-catenin and giantin antibodies. Giantin is a marker of the Golgi apparatus. When MSC80 cells were incubated with 25-OH during 24 h, we observed a co-localization of a part of beta-catenin with giantin (Fig. 4A and B). This observation suggests that beta-catenin localizes on the level of the Golgi apparatus of MSC80 only after incubation with 25-OH. We quantified the colocalization between Alexa 488 (fluorochrome of the secondary antibody recognizing beta-catenin) and Cyanin 3 (fluorochrome of the secondary antibody recognizing giantin) fluorescence by means of LSM 510 off-line software (Fig. 4C) and therefore confirmed that 25-OH triggers a relocalization of beta-catenin to the Golgi apparatus in MSC80.

In 158 N cells, we did not observe this relocalization in the Golgi apparatus. In control cells, beta-catenin was nucleocytoplasmic, and incubation with 25-OH during 24 h did not trigger any co-localization with giantin (Fig. 4D). Our results show that 25-OH elicits a re-localisation of beta-catenin in the Golgi apparatus only in Schwann cell line.

4. Discussion

Oxysterols are generated from the auto-oxidation or enzymatic oxidation of cholesterol [33]. We have shown that oxysterols (24(S)-OH, 25-OH and 27-OH) are present in the brain, in the sciatic nerve and in myelinating glial cells: oligodendrocyte and Schwann cells. The amounts of 24(S)-OH are 60-folds higher in the brain than in the sciatic nerve, while 25-OH and 27-OH are at the same range in the central and peripheral nervous systems. We also noticed that oxysterols are at higher amounts in oligodendrocytes than in Schwann cells. Furthermore, their biosynthetic enzymes

are also expressed in those cells suggesting a local synthesis of oxysterols in myelinating glial cells.

Oxysterols have been long considered in the nervous system as "garbage" molecules originating from an excess of cholesterol. Brain cholesterol is transformed into 24(S)-OH, the later is able to exit from the brain to reduce the amount of cholesterol in the brain [34]. High amounts of cholesterol could be toxic for the brain especially in AD. The overexpression of cyp46A1 that allows the transformation of cholesterol into 24(S)-OH decreased the severity of the phenotype of the mice suffering from AD [35].

Oxysterols must not be only considered as products of cholesterol efflux. They are reactive molecules that are able to modulate directly or indirectly several signaling pathways. 24(S)-OH, 25-OH and 27-OH bind and activate the nuclear receptors LXRs. Those receptors are implicated in lipid metabolism and in the inflammatory process. Studies with transgenic mice revealed important roles of LXRs in the nervous system [36]. LXR $\beta^{-/-}$ or LXR dKO transgenic mice show several defects like axonal atrophy, neuronal loss, astrogliosis and lipid accumulation in specific brain regions [12]. LXRs regulate the levels of the cholesterol transporters (ABCA1 and ABCG1) as well as apolipoproteins (apoE and apoC) (for review see [37]). In the brain, LXRs regulate ABCA1 in both neurons and glia resulting in cholesterol efflux from these cells. In addition, the expression of apoE, synthesized primarily by astrocytes and microglia, is also upregulated by LXR agonists. As both apoE and the ABCA1 transporter are intimately involved in amyloid-beta peptide (A β) transport and clearance (for review see [37]), activation of these genes by LXR agonists in brain may have a significant impact on A β deposition and amyloid/neuritic plaque formation. LXR agonists may also have positive effects in treatment of Parkinson disease by modulating the cytotoxic functions of microglia [38]. LXR activation has a beneficial outcome in stroke [39] and traumatic brain [40] and spinal cord [41] injuries.

We have previously demonstrated that oxysterols inhibit peripheral myelin genes expression (MPZ, PMP22) in a Schwann cell line [42]. Importantly, the knockout of LXR in mice resulted in thinner myelin sheaths surrounding the axons of the sciatic nerve

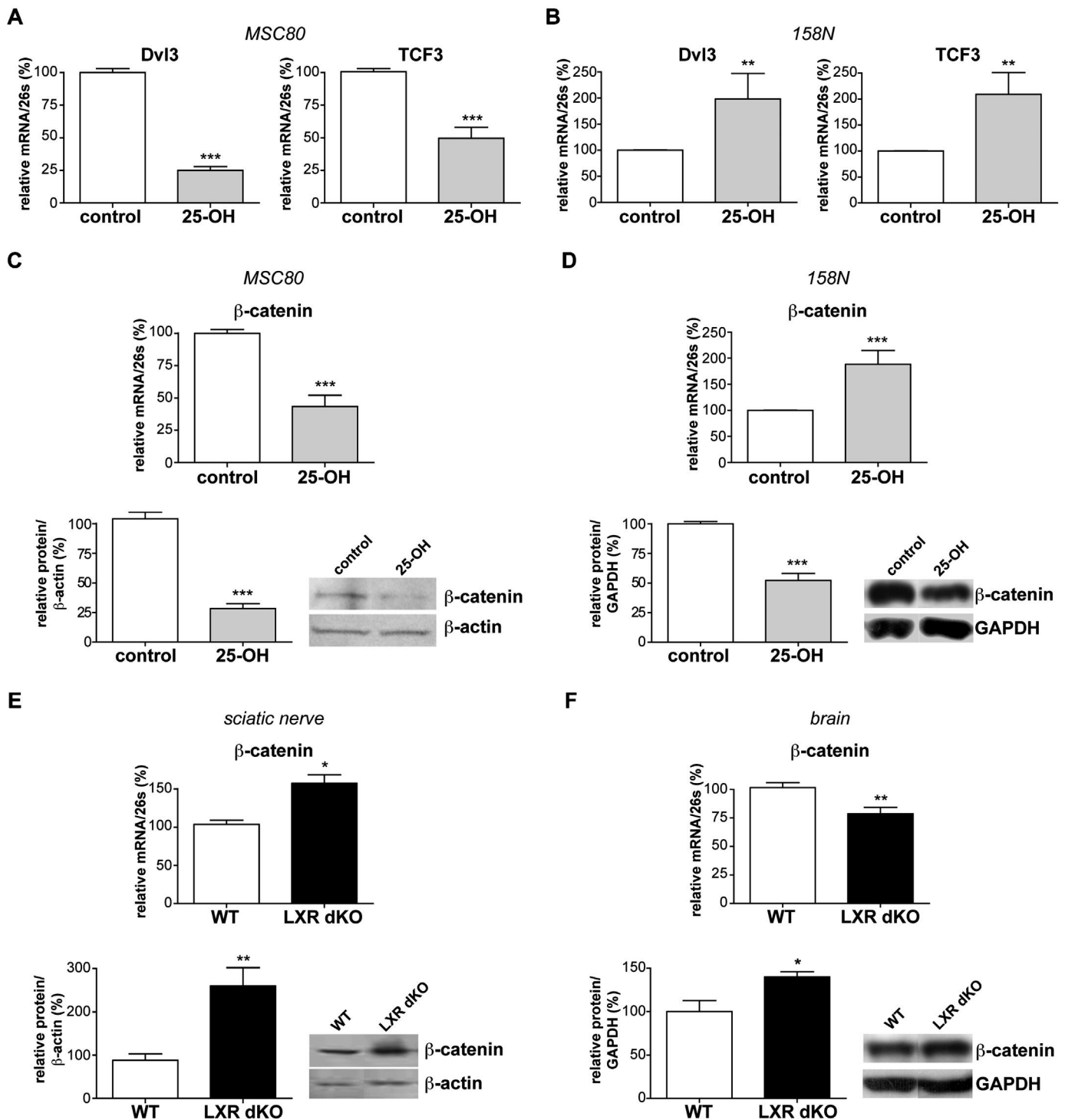


Fig. 3. Effect of 25-OH and LXR on Wnt/beta-catenin pathway. *Effect of 25-OH on the expression of components of the Wnt signaling pathway:* MSC80 (A) and 158 N cells (B) were treated with ethanol (vehicle) or 25-OH at 10 μ M during 24 h. Total RNA was extracted and quantitative real-time PCR experiments were performed using primers recognizing DVL3 and TCF3. The RT-qPCR were normalized using 26S RNA and they represent the means \pm SEM of at least four independent experiments. $^{**}P < .01$ and $^{***}P < .001$ by Student's *t* test when compared to control. MSC80 (C) and 158 N (D) cells were treated with ethanol (vehicle) or 25-OH at 10 μ M during 24 h. Total RNA or proteins were extracted. Quantitative real-time PCR experiments were performed using primers recognizing beta-catenin. The RT-qPCR was normalized using 26S RNA and they represent the means \pm SEM of at least six independent experiments. Western Blots were performed using anti-beta-catenin antibody. Beta-actin or GAPDH were used to normalize the Western blots. The Western Blots were quantified as described in Section 2. $^{***}P < .001$ by Student's *t* test when compared to control. *Effect LXR invalidation on the expression of beta-catenin:* Sciatic nerves (E) and brains (F) were isolated from either 8-weeks old male wild-type mice (WT) or LXR dKO mice. Total RNA or proteins were extracted. Quantitative real-time PCR experiments were performed using primers recognizing beta-catenin. The RT-qPCR was normalized using 26S RNA and they represent the means \pm SEM of at least six independent experiments. Western Blots were performed using anti-beta-catenin antibody. Beta-actin or GAPDH were used to normalize the Western blots. The Western Blots were quantified as described in Section 2. $^{*}P < .05$ and $^{**}P < .01$ by Student's *t* test when compared to control.

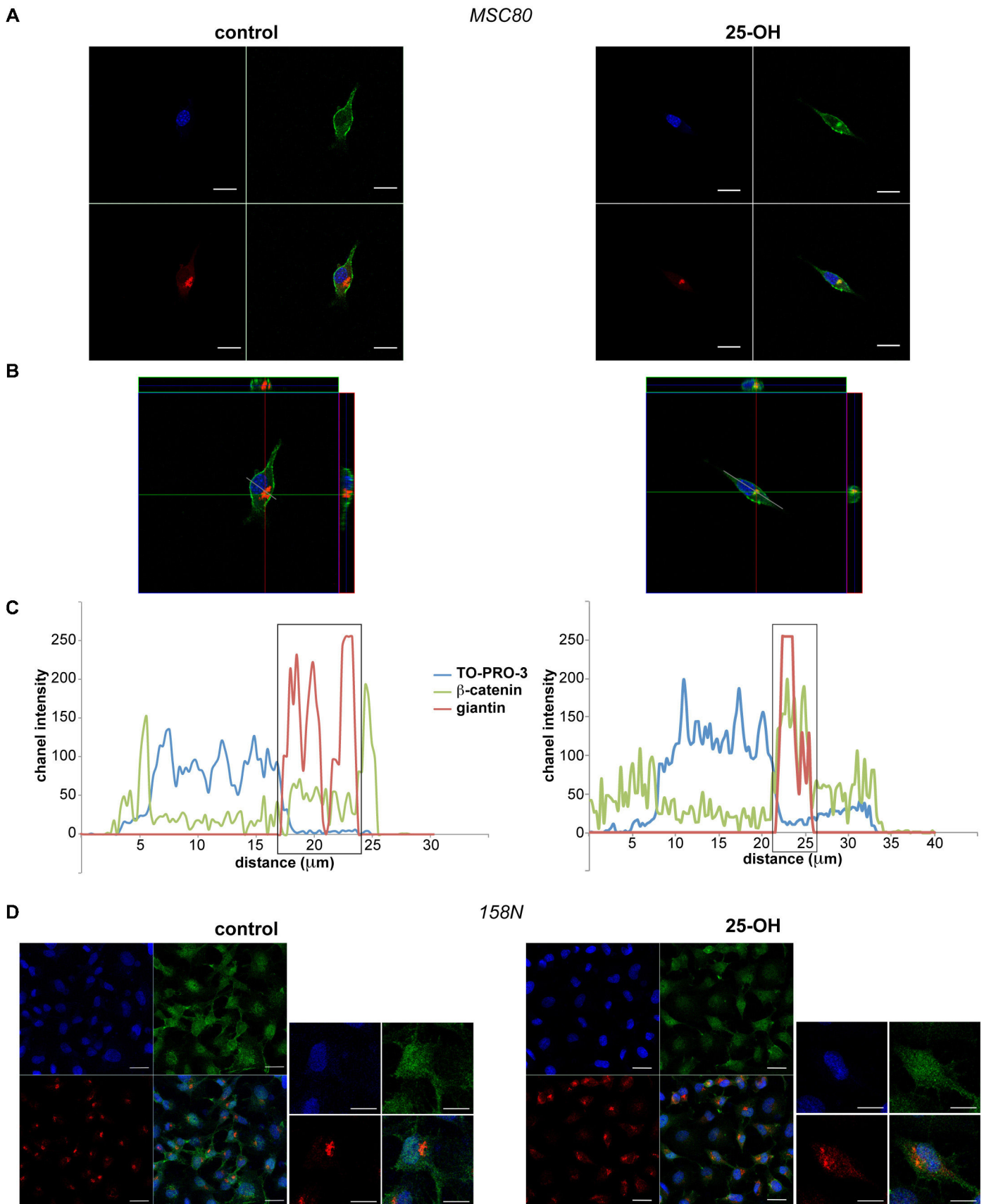


Fig. 4. Subcellular localization of beta-catenin by immunocytochemistry in Schwann cells and oligodendrocytes. (A) MSC80 cells or (D) 158 N cells were incubated with ethanol (vehicle) or in the presence of 25-OH (10 μ M) for 24 h. Beta-catenin (Alexa 488, green), giantin (Cyanin3, red) and the nuclei (TO-PRO-3, blue) were recognized by specific antibodies and detected by fluorochrome-coupled secondary antibodies. The slides were analyzed with a confocal microscope. This experiment was repeated 4 times, and a typical experiment is presented here. Irrelevant antibodies from the same family of immunoglobulin were used as controls for non-specific staining (not shown). (B) The orthogonal view was performed using the LSM 510 software off-line as described in Section 2. (C) The channel fluorescence intensity was quantified using the LSM 510 software off-line software as described in Section 2.

and stimulated the expression of myelin genes MPZ and PMP22. In the brain, the invalidation of LXR repressed those genes. How could we explain this discrepancy?

We have demonstrated that oxysterols establish a complex dialog with the Wnt/beta-catenin pathway in myelinating glial cells. Wnt is essential for the development of the nervous system. It is activated very early during the development to initiate very complex programs like gliogenesis and neurogenesis. A main question occurs: how could this pathway be regulated to trigger these different programs? In this article we have shown that oxysterols are able to differentially modulate the expression of the major components of Wnt/beta-catenin pathway. In oligodendrocytes, oxysterols enhance the expression of the transcripts of Disheveled, beta-catenin and the transcription factor TCF3, while in the PNS oxysterols exert an inhibitory effect toward Wnt components [42].

We had an interesting observation concerning beta-catenin in 158 N cells. While 25-OH activates beta-catenin mRNA, it inhibits its protein. Moreover, the knock-out of LXR inhibits the expression of the transcript of beta-catenin in the brain, but activates its protein expression. This discrepancy could be either due to: (i) a post-translational modification of beta-catenin protein by 25-OH/LXR pathway, (ii) to a negative feed-back due to an excess of beta-catenin or (iii) to the recruitment of beta-catenin by another pathway than Wnt. As a matter of fact, beta-catenin is recruited by several pathways (i.e. Akt [43], glucocorticoid pathway [44], Androgen receptor...). A negative cross-talk between LXR and beta-catenin was described in colon cancer. In those cells, LXR binds directly to the Armadillo repeat region of beta-catenin and inhibits its action, while beta-catenin potentiates LXR transcriptional activity [45].

We previously described a profound modification of 158 N cells after an incubation with 25-OH [8,46]. The latter provoked the apoptosis of 158 N cells while it did not have any apoptotic effect on MSC80 cells. Furthermore, the decrease in the expression of beta-catenin, paralleling the loss of adherens junction complex, could explain this morphological modification. This phenomenon was described in mammary cancer cells (MCF7 cells) incubated with 27-OH [47].

We also found an unusual localization of beta-catenin in the Golgi apparatus in Schwann cells but not in oligodendrocyte. The presence of beta-catenin in the Golgi apparatus could be a prerequisite for its post-translational modification (e.g. glycosylation). It is well known that the phosphorylation of beta-catenin controls its intracellular levels. Few data show that O-GlcNAc glycosylation of beta-catenin negatively regulates its levels in the nucleus in prostate cells [48]. We speculate that the presence of beta-catenin in the Golgi apparatus of Schwann cells participates to the inhibition of Wnt pathway by preventing the presence of beta-catenin in the nucleus to regulate peripheral myelin genes expression. Another coactivator, SRC-3, had also an unusual localization in the Golgi apparatus of astrocytes [49].

In conclusion, Wnt pathway is inhibited by LXR in Schwann cells on different levels: down regulation of Wnt components and re-localization of beta-catenin in the Golgi apparatus; whilst in oligodendrocytes, oxysterols stimulated Wnt components. This differential effect of LXR on Wnt pathway impacts myelin gene expression. Consequently, the complex and delicate cross-talk between oxysterols and Wnt pathway allows the fine-tuning of the expression of myelin genes in Schwann cells and oligodendrocytes.

Acknowledgments

This work was funded by Inserm, Cnrs, University Paris Descartes, the Association Française contre les Myopathies (AFM) and the Association pour la Recherche contre la Sclérose En Plaques (ARSEP). JM and GGS, received PhD fellowships from

the french Ministry of Research (MNRT). We would like to thank Clément Carré for comments and discussion on the manuscript, and Jean-Maurice Petit for his assistance for the confocal microscopy performed on the SCM platform.

References

- [1] Russell DW. Oxysterol biosynthetic enzymes. *Biochim Biophys Acta* 2000;1529:126–35.
- [2] Lutjohann D, Papassotiropoulos A, Bjorkhem I, Locatelli S, Bagli M, Oehring RD, et al. Plasma 24S-hydroxycholesterol (cerebrosterol) is increased in Alzheimer and vascular demented patients. *J Lipid Res* 2000;41:195–8.
- [3] Teunissen CE, Dijkstra CD, Polman CH, Hoogervorst EL, von Bergmann K, Lutjohann D. Decreased levels of the brain specific 24S-hydroxycholesterol and cholesterol precursors in serum of multiple sclerosis patients. *Neurosci Lett* 2003;347:159–62.
- [4] Papassotiropoulos A, Lutjohann D, Bagli M, Locatelli S, Jessen F, Buschfort R, et al. 24S-hydroxycholesterol in cerebrospinal fluid is elevated in early stages of dementia. *J Psychiatr Res* 2002;36:27–32.
- [5] Papassotiropoulos A, Lutjohann D, Bagli M, Locatelli S, Jessen F, Rao ML, et al. Plasma 24S-hydroxycholesterol: a peripheral indicator of neuronal degeneration and potential state marker for Alzheimer's disease. *Neuroreport* 2000;11:1959–62.
- [6] Leoni V, Masterman T, Diczfalussy U, De Luca G, Hillert J, Bjorkhem I. Changes in human plasma levels of the brain specific oxysterol 24S-hydroxycholesterol during progression of multiple sclerosis. *Neurosci Lett* 2002;331:163–6.
- [7] Bochelen D, Mersel M, Behr P, Lutz P, Kupferberg A. Effect of oxysterol treatment on cholesterol biosynthesis and reactive astrocyte proliferation in injured rat brain cortex. *J Neurochem* 1995;65:2194–200.
- [8] Trousson A, Bernard S, Petit PX, Liere P, Pianos A, El Hadri K et al., 25-hydroxycholesterol provokes oligodendrocyte cell line apoptosis and stimulates the secreted phospholipase A2 type IIA via LXR beta and PXR. *J Neurochem* 2009;109:945–58.
- [9] Janowski BA, Willy PJ, Devi TR, Falck JR, Mangelsdorf DJ. An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha. *Nature* 1996;383:728–31.
- [10] Willy PJ, Mangelsdorf DJ. Unique requirements for retinoid-dependent transcriptional activation by the orphan receptor LXR. *Genes Dev* 1997;11:289–98.
- [11] Nelissen K, Mulder M, Smets I, Timmermans S, Smeets K, Ameloot M, et al. Liver X receptors regulate cholesterol homeostasis in oligodendrocytes. *J Neurosci Res* 2012;90:60–71.
- [12] Wang L, Schuster GU, Hulthenby K, Zhang Q, Andersson S, Liver Gustafsson JA. X receptors in the central nervous system: from lipid homeostasis to neuronal degeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:13878–83.
- [13] French-Constant C, Colognato H, Franklin RJ. Neuroscience. The mysteries of myelin unwrapped. *Science* 2004;304:688–9.
- [14] Jessen KR, Mirsky R. The origin and development of glial cells in peripheral nerves. *Nat Rev Neurosci* 2005;6:671–82.
- [15] Niemann A, Berger P, Suter U. Pathomechanisms of mutant proteins in Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuromol Med* 2006;8:217–42.
- [16] De Gasperi R, Gama Sosa MA, Naumowicz Z, Hof PR, Notterpek L, Davis KL, et al. Peripheral myelin protein-22 is expressed in Cns myelin. *Transl Neurosci* 2010;1:282–5.
- [17] Kilfoyle DH, Dyck PJ, Wu Y, Litchy WJ, Klein DM, Kumar N, et al. Myelin protein zero mutation His39Pro: hereditary motor and sensory neuropathy with variable onset, hearing loss, restless legs and multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2006;77:963–6.
- [18] Reyes-Marin K, Jimenez-Pancho J, Pozo L, Garcia-Villanueva M, de Blas G, Vazquez JM, et al. A novel myelin protein zero (V136G) homozygous mutation causing late onset demyelinating polyneuropathy with brain white matter lesions. *Clin Neurol Neurosurg* 2011;113:243–4.
- [19] Roa BB, Greenberg F, Gunaratne P, Sauer CM, Lubinsky MS, Kozma C, et al. Duplication of the PMP22 gene in 17p partial trisomy patients with Charcot-Marie-Tooth type-1 neuropathy. *Hum Genet* 1996;97:642–9.
- [20] Roa BB, Warner LE, Garcia CA, Russo D, Lovelace R, Chance PF, et al. Myelin protein zero (MPZ) gene mutations in nonduplication type 1 Charcot-Marie-Tooth disease. *Hum Mutat* 1996;7:36–45.
- [21] Desarnaud F, Bidichandani S, Patel PI, Baulieu EE, Schumacher M. Glucocorticosteroids stimulate the activity of the promoters of peripheral myelin protein-22 and protein zero genes in Schwann cells. *Brain Res* 2000;865:12–6.
- [22] Tawk M, Makoukji J, Belle M, Fonte C, Trousson A, Hawkins T, et al. Wnt/beta-catenin signaling is an essential and direct driver of myelin gene expression and myelinogenesis. *J Neurosci* 2011;31:3729–42.
- [23] Gao X, Arlotta P, Macklis JD, Chen J. Conditional knock-out of beta-catenin in postnatal-born dentate gyrus granule neurons results in dendritic malformation. *J Neurosci* 2007;27:14317–25.
- [24] Lee HY, Kleber M, Hari L, Brault V, Suter U, Taketo MM, et al. Instructive role of Wnt/beta-catenin in sensory fate specification in neural crest stem cells. *Science* 2004;303:1020–3.
- [25] Salinas PC, Zou Y. Wnt signaling in neural circuit assembly. *Annu Rev Neurosci* 2008;31:339–58.
- [26] Lai SL, Chien AJ, Moon RT. Wnt/Fz signaling and the cytoskeleton: potential roles in tumorigenesis. *Cell Res* 2009;19:532–45.

- [27] Brown AM, Lemke G. Multiple regulatory elements control transcription of the peripheral myelin protein zero gene. *J Biol Chem* 1997;272:28939–47.
- [28] Hai M, Bidichandani SI, Patel PI. Identification of a positive regulatory element in the myelin-specific promoter of the PMP22 gene. *J Neurosci Res* 2001;65:508–19.
- [29] Massaad C, Paradon M, Jacques C, Salvat C, Bereziat G, Berenbaum F, et al. Induction of secreted type IIA phospholipase A2 gene transcription by interleukin-1beta. Role of C/EBP factors. *J Biol Chem* 2000;275:22686–94.
- [30] Cummins CL, Liver Mangelsdorf DJ. X receptors and cholesterol homeostasis: spotlight on the adrenal gland. *Biochem Soc Trans* 2006;34:1110–3.
- [31] Liere P, Pianos A, Eychenne B, Cambourg A, Liu S, Griffiths W, et al. Novel lipoidal derivatives of pregnenolone and dehydroepiandrosterone and absence of their sulfated counterparts in rodent brain. *J Lipid Res* 2004;45:2287–302.
- [32] Liere P, Akwa Y, Weill-Engerer S, Eychenne B, Pianos A, Robel P, et al. Validation of an analytical procedure to measure trace amounts of neurosteroids in brain tissue by gas chromatography–mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2000;739:301–12.
- [33] Brown AJ, Oxysterols Jessup W. Sources, cellular storage and metabolism, and new insights into their roles in cholesterol homeostasis. *Mol Aspects Med* 2009;30:111–22.
- [34] Leoni V, Caccia C. Oxysterols as biomarkers in neurodegenerative diseases. *Chem Phys Lipids* 2011;164:515–24.
- [35] Hudry E, Van Dam D, Kulik W, De Deyn PP, Stet FS, Ahouansou O, et al. Adeno-associated virus gene therapy with cholesterol 24-hydroxylase reduces the amyloid pathology before or after the onset of amyloid plaques in mouse models of Alzheimer's disease. *Mol Ther* 2010;18:44–53.
- [36] Andersson S, Gustafsson N, Warner M, Gustafsson JA. Inactivation of liver X receptor beta leads to adult-onset motor neuron degeneration in male mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:3857–62.
- [37] Jakobsson T, Treuter E, Gustafsson JA, Liver Steffensen KR. X receptor biology and pharmacology: new pathways, challenges and opportunities. *Trends Pharmacol Sci* 2012;33:394–404.
- [38] Dai YB, Tan XJ, Wu WF, Warner M, Liver Gustafsson JA. X receptor beta protects dopaminergic neurons in a mouse model of Parkinson disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012;109:13112–17.
- [39] Cheng O, Ostrowski RP, Liu W, Zhang JH. Activation of liver X receptor reduces global ischemic brain injury by reduction of nuclear factor-kappaB. *Neuroscience* 2010;166:1101–9.
- [40] Loane DJ, Washington PM, Vardanian L, Pociavsek A, Hoe HS, Duff KE, et al. Modulation of ABCA1 by an LXR agonist reduces beta-amyloid levels and improves outcome after traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 2011;28:225–36.
- [41] Paterniti I, Genovese T, Mazzone E, Crisafulli C, Di Paola R, Galuppo M, et al. Liver X receptor agonist treatment regulates inflammatory response after spinal cord trauma. *J Neurochem* 2010;112:611–24.
- [42] Makoukji J, Shackleford G, Meffre D, Grenier J, Liere P, Lobaccaro JM, et al. Interplay between LXR and Wnt/beta-catenin signaling in the negative regulation of peripheral myelin genes by oxysterols. *J Neurosci* 2011;31:9620–9.
- [43] Beaulieu JM, Sotnikova TD, Yao WD, Kockeritz L, Woodgett JR, Gainetdinov RR, et al. Lithium antagonizes dopamine-dependent behaviors mediated by an AKT/glycogen synthase kinase 3 signaling cascade. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:5099–104.
- [44] Fonte C, Grenier J, Trousson A, Chauchereau A, Lahuna O, Baulieu EE, et al. Involvement of {beta}-catenin and unusual behavior of CBP and p300 in glucocorticosteroid signaling in Schwann cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:14260–65.
- [45] Uno S, Endo K, Jeong Y, Kawana K, Miyachi H, Hashimoto Y, et al. Suppression of beta-catenin signaling by liver X receptor ligands. *Biochem Pharmacol* 2009;77:186–95.
- [46] Trousson A, Makoukji J, Petit PX, Bernard S, Slomianny C, Schumacher M, et al. Cross-talk between oxysterols and glucocorticoids: differential regulation of secreted phospholipase A2 and impact on oligodendrocyte death. *PLoS ONE* 2009;4:e8080.
- [47] Torres CG, Ramirez ME, Cruz P, Epanan MJ, Valladares LE, Sierralta WD. 27-hydroxycholesterol induces the transition of MCF7 cells into a mesenchymal phenotype. *Oncol Rep* 2011;26:389–97.
- [48] Sayat R, Leber B, Grubac V, Wiltshire L, Persad S. O-GlcNAc-glycosylation of beta-catenin regulates its nuclear localization and transcriptional activity. *Exp Cell Res* 2008;314:2774–87.
- [49] Grenier J, Trousson A, Chauchereau A, Cartaud J, Schumacher M, Massaad C. Differential recruitment of p160 coactivators by glucocorticoid receptor between Schwann cells and astrocytes. *Mol Endocrinol* 2006;20:254–67.

Implication du corégulateur RIP140 dans la myélinisation

I- Introduction

La myéline est une adaptation évolutive majeure des vertébrés permettant une propagation rapide du potentiel d'action. Cette gaine entourant les axones est synthétisée par les cellules de Schwann (CS) dans le système nerveux périphérique (SNP) et par les oligodendrocytes (OL) dans le système nerveux central (SNC). Sa structure et ses constituants sont assez bien déterminés aujourd'hui. Cependant les signaux intervenant dans sa mise en place le sont beaucoup moins. Cela tient en partie du fait de la complexité de la myélinisation nécessitant de façon coordonnée l'activation et la répression de nombreuses voies de signalisation. Dans les années passées, de nombreuses études ont montré l'importance des récepteurs nucléaires (RN) dans ce processus (e.g. GR (Désarnaud et al., 2000), PR (Koenig et al., 1995) (Sereda et al., 2003), RXR et RAR (Latasa et al., 2010), TR (Mercier et al., 2001), AR (Melcangi et al., 2011), LXR (Makoukji et al., 2011)). Cependant, ces RN ont besoin des corégulateurs de la transcription pour exercer leurs actions.

RIP140 est un corégulateur transcriptionnel ayant la particularité d'être à la fois activateur et inhibiteur selon le contexte cellulaire. Il possède 9 domaines de liaison aux RN, les NR box, ce qui lui confère une grande capacité d'interaction avec les RN (Heery et al., 1997). Tous les RN mentionnés ci-dessus ont été montré comme interagissant avec RIP140 (L'Horset et al., 1996) (Subramaniam et al., 1999) (Ikonen et al., 1997) (Miyata et al., 1998).

Chez l'homme, le gène codant pour RIP140 est localisé sur le chromosome 21. Le syndrome de Down est causé par la présence surnuméraire de ce chromosome. Chez les patients souffrant de cette trisomie, la myélinisation de l'hippocampe est retardée et l'expression de MBP est diminuée (Ábrahám et al., 2012). De manière intéressante,

l'expression de RIP140 chez les individus souffrant de trisomie 21 est augmentée dans cette région cérébrale (Gardiner, 2006)

Le poisson zèbre est un modèle reconnu dans l'étude de la myélinisation (Monk and Talbot, 2009). Ces vertébrés expriment 2 isoformes de RIP140 : nRIP1a et nRIP1b. nRIP1a est exprimé dans le nerf de la ligne latérale postérieure PLLn et le SNC (Thisse et al, 2008, ZFIN database).

Objectifs :

Le rôle physiologique de RIP140 dans le système nerveux est mal connu. Un seul article montre des déficits comportementaux ou cognitifs en cas d'invalidation (Duclot et al., 2012). Aucune donnée n'est disponible en ce qui concerne le rôle de RIP140 dans le nerf et la cellule de Schwann.

Etant donné la forte participation des récepteurs nucléaires (PR, GR, AR, LXR....) dans la myélinisation, et l'implication de RIP140 dans les mécanismes d'action de ces récepteurs, nous avons voulu étudier le rôle de RIP140 dans le système nerveux périphérique. Par exemple, les effets répresseurs du LXR sur l'expression des gènes de la myéline périphérique pourraient être relayés par RIP140.

Quel est rôle endogène dans la myélinisation in vivo et in vitro?

II. Matériels et Méthodes

Poisson zèbre

Pour cette étude, nous avons utilisé les lignées de poissons zèbre : wild type (WT), transgénique (Tg) (MBP :EGFP) qui exprime une forme la GFP sous le contrôle de la MBP

(Almeida et al., 2011), Tg(Foxd3 ::GFP) (Gilmour et al., 2002) qui permet de localiser les cellules de Schwann grâce à la fluorescence verte de la GFP. Tous les animaux ont été traités dans les règles des protocoles standards.

Culture cellulaire

La lignée cellulaire de Schwann de souris MSC80 a été maintenue et cultivée dans le milieu DMEM (Dulbecco's minimal essential medium) auquel a été ajouté 10% de serum de veau décomplémenté (Hyclone-Perbio), 1% de pénicilline(Gibco), 1% de streptomycine (Gibco), 1% de glutamine (Gibco) et 0.2% de fongizone (Gibco). Ces cultures cellulaires ont été maintenues dans une atmosphère humide à 37°C avec 5% de CO₂.

Injection de l'oligomorpholino dirigé contre nRIP1a

Nous avons injecté les embryons de poissons zèbres aux stades 1 ou 2 cellules avec 600 pg d'oligomorpholinos dirigés contre nRIP1a (*MoRIP1a*) (Gene tools) afin de diminuer l'expression de nRIP1a. Nous avons utilisé comme contrôles des embryons non injectés (N.I) ou injectés au même stade avec l'oligomorpholino dirigé contre nRIP1a muté pour 5 bases (5Miss RIP1a).

MoRIP1a : GGCCAGGCTCTTCCCCATGAGTCAT

Miss5 RIP1a : GGCGACGCTGTTCCCGATCAGTCAT

Plasmides

Le plasmide P0-luc nous a été généreusement donné par le Dr G. Lemke (San Diego, USA), PMP22-luc par le Dr P. Patel (Houston, USA) et le vecteur d'expression RIP140 par le Dr V. Cavallès (Montpellier). Le siARN dirigé contre RIP140 a été acheté chez Dharmacon (*onTarget plus siRNA*). Le transcrit RIP140 a été ciblé dans quatre régions différentes par quatre siARN différents :

- Séquence cible 1 : UGUCUUAACUUACCUCGAA
- Séquence cible 2 : CAUCGUGAAUUUAAAACGUA
- Séquence cible 3 : GUCAUGUGCUGCAAGAUUA
- Séquence cible 4 : GCAGGAAUGAGCUCGAUUA

Les cellules ont été transfectées par le mix obtenu à partir de ces 4 séquences cibles.

Transfections transitoires

Les MSC80 ont été transitoirement transfectées grâce au réactif Effecten (QIAGEN). Un jour avant la transfection, les MSC80 ont été repiquées (1.5×10^5 de cellules par puits pour le vecteur d'expression et à 2.5×10^5 cellules par puits pour les expériences avec le siARN) dans une plaque 6 puits dans les conditions de cultures classiques. Le plasmide P0-luc ou PMP22-luc (0.2 μg pour les expériences avec le vecteur d'expression et 0.4 μg pour les expériences de siARN), le plasmide d'expression CMV- β Galactosidase (0.1 μg), le vecteur d'expression RIP140 (0.2 μg) et le siARN dirigé contre RIP140 (50pmol) ont été mélangés avec une solution contenant le réactif Effecten (0.85 mg/ml) dans du DMEM. Les cellules ont été induites par ce mélange et incubées sur la nuit. 16 heures après la transfection, le milieu de culture a été remplacé par du DMEM contenant ou ne contenant pas de l'éthanol ou du 25OH (10^{-5}M). 24 heures après, les cellules ont été lysées et l'activité luciférase a été déterminée en utilisant la méthode enzymatique décrite dans (Massaad et al., 2000). L'activité β Galactosidase a été utilisée pour normaliser les résultats.

Expériences de PCR en temps réel

Les ARN totaux de la queue d'embryons de 3dpf et des MSC80 ont été extraits grâce au Trizol (Invitrogen). 1 μg de ces ARN ont été rétrotranscrits en utilisant des séquences aléatoires Promega et la reverse transcriptase M-MLV-RT (Invitrogen).

La PCR en temps réel a été réalisée en suivant le protocole standard avec le colorant fluorescent SYBR Green ROX Mix (ABgene) et l'appareil ABI PRISM 7000.

Les séquences utilisées sont les suivantes :

| | |
|--|--------------------------------------|
| EF1a F: 5' CTTCTCAGGCTGACTGTGC 3' | 26s R: 5'-GCGCAAGCAGGTCTGAATCGTG -3' |
| EF1a R: 5' CCGCTAGCATTACCCTCC 3 | P0 F: 5'-GTCAAGTCCCCCAGTAGAA-3' |
| MBP F: 5' TCCTCTCCTCGTCCTAAGTC 3' | P0 R: 5'-CTTGGCATAGTGGAAAATGCAAA-3' |
| MBP R: 5' TCCATCTCAGTGTTCCTG 3 | PMP22 F: 5'-AATGGACACACGACTGATC-3' |
| MPZ F: 5' TTCTCCCTCCATCTCTTCTC 3' | PMP22 R: 5'-CCTTTGGTGAGAGTGAAGAG-3' |
| MPZ R: 5' TTCTCCGAGTCTGTGTTTAC 3' | RIP140 F: 5'-CTTCCTTTCCCACATAGCAG-3' |
| 26s F: 5'-AGGAGAAACAACGGTCGTGCCAAAA-3' | RIP140 R: 5'-AGCCTCGCAACTTCCTTAG-3' |

Immunohistochimie

Les embryons à 4dpf ont été fixés entier avec du paraformaldehydes 4%. L'anticorps contre la tubuline acétylée (Sigma) a été dilué au 1/1000. Nous avons utilisé un anticorps secondaire anti-souris Alexa 568 (Sigma) dilué au 1/200.

Imagerie confocal

Les embryons à 4dpf ont été anesthésiés avec du tricaine et inclus dans 1.5% d'agarose à bas point de fusion (Sigma). Les images ont été réalisées grâce au microscope confocal Zeiss LSM510.

Microscopie électronique

A 5dpf, les embryons ont été fixés dans un mélange 4% paraformaldehyde et 2.5% gluteraldehyde (Sigma) dans un tampon sodium cacodilate 1% à pH 7.3. Après la post-fixation par l'osmium tetroxide 2% (Serva), les tissus ont été deshydratés et inclus dans une résine d'epon. Des coupes ultrafines (80-90nm) ont été effectuées environ 1mm avant la fin de l'extension du sac vitellin. Les coupes ont été contrastées avec de l'acétate d'uranyle et du

citrate de plomb avant d'être visualisées et photographiées par le microscope électronique JEOL jem-1011.

III. Résultats

A. nRIP1a active l'expression des gènes de la myéline dans le poisson zèbre

Chez le poisson zèbre, l'orthologue de MBP est exprimé dans les OL et les CS myélinisantes (Brösamle and Halpern, 2002) (Kazakova et al., 2006) (Lyons et al., 2009). Afin de visualiser aisément son expression nous avons utilisé la lignée poisson zèbre transgénique MBP::EGFP. Ces animaux expriment la EGFP (enhanced green fluorescent protein) sous le contrôle du promoteur MBP.

A 4dpf, 100% des embryons contrôles (non injecté (NI) ou injectés avec l'oligomorpholino contrôle (Miss5nRIP1a)) expriment l'EGFP dans la PLLn (flèches fines) et la moelle épinière (ME) (flèches épaisses). Cependant, à ce même stade du développement, l'inactivation de nRIP1a (*MoRIP1a*) par oligomorpholinos provoque, dans 90% des cas, une absence de signal EGFP dans la PLLn et la ME (**Figure 1A**).

Afin de confirmer ces résultats, nous avons ensuite analysé l'expression de *mbp* et *mpz* (*mpz* est spécifiquement exprimé par les OL) par RT-qPCR, à 3dpf. L'injection de *MoRIP1A* diminue de 40% l'expression de *mbp* (**Figure 1B**) par rapport aux témoins (WT et Miss5RIP1a) et de 60% celle de *mpz* (**Figure 1C**). Ces résultats suggèrent que nRIP1a est nécessaire à l'expression optimale de *mbp* et de *mpz* dans le SNP et le SNC du poisson zèbre.

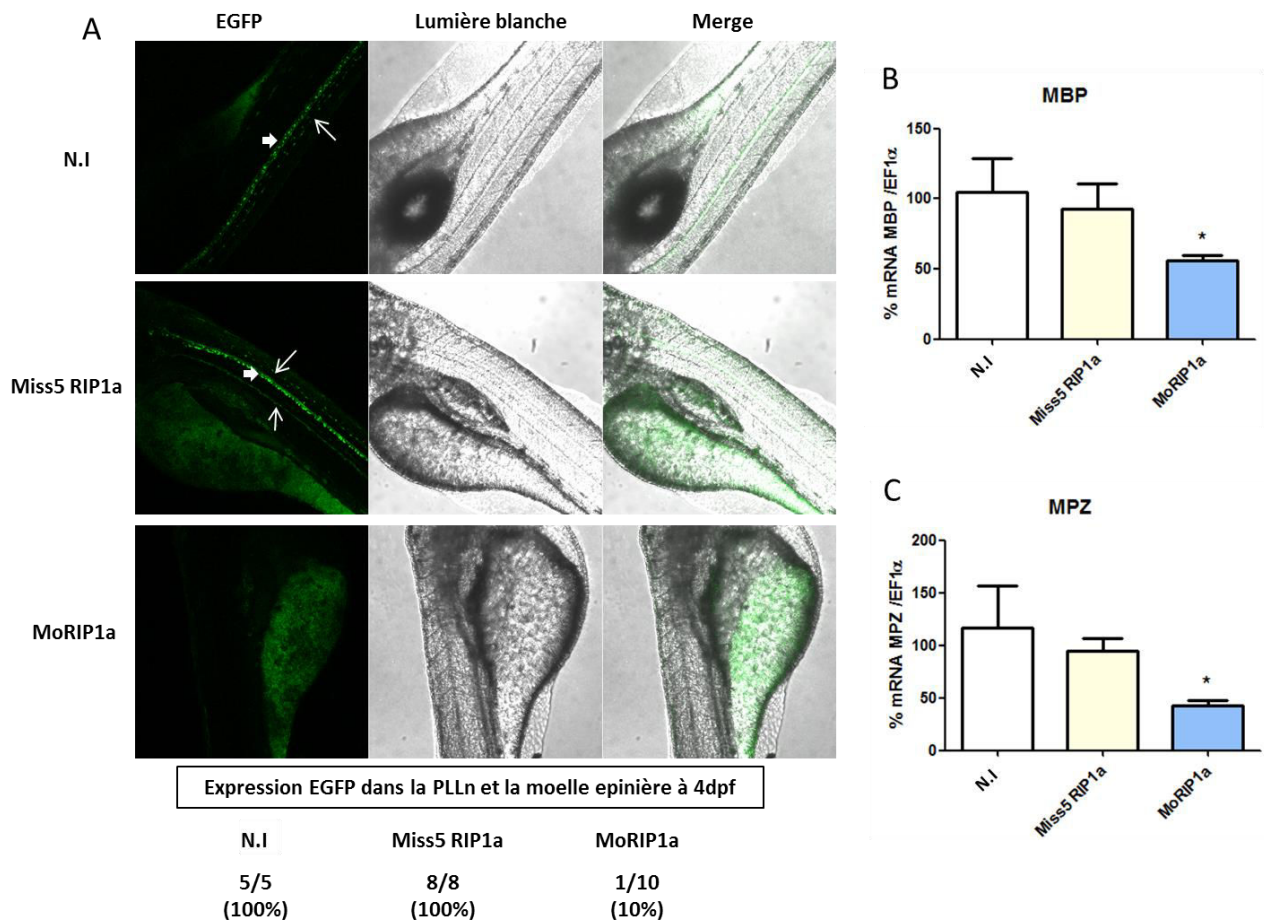


Figure 1 : Analyse de l'expression de gènes de la myéline après invalidation de nRIP1a. A) Vue latérale par image confocale (X10) de l'expression de EGFP sous le contrôle du promoteur de MBP chez les embryons 4dpf non injectés (NI) (n=5), injectés par l'oligomorpholino control (Miss5 RIP1a) (n=8) ou par l'oligomorpholino dirigé contre nRIP1a (MoRIP1a) (n=11). Les flèches fines indiquent la PLLn et les flèches épaisses la ME. B,C) Expression des transcrits *mbp* et *mpz* dans les queues d'embryons de 3dpf non injectés (NI) (n=3), injectés par l'oligomorpholino control (Miss5 RIP1a) (n=3) ou par l'oligomorpholino dirigé contre nRIP1a (MoRIP1a) (n=7). Chaque n comprend au moins 6 queues d'embryons. * $p < 0.05$ One-way ANOVA suivi de Newman-Keuls Multiple Comparison Test.

B. nRIP1a n'influe pas sur la mise en place des axones et des CS

La réduction de l'expression de *mbp*, après l'invalidation partielle de nRIP1a, pourrait résulter d'un défaut axonal ou schwannien. Afin de vérifier cela, nous avons marqué les axones avec un anticorps dirigé contre la tubuline acétylée. Aucune différence de ce marquage n'a été observée entre les contrôles et les MoRIP1a. Ceci semble indiquer que l'oligomorpholino dirigé contre nRip1a n'affecte pas les axones.

La lignée de poisson transgénique Foxd3 ::GFP exprime spécifiquement la GFP dans les CS après 24hpf (Gilmour et al., 2002). MoRIP1a, comparativement aux contrôles, ne provoque aucune différence dans le nombre et la migration des CS (**Figure 2**).

Ces résultats montrent que l'invalidation partielle de nRIP1a provoque une diminution de *mbp* sans affecter ni la présence des axones ni celle des CS.

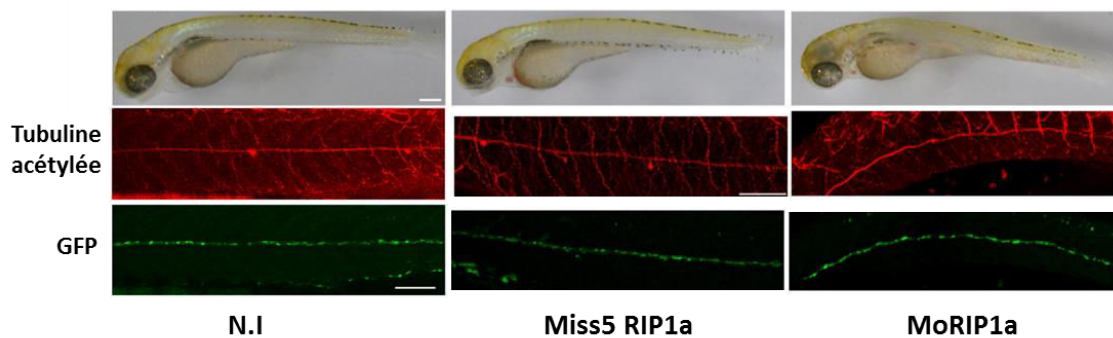


Figure 2 : Mise en évidence de la présence des CS et des axones de la PLLn après invalidation de l'expression de nRIP1a. Vue latérale par image confocale des axones de la PLLn exprimant l'acétyl tubuline et des CS marquées par la GFP dans la lignée d'embryons transgénique Foxd3 ::GFP à 4dpf non injectés (NI) (n=4), injectés par l'oligomorpholino control (Miss5 RIP1a) (n=4) ou par l'oligomorpholino dirigé contre nRIP1a (MoRIP1a) (n=4).

C. nRIP1a est important pour la formation de la gaine de myéline dans le SNP

Les résultats précédents indiquent que même si les CS invalidées partiellement pour nRIP1a se développent normalement, elles n'expriment peu ou pas les gènes de la myéline, suggérant leur arrêt au stade promyélinisant.

Nous avons ensuite étudié l'ultrastructure des nerfs de la PLLn par microscopie électronique à transmission. A 5dpf, la PLLn des poissons témoins est constituée de 10 à 11 axones. Ces derniers sont entourés d'une gaine de myéline compacte (n=3/3) (**Figure 3A**). En revanche, malgré la présence des CS, cette gaine est moins compacte chez les MoRIP1a. Les axones de ces animaux semblent être également moins nombreux (8) (n=2/3) (**Figure 3B**).

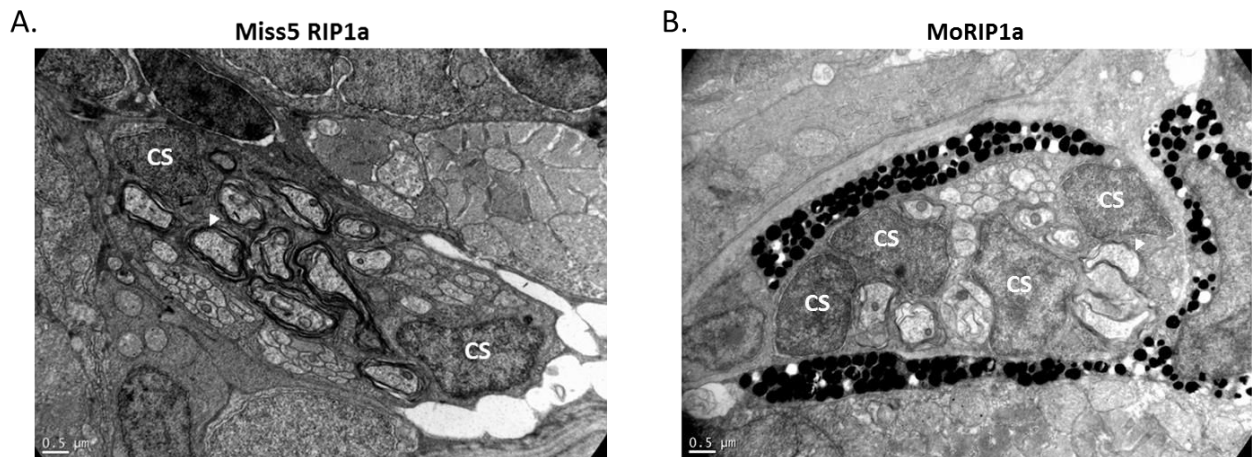


Figure 3 : Mise en évidence du défaut de myélinisation des axones de la PLLn des embryons invalidés pour *nRIP1a*. A) coupe transversale de la PLLn d'embryons 5dpf injectés par Miss5 RIP1a. Les axones sont entourés par une gaine de myéline compacte (n=3). B) coupe transversale de la PLLn d'embryons 5dpf injectés par MoRIP1a. Les CS sont présentes mais forment une gaine moins compacte autour des axones. Ces derniers semblent être moins nombreux (n=2/3).

D. Implication de RIP140 dans la répression des gènes de la myéline périphérique P0 et PMP22 dans les cellules de Schwann de souris in vitro

Afin d'étudier le rôle moléculaire de RIP140 sur l'expression des gènes de la myéline P0 et PMP22 dans les cellules de Schwann de souris, nous avons, dans un premier temps, invalidé l'expression de ce corégulateur transcriptionnel par un siARN (siRIP) dans la lignée schwannienne MSC80. Au préalable, nous avons vérifié son efficacité par des expériences de PCR en temps réel. Le siRIP diminue la quantité de transcrits RIP140 de 60 % (**Figure 4A**) en comparaison avec la transfection d'un siARN non relevant (non targeting-NT) prouvant ainsi son efficacité.

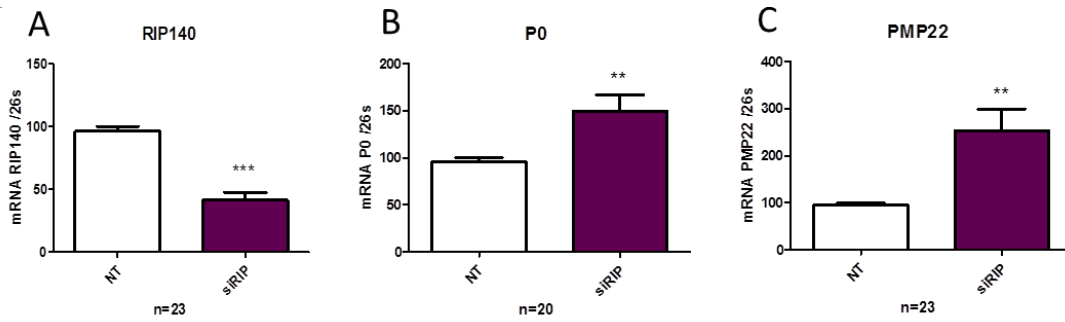


Figure 4: Impact de RIP140 sur la quantité de transcrits P0 et PMP22 dans les MSC80 in vitro. Analyse des transcrits par PCR en temps réel : Les cellules de Schwann (MSC80) ont été transfectées par les siRIP ou par un siARN non relevant (NT). Après extraction des ARNs totaux, une RT est réalisée, suivie d'une PCR en temps réel. Les résultats sont rapportés au 26S. 100% indique le taux de transcrit de RIP140, P0, PMP22 en l'absence de siRIP140. Ces résultats représentent la moyenne +/- SEM d'au moins 20 expériences. Nous avons utilisé comme test statistique le test t de Student, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Nous avons ensuite analysé les conséquences de l'inactivation de RIP140 sur l'expression des transcrits de P0 et PMP22. Après transfection des MSC80 avec le siRIP, nous constatons une augmentation de la quantité d'ARNm codant pour P0 et PMP22 respectivement de 50% et de 150% en comparaison avec la transfection d'un siARN non relevant (non targeting-NT) (**Figure 4B et 4C**).

RIP140 semble donc être impliqué dans la régulation négative de la quantité de transcrits codants pour les gènes de la myéline P0 et PMP22.

E. Implication de RIP140 dans l'activité des promoteurs de P0 et PMP22 in vitro

Nous avons ensuite étudié l'action de RIP140 sur l'activité transcriptionnelle des gènes de la myéline périphérique P0 et PMP22 en l'invalisant partiellement par des siRIP ou en le surexprimant grâce à un vecteur d'expression de RIP140.

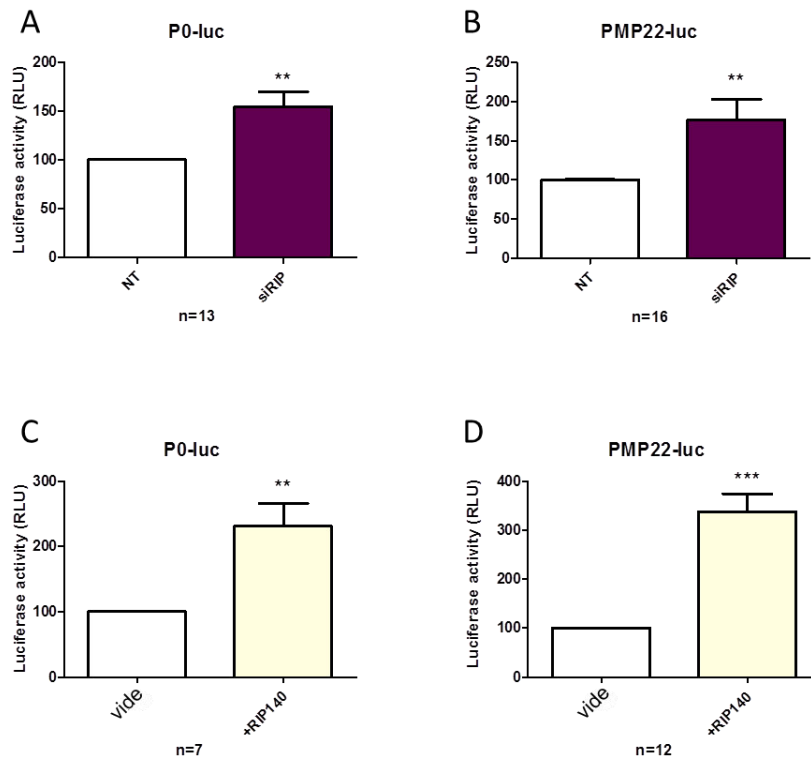


Figure 5: Rôle de RIP140 dans l'activité transcriptionnelle des gènes P0 et PMP22, dans les MSC80. Analyse de l'activité transcriptionnelle des promoteurs : Les cellules MSC80 sont transfectées avec un plasmide rapporteur luciférase (Luc) contenant soit le promoteur de P0 soit celui de PMP22. Les cellules sont ensuite récupérées et l'activité luciférase est mesurée. 100% indique la transactivation de P0 et PMP22 en l'absence de siRIP (NT, A et B) ou du plasmide d'expression RIP140 (vide, C et D). Ces résultats représentent la moyenne +/- SEM d'au moins 7 expériences en duplicate. Test statistique : test T de Student ** $P < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Après transfection du siRIP, nous observons une augmentation de l'activité basale des promoteurs des gènes P0 et PMP22 respectivement de 50% et de 70% en comparaison au siARN non relevant (NT) (**Figure 5A et 5B**).

Nous avons ensuite réalisé l'expérience inverse. Cependant, comme observé après invalidation de RIP140, la surexpression de RIP140 par un vecteur d'expression augmente de 2,2 fois l'activité transcriptionnelle du promoteur de P0 (**Figure 5C**) et de 3,1 fois celle du promoteur PMP22 (**Figure 5D**).

F. RIP140 ne participe pas à l'action répressive du 25OH exogène sur l'activité des promoteurs de P0 et PMP22 in vitro

Nous avons démontré dans notre premier article que le 25OH augmente la quantité des LXRs liés à leurs éléments de réponses sur les promoteurs de P0 et de PMP22, aboutissant à une répression l'activité transcriptionnelle de ces gènes. Ce mécanisme d'action est inédit car habituellement lorsque les oxystérols se lient à leurs récepteurs il y a rejet des corépresseurs et recrutement des coactivateurs afin d'activer la transcription des gènes cibles. RIP140 est un corégulateur capable de réprimer l'activité transcriptionnelle des gènes quand le récepteur nucléaire est activé par son ligand.

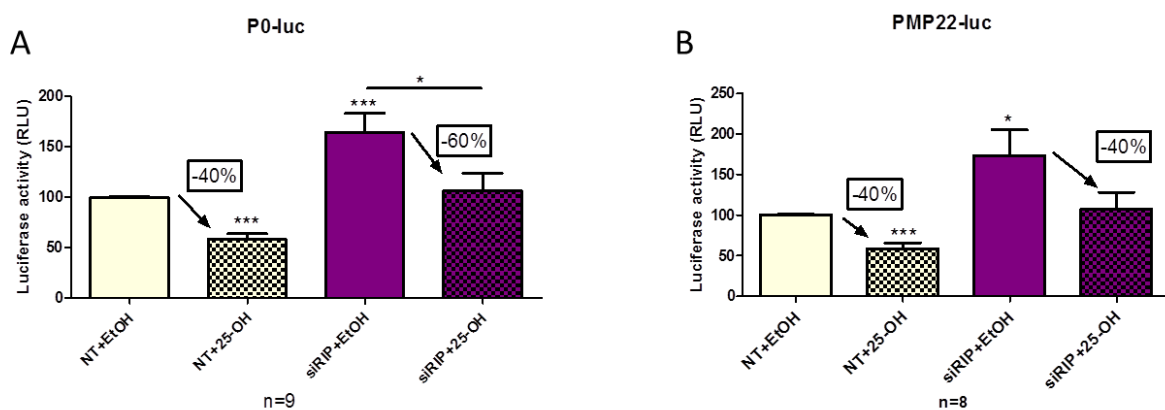


Figure 6 : Rip140 n'est pas impliqué dans la répression des gènes de la myéline par le 25OH. Analyse de l'activité transcriptionnelle des promoteurs P0 (A) et PMP22 (B) : Les cellules MSC80 sont transfectées avec un plasmide rapporteur luciférase (Luc) contenant soit le promoteur de P0 soit celui de PMP22 puis traitées par 10 μ M de 25OH ou de l'éthanol (EtOH) pendant 24h. Les cellules sont ensuite récupérées et l'activité luciférase est mesurée. Les résultats sont exprimés en % transactivation par rapport au témoin éthanol (NT+EtOH). Ces résultats représentent la moyenne +/- SEM d'au moins 8 expériences en duplicate. Test statistique : One-way ANOVA suivi d'un post test de Tuckey, * $P < 0.05$, *** $p < 0.001$.

Malgré l'invalidation de RIP140, le 25OH conserve son effet répresseur sur l'activité transcriptionnelle de P0 et de PMP22 (Figure 6A et 6B). Il semblerait donc que RIP140 ne soit pas impliqué dans l'action répressive des oxystérols endogènes sur les gènes de la myéline périphériques.

Malgré leurs discordances, ces résultats semblent confirmer l'implication de RIP140 dans la régulation transcriptionnelle des gènes de la myéline périphérique P0 et PMP22. **Cependant, nous pouvons nous interroger sur un effet bivalent de RIP140 dans cette régulation.** Comme nous l'avons précisé précédemment, RIP140 peut se comporter comme un corépresseur ou un coactivateur en fonction du contexte cellulaire. Son rôle endogène dans les cellules de Schwann suggère qu'il réprime les gènes de la myéline. L'invalidation de RIP140 ou des LXRs aboutit au même résultat : une levée de la répression de P0 et PMP22. Il est à noter que les cellules de Schwann contiennent et synthétisent les oxystérols. Même si RIP140 n'intervient pas dans la régulation des gènes de la myéline par les oxystérols exogènes, il pourrait être impliqué dans la répression de ces gènes par les quantités basales d'oxystérols. La surexpression de RIP140 entraîne une surexpression des gènes de la myéline. Ces effets seraient relayés par une voie de signalisation autre que celle des oxystérols endogènes/LXR.

IV. Conclusions

L'ensemble de nos résultats montrent que RIP140 est impliqué dans la myélinisation du système nerveux périphérique du poisson zèbre. Son invalidation inhibe l'expression des gènes de la myéline par les cellules de Schwann, sans altérer le nombre de cellules de Schwann, aboutissant à la formation d'une gaine de myéline moins compacte. Dans les cellules de Schwann de souris, l'invalidation de RIP140 altère aussi l'expression gènes de la myéline, mais dans un sens inverse à celui observé chez le poisson zèbre.

Nous devons maintenant identifier la ou les voies de sigalisation interragsissant avec RIP140 dans la régulation de la myélinisation.

Aryl Hydrocarbon Receptor is crucial for myelination process

Ghjuvan'Ghjacumu Shackleford¹, Mehdi Hichor, Loudmila Juricek, Aline Chevalier, Xavier Coumoul, Mathieu Beraneck and Charbel Massaad¹

Article en préparation

Avant-propos

AhR est un facteur de transcription appartenant à la famille des protéines à domaine PAS (Per/ARNT/SIM). Ces dernières sont impliquées dans la perception de l'environnement (lumière, oxygène) et dans les réponses cellulaires en découlant (rythme circadien, régulation de l'hypoxie).

Depuis sa découverte dans les années 70, AhR est surtout connu pour être le récepteur aux polluants environnementaux dont les plus connus sont les dioxines. A l'heure actuelle, très peu de ligands endogènes ont été associés au AhR (dérivés du tryptophane, FICZ, 7KC...).

L'implication propre du AhR dans la myélinisation est inconnue. Les seules études publiées à ce jour ont été réalisées en présence de la TCDD. En 2010, Fernandez et al ont montré que la descendance de rattes traitées par 0.7 µg/Kg de TCDD (per os) présentait un défaut dans la différenciation oligodendrocytaire. Le cervelet de ces rats présentait une augmentation de la population d'OPCs (PDGFRa+) et une diminution du nombre d'oligodendrocytes myélinisants (MBP+). Dans le SNP, l'injection intra-péritonéal de TCDD (8.8 µg/kg) provoque une altération très marquée des gaines de myéline et une souffrance axonale. La VCN de ces rats s'en trouve diminuée (Grhel et al 1993). D'autres études épidémiologiques réalisées suite à des contaminations humaines par les ligands du AhR (ouvriers d'usines d'engrais, huile de riz contaminée par les PCBs ou accident de Seveso) indiquent également des signes cliniques ou subcliniques de polyneuropathies périphériques.

D'un point de vue évolutif, AhR est une protéine ancienne. Elle est exprimée chez les invertébrés (et les cnidaires). Mais contrairement à celui des vertébrés, le AhR des invertébrés est incapable de lier des ligands exogènes (on ne lui connaît cependant toujours pas de ligands

endogènes). Les études réalisées chez la drosophile et le nématode ont montré son importance physiologique, notamment dans l'arborisation dendritique des neurones sensitifs du SNP de la drosophile et des motoneurones (RME) du nématode.

Nos objectifs étaient les suivant :

Le rôle endogène du AhR dans le système nerveux est mal connu. Les résultats publiés sont souvent extrapolés à partir d'une intoxication par la dioxine qui pourrait détourner le AhR de sa fonction propre en remplaçant son (ses) ligand(s) endogène(s). En d'autres termes, l'image que nous avons actuellement du rôle du AhR serait erronée : elle ressemblerait à l'étude de la fonction et du mécanisme d'action du récepteur aux oestrogènes activé par un xénoestrogène comme le DDT ou le distilbène (diéthylstilbestrol). Très peu de données sont disponibles en ce qui concerne le rôle du AhR dans le nerf et la cellule de Schwann.

Les buts de notre étude sont de savoir si :

1. Le AhR est-il exprimé dans le nerf ?
2. Quel est son rôle endogène dans la myélinisation in vivo et in vitro ?
3. Par quel mécanisme régule-t-il les gènes de la myéline ?
4. Quel est l'impact de la Dioxine sur la myélinisation ?

Aryl Hydrocarbon Receptor is crucial for myelination process

Ghjuvan'Ghjacumu Shackleford¹, Mehdi Hichor, Loudmila Juricek, Aline

Chevalier, Xavier Coumoul, Mathieu Beraneck and Charbel Massaad¹

² University Paris Descartes, UMR 1124 Inserm , 45 rue des Saints-Pères, 75270, Paris Cedex 6, France

Address correspondance to : Pr Charbel MASSAAD, University Paris Descartes, UMR 1124 Inserm , 45 rue des Saints-Pères, 75270, Paris Cedex 6, France Phone/Fax : 33 1 42 86 22 22. E-mail : charbel.massaad@parisdescartes.fr

Running title: AhR signalling in Schwann cells

Keywords: myelination, AhR, TCDD, Wnt/ β -catenin signaling, myelin genes, Schwann cells

Acknowledgments:

This work was funded by Inserm, Cnrs, University Paris Descartes, the Agence National pour la Recherche (ANR) and the Association Française contre les Myopathies (AFM). MH, LJ, AC and GGS, received PhD fellowships from the French Ministry of Research (MNRT). The authors greatly acknowledge Dr Alain Schmitt of the Cochin Imaging Facility.

Keywords: AhR, oxysterol, Schwann cells, peripheral myelin genes, myelination, Wnt/beta-catenin pathway.

Abstract

The Aryl hydrocarbon receptor (AhR) is a ligand-activated transcription factor known to interact with environmental pollutant like dioxins, PCBs (polychlorobiphenyls) to mediate their toxic and carcinogenic effect. However, its detoxifying activity is posterior to the apparition of the gene. Recent studies in *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila melanogaster* show that the orthologs of the AhR are expressed exclusively in certain types of neurons and are implicated in the development and the homeostasis of the central and peripheral nervous system. While physiological roles of the AhR were demonstrated in the mammalian heart, liver and in gametogenesis, its functions in nervous system and especially in the nerve remain elusive. Here, we report that the constitutive absence of the AhR in adult mice (AhR^{-/-}) leads to defect in locomotion behaviors. We studied the impact of this invalidation on the myelin of the sciatic nerve. We observed a severe demyelinating phenotype (disorganized and thinner myelin sheaths) and deregulation of myelin genes expression. Moreover, we demonstrated a cross-talk between AhR and Wnt/ β -catenin pathways. Our data reveal new endogenous role of AhR in regulation of myelination process.

Introduction

The myelination of axons is a complex process carried out by Schwann cells in the peripheral nervous system (PNS) (Garbay et al., 2000). Peripheral myelin genes Myelin Protein Zero (MPZ) and Peripheral Myelin Protein-22 (PMP22) expression is tightly regulated in Schwann cells (Niemann et al., 2006). A slight change in PMP22 or MPZ expression has a deep impact on the development and preservation of nerve fibers and their myelin sheaths, as observed in Charcot-Marie-Tooth disease (Roa et al., 1996a) (Roa et al., 1996b). Few cellular signals are known to directly regulate the myelin genes expression. Neuregulin 1, Krox20, Akt pathway (Jessen and Mirsky, 2005a), steroid hormones (Désarnaud et al., 2000) and the canonical Wnt/ β -catenin signaling pathway (Tawk et al., 2011) are positive regulators of myelin gene expression and myelogenesis.

Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) was extensively studied for its activation by environmental pollutants, dioxins. AhR, a cytosolic ligand-activated transcription factor, belongs to the member of bHLH/PAS family of heterodimeric transcriptional regulators. The activation of AhR by dioxin provokes its heterodimerisation with ARNT (HIF1 β), their binding to the promoter regions of the target genes (i.e. Cytochrome 1A1 (cyp1A1)...). Consequently, AhR increases the transactivation of the target promoters (Guyot et al., 2013).

Animal and human data suggested that AhR is involved in various signaling pathways critical for cell homeostasis and physiology, like cell proliferation and differentiation, gene regulation, cell migration and inflammation. Dysregulation of these physiological processes is known to contribute to events such as tumor initiation, promotion and progression (e.g. hepatocarcinoma...) (Feng et al., 2013).

Although the role of AhR in tumoregenesis via dioxin activation is well documented, the

endogenous role of AhR remains poorly explored, especially in the nervous system. For example, there are sparse and contradictory epidemiologic data on human after the accident of Seveso in Italy (1976) where dioxin (TCDD) contaminated its inhabitants. While Filippini showed in 1981 that 22% of the Seveso residents have peripheral polyneuropathies a year after the contamination by dioxin (Filippini et al., 1981), these data were contradicted by a retrospective study led in 1989 by Assenatto *et al* (Assennato et al., 1989).

Therefore, we asked the question about the endogenous role of AhR in peripheral nerve myelination. Here, we report a major role of AhR in myelination process and myelin gene expression. We show that AhR is expressed in Schwann cells and in sciatic nerves. Furthermore, AhR^{-/-} knockout mice exhibit thinner myelin sheaths around their axons. We also highlight a cross-talk between AhR and Wnt pathways. Our results show, for the first time, the implication of AhR in myelination process.

Materials and Methods

Animals

Seven days, eight and twenty weeks old male mice (C57BL/6j:RJ) were purchased from Janvier (France). AhR knock-out mice are a gift from Pr Alvaro Puga (Cincinnati, USA). AhR^{-/-} mice and their wild-type controls were maintained on a mixed strain background (C57BL/6j:RJ) and housed in a temperature-controlled room with a 12 hours light/dark cycle. All experiments were performed on age-matched male mice. Adults animals were fed *ad libitum* with water and Global-diet® 2016S from Harlan (Gannat, France) containing 16% protein, 4% fat, 60% carbohydrates. To reduce the effect of stress, the elapsed time between the capture of a mouse and its sacrifice by decapitation was under 30 seconds. All aspects of animal care were approved by the Regional Ethic Committee (authorization CE2-04).

Cell culture

The mouse Schwann cell line (MSC80) was maintained in Dulbecco's minimal essential medium (DMEM) supplemented with 10% decompemented fetal calf serum (Hyclone-Perbio), 1% penicillin, 1% streptomycin (Gibco) and 1% Glutamine. All cultures were grown at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂.

Plasmids and chemicals

P0-luc was graciously provided by Dr G Lemke (San Diego, USA), PMP22-luc by Dr P Patel (Houston, USA) and p1646 (Cyp1A1)-luc by Dr A. Puga (Cincinnati, USA). The siRNAs directed against AhR were purchased from Qiagen (Lafayette, CO). The AhR was targeted by four different separate siRNA recognizing four different regions of AhR transcript. The siRNA that we have used did not have any off-target effect. AhRR is a gift from Dr Yuichiro

Kanno (Chiba, Japan), B6AhR and D2AhR were generously provided by Dr A. Puga (Cincinnati, USA). TCDD was purchased from Sigma (France).

Transient transfections

MSC80 cells were transiently transfected using Effecten reagent (QIAGEN). One day prior to the transfection, MSC80 cells (1.5×10^5 cells/well for expression vector and 2.5×10^5 cells/well for siRNA assay) were grown into 6-well plate and incubated in the DMEM culture medium containing 10% decompemented fetal calf serum. The MPZ-Luc or the PMP22-luc plasmid (0.2 μg for expression vector and 0.4 μg for siRNA assay), the pCMV- β Galactosidase expression vector (0.1 μg), The AhRR, B6AhR, D2 AhR expression vector, and siRNAs at the concentrations indicated in the figure legends were mixed with a solution containing Effecten reagents (0.85 mg/ml) in DMEM. The mixture was then added to the cells and incubated overnight. Sixteen hours after transfection, the medium was replaced by DMEM containing or not TCDD (50 nM). Luciferase activity was determined using the enzymatic method described in Massaad *et al* (Massaad et al., 2000). The β -galactosidase activity was used to normalize the transfection efficiency.

Quantitative and semi quantitative RT-PCR experiments

Total RNA from cultured MSC80 was obtained using TRIzol® Reagent (Invitrogen, France). One μg was reverse transcribed with random primers from Promega (Charbonnières, France) and reverse transcriptase M-MLV-RT from Invitrogen (Cergy Pontoise, France).

Quantitative real time PCR was performed with standard protocols using SYBR®Green ROX Mix (ABgene, France) as a fluorescent detection dye in **ABI PRISM®** 7000 in a final volume of 10 μl which also contains 300 nM primers (Operon, Cologne,

Germany) and 20 ng of reverse transcribed RNA in 384-well plates. To characterize the generated amplicons and to control the contamination by unspecific by-products, a melting curve analysis was applied. Each reaction was performed in triplicate and the mean of at least three independent experiments was calculated. All results were normalized to the 26S mRNA level and calculated using the Delta Ct method. The primer sequences used in real time PCR are listed below:

P0 F: 5'GTCAAGTCCCCCAGTAGAA3'

Axin2 F: 5'CCGATGAGGATGATTCACC3'

P0 R: 5'AGGAGCAAGAGGAAAGCAC3'

Axin2 R: 5'TGAGGCACTGCTCTGTTCTG3'

PMP22 F: 5'AATGGACACACGACTGATC3'

beta-catenin F: 5'GCCACAGGATTACAAGAAGC3'

PMP22 R: 5'CCTTTGGTGAGAGTGAAGAG3'

beta-catenin R: 5'CCACCAGAGTGAAAAGAACG3'

AhR F : 5'GCCTTGGTCTTCTATGCTCT3'

LRP6 F: 5'ACAGACACTGGCACGGATCG3'

AhR R: 5'GCTTTGTGCTGGTTGTCAC3'

LRP6 R: 5'GTTTGGCCAACCAAGGGAAG3'

DVL2 F: 5'GGCTTGTGTCGTCAGATACC3'

26S F 5'AGGAGAAACAACGGTCGTGCCAAA3'

DVL2 R: 5'TTTCATGGCTGCTGGATAC3'

26S R 5'GCGCAAGCAGGTCTGAATCGTG3'

Antibodies

Primary antibodies against MPZ (rabbit polyclonal) and PMP22 (rabbit polyclonal) were purchased from respectively Abcam and Sigma, beta-catenin (mouse monoclonal) from BD Biosciences, a-tubulin (mouse monoclonal) from Sigma and AhR (mouse monoclonal) from Abcam for immunohistochemistry and from Enzo life science for western blot. Secondary antibodies used for western blotting were: HRP-conjugated goat anti-mouse IgG and HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG (Upstate). Secondary antibodies used for immunohistochemistry were Alexa Fluor 488 donkey anti-mouse IgG (Molecular

Probes) and Cy3-conjugated AffiniPure Donkey anti-Rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch).

Western Blot

Protein content was determined using the “DC” protein assay kit (BioRad) with BSA as standard. Aliquots of 20 µg of total MSC80 or nerve extracts were used for each sample. Homogenate proteins were separated on 10% SDS-polyacrylamide gels by electrophoresis and blotted onto PVDF (polyvinylidene difluoride) membranes. Non-specific binding sites in the transblots were blocked at 4°C overnight with 5% BSA with 0.1% Tween 20 (Invitrogen) in TBS. Membranes were then incubated at room temperature for 2 hours with the following primary antibodies diluted in a mixture of 5% BSA and TBS-Tween 0.1%: MPZ antibody (1/750), PMP22 antibody (1/750), beta-catenin antibody (1/1 000), AhR (1/1000) and α -tubulin antibody (1/10 000). They were then incubated at room temperature for 1h30 with the appropriate secondary antibody diluted in 5% BSA and TBS-Tween 0.1% (anti-rabbit: 1:20 000; anti-mouse: 1:20 000), followed by ECL Plus western blotting detection (Amersham) before exposure to ImageQuant LAS4000 (GE Healthcare). Western Blots were quantified by means of Image J Software.

Oxysterols quantification by GC/MS

MSC80 cells (40×10^6 cells) and their corresponding media were extracted separately with 10 volumes MeOH/CHCl₃ (1/1 v/v). Thirty ng of ²H₁₀-24S-OH cholesterol, as internal standard, and 50 µg of butylated hydroxytoluene (BHT) were added into extracts for oxysterols quantification and for avoiding cholesterol autoxidation processes, respectively.

Cholesterol was separated from oxysterols by solid-phase extraction. Samples were applied in CH₃CN/Isopropanol (1/1 v/v) to a 500 mg C18 cartridge (International Sorbent Technology, Mid Glamorgan, UK) and oxysterols were eluted with 12 ml CH₃CN/Isopropanol/H₂O (55/25/25 v/v/v). This fraction was further purified by means of a second solid-phase extraction with a recycling procedure (P. Liere et al., 2004).

The oxysterol fraction was filtered through a 0.45 µm Gelman PVDF membrane and was purified by high performance liquid chromatography (ThermoFisher Scientific, San Jose, CA, USA) and collected with a fraction collector (Gilson). HPLC was achieved with a Lichrosorb Diol column as described (P. Liere et al., 2000). The oxysterols-containing fraction from HPLC was derivatized with N-methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamide (MSTFA) to form the di-trimethylsilyl ether derivatives of oxysterols.

Derivatized cells and media extracts as well as derivatized calibration solutions were injected with an AS 2000 autosampler (Thermo Electron Corporation, San Jose, USA) into the GC/MS system which consisted of a TraceGC gas chromatograph coupled with an Automass Solo mass spectrometer.

GC was performed in the splitless mode with a BPX5 capillary column (SGE, Australia). The temperature in the oven was initially 50°C for 1 min and then ramped to 340°C at 20°C/min.

The mass spectrometer was operated in the electronic impact mode. Identification of each oxysterol was supported by its retention time and two diagnostic ions in the single ion monitoring (SIM) mode. Quantification was performed according to the major diagnostic ion.

Transmission electron microscopy

Sciatic nerves were dissected and immersed in 4% paraformaldehyde, 2.5% glutaraldehyde, and 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4 fixative solution at 4°C overnight, washed in phosphate buffer, postfixed in 2% osmium tetroxide, dehydrated in graded ethanol series, and embedded in epoxy resin. Ultrathin sections (50–90 nm) were cut on an ultramicrotome (8800 Ultratome III, LKB Bromma) and collected on 300-mesh nickel grids. Staining was performed on drops of 4% aqueous uranyl acetate, followed by Reynolds's lead citrate (Reynolds J Cell Bio 17:208-212, 1963). Ultrastructural analyses were performed in a JEOL JEM-1011 electron microscope and digitalized with DigitalMicrograph software. Image acquisition was performed on the Cochin Imaging Facility. Electron microscopy images were used for calculating the g-ratio and axon perimeter using NIH ImageJ software. At least 100 randomly selected axons were analyzed per animal. At least three animals were used per genotype. Healthy axons were defined on the basis of the presence of intact membranes and the normal complement of organelles.

Immunohistochemistry

Sciatic nerves were dissected and immersed in 4% paraformaldehyde and embedded in paraffin. Sections (7 µm) were cut, rehydrated and epitopes demasked in 3 times 5 minutes boiling pH 2 citric acid. Non-specific binding sites were blocked with BSA 10% in TBS 1%. Sections were then incubated at 4°C overnight with the following primary antibodies diluted in a mixture of 10% BSA and TBS 1%: P0 antibody (1/500), AhR antibody (1/400). They were then incubated at room temperature for 1h30 with the appropriate secondary antibody diluted in 10% BSA and TBS 1% Alexa Fluor 488 donkey anti-mouse (1/400) and Cy3-conjugated AffiniPure Donkey anti-Rabbit (1/500). Nuclei

were stained with Hoechst 33342 (Pierce Biotechnology). Sections were imaged using a confocal microscope (LSM510; Carl Zeiss) with a 63× (NA 1.2) lens, and sequential excitation was performed with laser lines 488 nm (Ar.ion laser), 543 nm (HeNe laser), and 633 nm (HeNe laser).

Behavioral tests: locomotor analyses.

Open-field Test: spontaneous locomotion

AhR^{-/-} (n=11) and WT (n=6) 10 weeks old male mice were tested in open-field. Set-up consisted in a 30cm³ cube with transparent walls. The arena was surrounded by 8 synchronized CCD cameras (Point Grey Research, GRAS-03K2M) captured 10Hz sequences of images while the mouse explored the open field. Mice were placed at the center of the arena and left completely unperturbed for 10 minutes. The 3D trajectory of the center of volume of the mouse was recovered using a multiple view optical system. The images were electronically synchronized at the frame level using a trigger signal and a time stamp. For each camera, a calibration procedure provided the geometric projection from a 3D reference frame to the 2D image plane using a pinhole model. The 3D reference frame was oriented so that the XY-plan corresponds to the ground plan (Z=0) and the Z-axis to the up vertical axis. For each image, a background subtraction technique isolated the 2D silhouette of the mouse. The centroid of the silhouette provided a 2D cue of the center of mass of the mouse. Following calibration of the cameras, the 2D centroids of each frame were triangulated using a DLT technique to compute the 3D trajectory of the center of volume. A ground occupancy grid was computed as a 2D histogram of planar coordinates with 6x6, 5cm wide square cells. The third vertical coordinate was used to count the number of rearing.

Treadmill test: forced locomotion

Treadmill tests were assessed in 8 weeks old male AhR^{-/-} (n=5) and their control littermates (n=5). Mice were acclimated to the testing room 24 hours before each test. All experiments were performed in a sound attenuated room under controlled illumination (150 lux). Rod and treadmill experiments were recorded with high-speed cameras (250 frames/s) with resolution of 1040 x 1024 pixels. The animals were filmed in lateral view.

The forced locomotion of the mice was investigated using a commercial motorized treadmill (Columbus Instruments International, Columbus U.S.A), in a corridor made of transparency films 28 cm long and 5 cm wide. The speed of the treadmill was controlled by a tachymeter. After an habituation session (treadmill's speed 6cm/s), mice were tested at a speed of 10 cm/s and 16cm/s the next day.

Off-line analysis was performed using the software Video Spot Tracker v08.01. We measured the stride time (ie the time lag between two successive touchdowns of the same foot). This kinematic parameter was always measured on the left backward limb.

Sequences consisting of typically 3 homogeneous strides (sequences in which the mice stayed in the same position relative to the camera) were retained for the analysis.

Rod test- Static paradigm

Rod tests were performed on the same animals as treadmill test during a different session. The set up consisted of a rod of 9.5 mm diameter and 5 cm length. After a period of habituation, animals were securely put on the rod. The ability of the animal to remain on the rod without falling was investigated for a maximum period of 100 seconds.

Rod test- Dynamic paradigm

The set up consisted of a rod of 9.5 mm diameter and 70cm length. At one end of the rod we put a shaded platform. First, the mice were adapted to the set-up and to the platform. Then, the animals were securely put at the end the rod opposite to the safe platform. Once the mice had succeeded in reaching several times the platform with the help of the investigator the test was recorded. We monitored the ability to reach the platform, time to reach the platform, and counted the number of times the mice slipped on the rod without falling (faults).

Rotarod Test: forced paradigm

Balance and motor coordination was tested using a motorized rotarod LE8200 apparatus (Bioseb, France). The rotarod test was performed, placing 10 weeks old mice on a rotating treadmill drum (3 cm diameter) and measuring the latency to fall of the mice during the first 5 min/300s of the trial. The average time to fall for each trial was measured. We performed a fixed speed Rotarod assays at 14 rpm. One trial by day during five days was performed. All animals (n = 10 for wild type mice, and n = 5 for AhR^{-/-} mice) received two adaptation sessions.

Statistical analysis

Unless otherwise specified, means of treatment groups were compared with one-way analysis of variance (ANOVA). When the ANOVA showed that there were significant differences between the groups, Tukey's test was used to identify the sources of these differences. A P value of ≤ 0.05 was considered statistically significant. Two groups comparisons were performed by the Student test.

Results

1. AhR is expressed in Schwann cells

First, we wanted to assess the expression of AhR in Schwann cells. We performed immunohistochemistry experiments on Sciatic nerve of adult mice, and found that AhR expression is perinuclear within Schwann cells (Fig. 1A). We confirmed by Western blot the expression of AhR in wild-type sciatic nerve while it was, as expected, absent in AhR-KO nerve (Fig. 1B). AhR is also expressed in cultured Schwann cell line (MSC80 cells) as revealed by WB (Fig. 1C) and was localized mainly in the nucleus as well as in the cytoplasm (Fig. 1D). Incubation of MSC80 cells with TCDD (50nM) provoked the translocation of AhR into the nucleus (Fig. 1D). Thus, AhR is present in Schwann cells where it could exert a physiological effect.

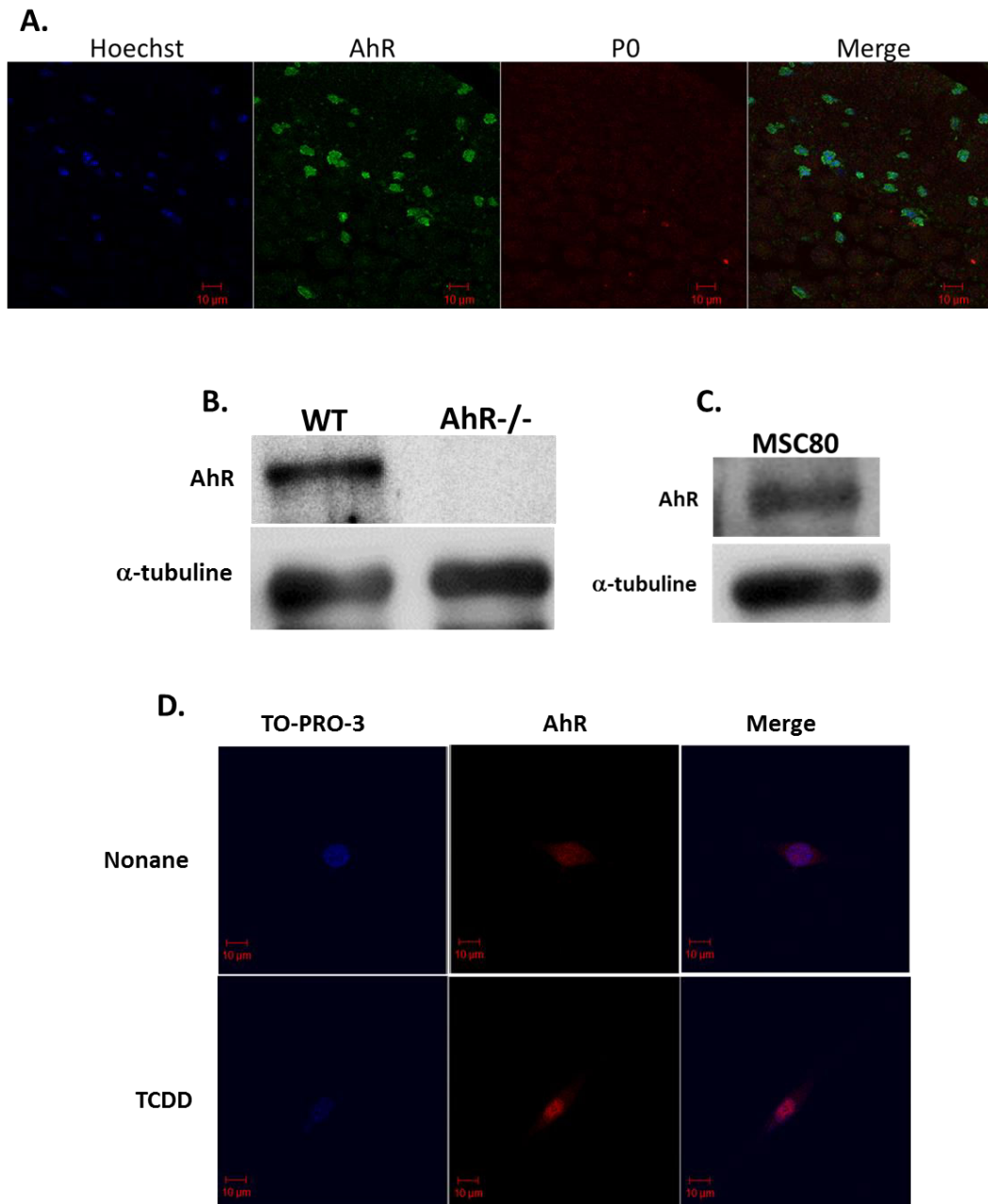


Figure 1 : Expression and localization of AhR in sciatic nerve and in Schwann cells. *A*, spatial expression patterns of AhR in the sciatic nerve sections of adult mice. Myelin sheaths were stained with anti-P0 antibody (in red), AhR was localized with monoclonal antibody (in green) and nuclei were stained with Hoechst (blue). Pictures were taken using a confocal microscope. This experiment was repeated at least three times, and a typical experiment is presented here. The images shown represent 1 μ m of confocal Z sectioning. Scale bars, 10 μ m. *B*, Total proteins were extracted from sciatic nerves of WT mice or AhR^{-/-} (8 weeks old) or, *C*, from MSC80 cell line. Western blot experiments were performed with antibody against AhR and we used α -tubulin as positive control. This experiment was repeated at least four times, and a typical experiment is presented here. *D*, Immunocytochemistry experiments were performed with MSC80 cells. AhR localization is highlighted in red, nuclei were stained with TO-PRO-3 (blue). Scale bars, 10 μ m.

2. AhR knock-out alters locomotor behavior

A. Locomotion during open-field task

The spontaneous locomotor activity of mice was assessed using the open field test. Examples of locomotion of the different groups of mice are presented on figure 2A. WT mice explore both the boundary and the center of the field, while AhR^{-/-} mice remain on the corners, navigate preferentially on the perimeter and rarely explore the center of the field. In addition, locomotion is also diminished in AhR^{-/-} mice, as revealed by a decrease in the average speed and total distance travelled compared to the WT ($p < 0.001$). Finally, the number of rearing events (vertical exploratory activity) of the AhR^{-/-} mice is also decreased by 75%, (mean \pm SEM: 15.17 ± 5.167 rearing for AhR^{-/-} vs 62.20 ± 9.769 rearing for WT mice; $p < 0.01$).

B. Gait parameter with treadmill test

We measured WT and AhR^{-/-} mice stride time using a motorized treadmill (Fig. 2C). No significant difference was observed with treadmill speed at 10 cm/s (mean \pm SEM : WT= 0.26 ± 0.01 s vs AhR^{-/-}= 0.291 ± 0.015 s). However, when treadmill speed was increased at 16 cm/s, AhR^{-/-} mice showed slower stride than WT (mean \pm SEM WT= 0.213 ± 0.005 s vs AhR^{-/-}= 0.243 ± 0.006 s; $p < 0.001$). In addition, AhR^{-/-} mutant mice were not able to maintain the rhythm and therefore could not be tested at higher speeds.

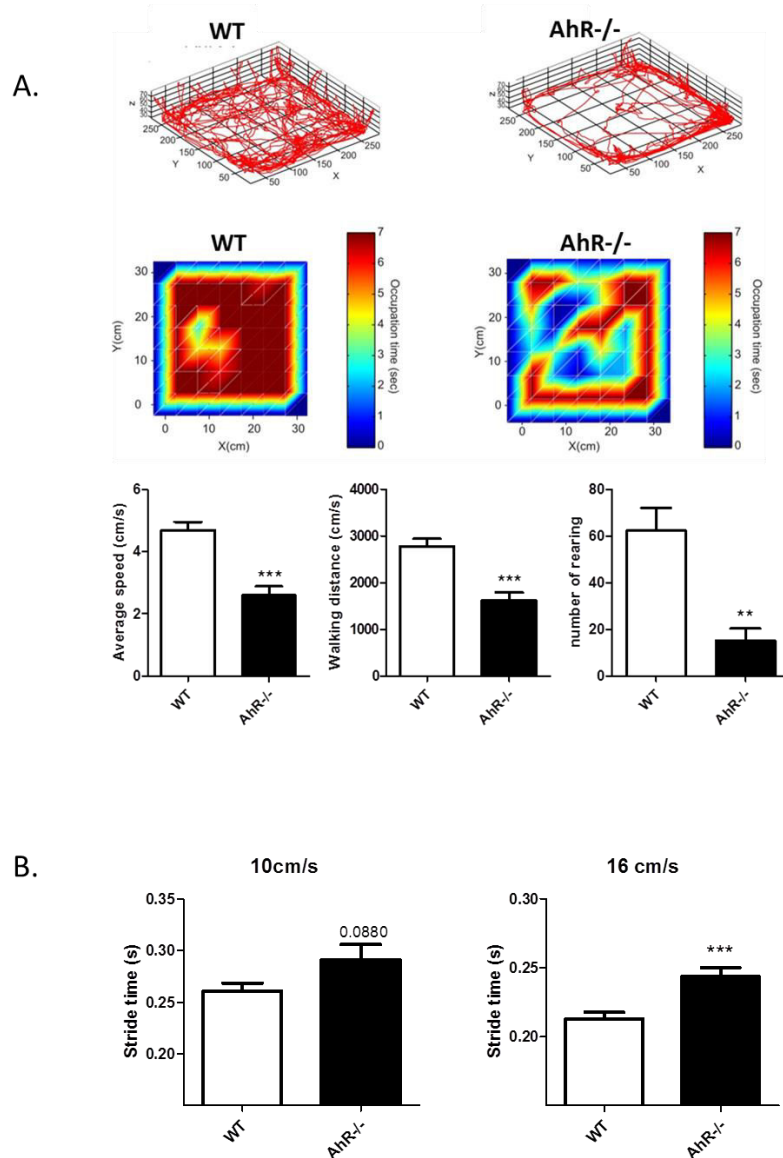


Figure 2 : AhR-/- mice harbor defect in locomotion. A, Open field task. 10 weeks old WT and AhR-/- mice were placed in an open field. The 3D trajectory using a center of the body volume of the mice was recovered using a multiple view optical system. A representative trajectory and time of occupancy (seconds) of WT and AhR-/- mice is shown in first and second upper panels. Average speed (cm/s), walking distance and number of rearing were also determined ($n=6$ at least). **B, Gait parameter.** 8 weeks old WT and AhR-/- mice were placed to a treadmill running at 10 cm/s and 16 cm/s. Stride time of at least 3 homogenous strides were measured for each animal and for both speed. . ** $p < .001$, *** $p < .0001$ by Student's t test when compared with control (WT).

C. Rod test

When placed on a round tight horizontal bar (diameter 0.95 cm), all wild-type mice could balance and support their weight. The test was then stopped after 100 seconds. In contrast, AhR^{-/-} mice were unable to stay on the bar and dropped rapidly after 38.20 ± 15.55 s ($p < 0.01$ compared to WT)(Fig. 3A).

Then, motor performance was evaluated using a cross rod test. The AhR^{-/-} mice exhibited a higher slip score while crossing the 70 cm long rod (mean \pm SEM: AhR^{-/-} 5.80 ± 1.46 vs WT 2.00 ± 0.31 ; $p < 0.05$) (Fig. 3B3). The AhR^{-/-} mice were also 3 times slower when crossing the rod compared to the WT mice (mean \pm SEM: AhR^{-/-} 2.03 ± 0.48 cm/s vs WT 6.11 ± 1.19 cm/s; $p < 0.05$) (Fig. 3B2).

D. Impaired postural control and coordination in AhR^{-/-} mice

To investigate the postural control and coordination, the rotarod test was used (Fig. 3C). Mice were trained to stand on a rotating bar over a 5 days period at a constant velocity of 14 rounds per minute (rpm) (fixed speed rotarod protocol).

Tested with fixed speed rotarod protocol (Figure 3), the WT mice significantly improved their performance after several training days ($F(4,45)=6.046$, $p < 0.001$), indicating that the mice improved their motor coordination in order to stand on the bar. To the opposite, the time latency of AhR^{-/-} mice remained constant. For example, AhR^{-/-} mice were able to stay on the rotating bar only 14.2 ± 4.15 seconds on day 5 (compared with 207.3 ± 38.30 seconds for WT mice). The ability of mice to stand on the rod was significantly different between both genotypes (WT= 117.8 ± 15.5 s vs AhR^{-/-} 16.4 ± 3.1 s ; $p < 0.001$). Our findings demonstrate that the AhR^{-/-} have impaired postural control, coordination, and motor learning capacities.

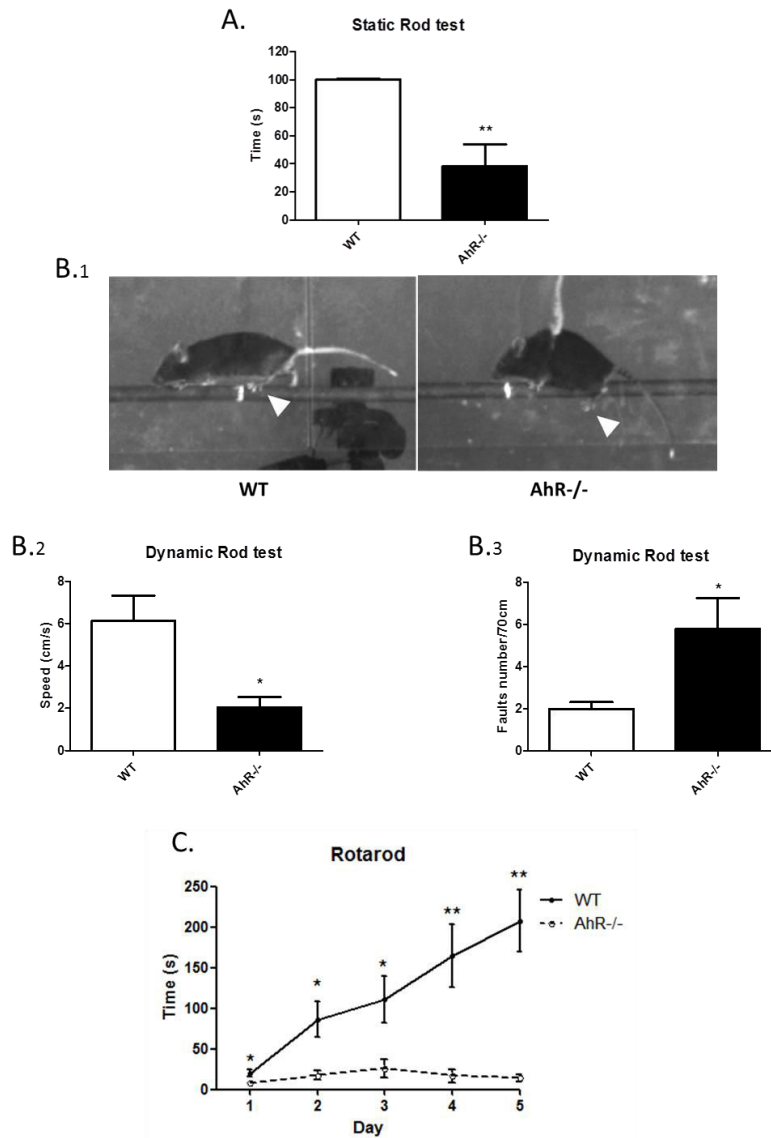


Figure 3: AhR^{-/-} mice harbor defect in locomotion in balance condition. Eight weeks-old WT and AhR^{-/-} mice were placed on the rod to perform either static or dynamic rod tests. **A**, Static rod test: Measure of the time that WT and AhR^{-/-} mice were able to stay without dropping on the rod. The test was stopped when mice succeed to stay 100 seconds. **B**, Dynamic rod test. **B1**: Representative picture of the posture of the mice on the rod. The arrowhead indicates left backward limb. In this image AhR^{-/-} mouse slipped. **B2**: The average speed to cross the rod was measured (cm/s). **B3**: The number of faults (slips) done by WT or AhR^{-/-} was measured (n=5). *p<.005, by Student's t test when compared with control (WT). **C**, 10 weeks-old WT and AhR^{-/-} mice were placed into a rotarod each day during five days. The time that mice could stay on the rotarod was measured each day. *p<0.05, ** p<0.01 Tukey's post hoc tests after one-way ANOVA when compared with control for each day of the experiment.

3. The invalidation AhR modifies myelin structure

As the locomotor behavior of AhR $-/-$ animals was altered, we wondered if it is due to deficiency in myelin. The sciatic nerve of 8 weeks old male mice (WT or AhR $-/-$) were extracted and the structure of the myelin sheaths was analyzed by electron microscopy and digital imaging of ultra-thin (50-90 nm) cross sections. As depicted in figure 4A, we observed a dramatic disorganization of myelin structures in AhR $-/-$ animals compared to WT. Several inclusions of myelin sheaths were detected, and several interstitial voids were also seen between myelin enwrapments. Moreover in AhR knockout mice, the thickness of myelin sheaths was reduced. In WT mice, the average g-ratio was 0.6899 ± 0.0044 while it was 0.7241 ± 0.0048 in KO mice. (Fig.4B). By plotting the g-ratios of sciatic nerve fibers from AhR KO and wild-type animals as a function of their respective axonal diameters we showed that the myelin defects affect all axon calibers (Fig. 4C). We also analyzed the axonal perimeter in either WT or AhR $-/-$ mice and found that the axonal perimeter was increased in AhR $-/-$ mice ($12.5 \pm 0.4 \mu\text{m}$ for AhR $-/-$ mice vs $10.52 \pm 0.31 \mu\text{m}$ for WT) (Fig. 4D). Finally, the number of myelinated axons did not differ when we compared WT to AhR $-/-$ mice (Fig. 4E).

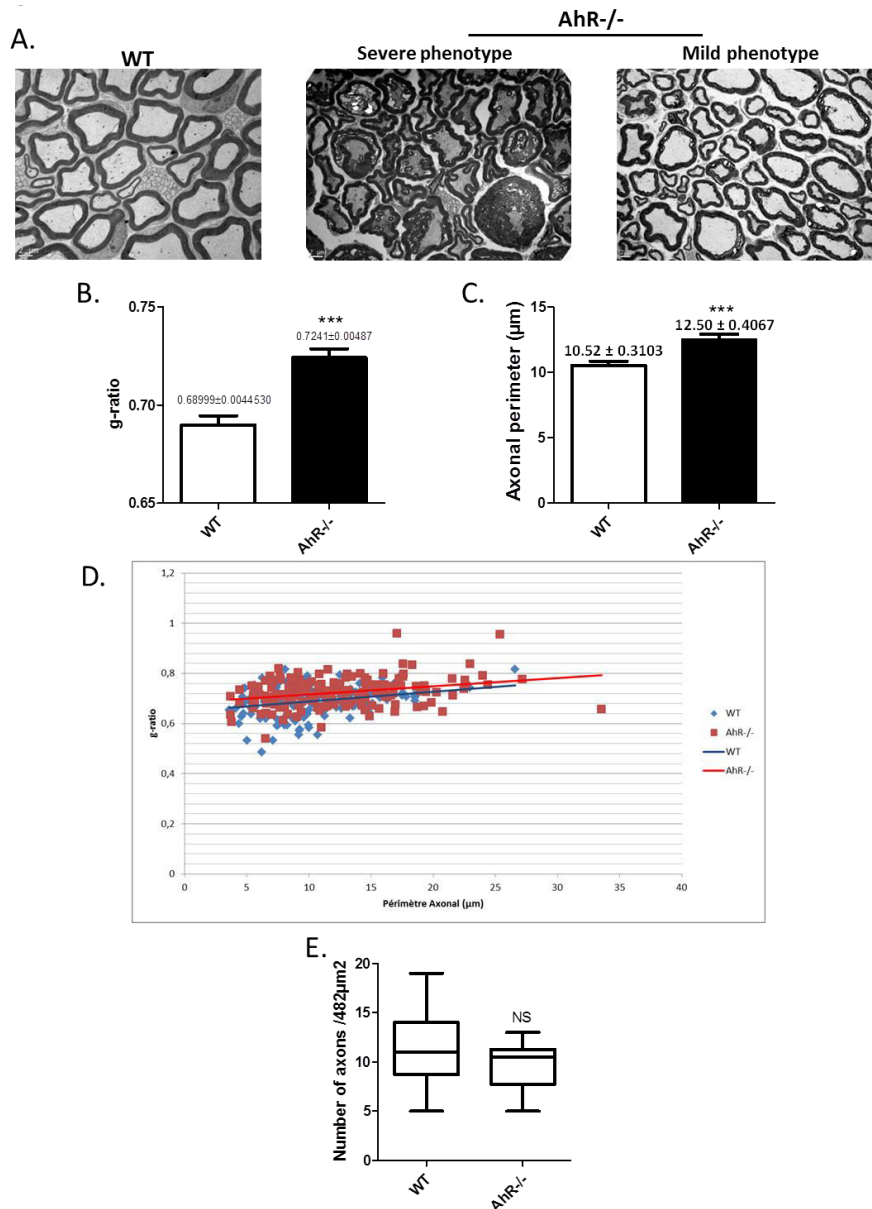


Figure 4: Incidence of AhR KO on myelin structure in vivo in adulte mice. *A*, Ultrathin (50 –90 nm) cross-sections were prepared from Epon embedded adult sciatic nerves. Abnormal myelin structure, heterogeneity and reduced thickness of myelin sheaths are apparent in AhR-/- mice when compared with WT. Scale bar, 2 μm . *B*, Myelin thickness was estimated by g-ratio determination using electronic microscopy pictures obtained from adult sciatic nerves with no severe myelin structure abnormality. Myelin thickness is altered in AhR-/- mice (n=4). *C*, Axonal perimeter was measured. AhR-/- mice have bigger axon than WT mice. *D*, g-ratios were plotted against axonal diameters. The reduction in myelin thickness in AhR-/- mice when compared with WT was observed for all types of axon calibers. Blue line, linear regression curve for WT animals; red line, linear regression curve for AhR-/- mice. *E*, Quantification of the number of myelinated axons in 482 μm^2 area. No difference was observed between WT and AhR-/- mice. Data are given as means \pm /-SEM. ***p_{0.001} by Student's t test when compared with control (WT).

We also analyzed the structure of the sciatic nerve extracted from 7-days old mice (Fig. 5). Here, we observed a mild disorganization of myelin sheaths that was less predominant than in 8-weeks old mice (Fig. 5A). The g-ratio was not different when we compared WT to AhR^{-/-} mice (Fig. 5B). Nevertheless, the number of myelinated axons were fewer in AhR^{-/-} compared to wild-type animals (28.88±1.18 (WT) vs 20.88± 1.23 (AhR^{-/-}) (Fig. 5C). In P7 AhR^{-/-} mice we also observed greater axonal perimeter than in WT mice (AhR^{-/-} 6.42±0.13 μm vs WT 5.75±0.08 μm) (Fig. 5D).

These data show that the absence of AhR expression alters peripheral myelin structure *in vivo*.

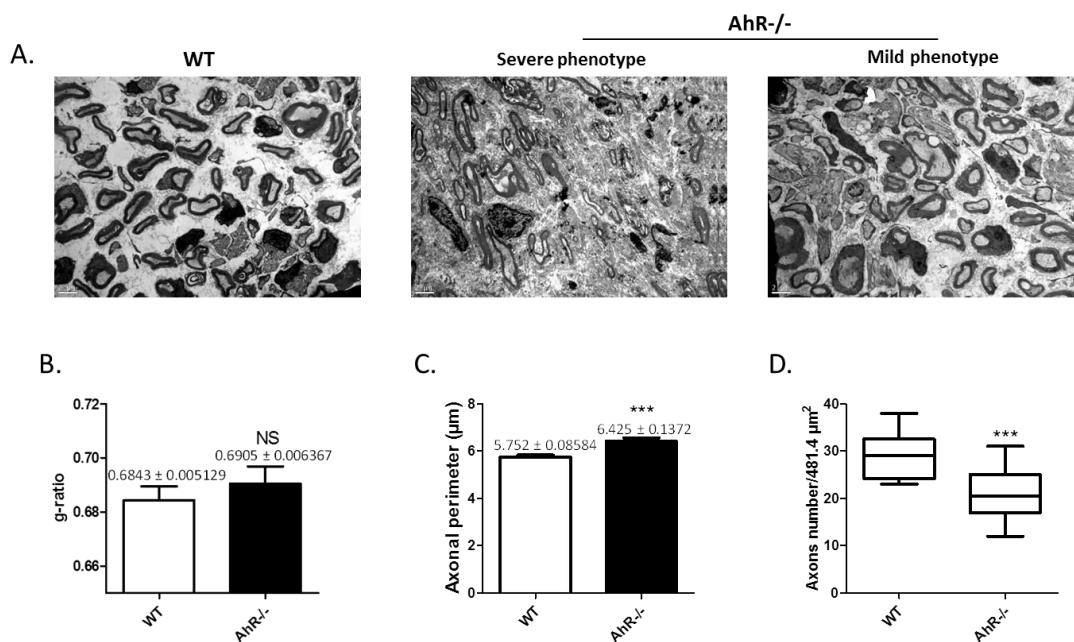


Figure 5: Incidence of AhR KO on myelin structure in P7 animals. *A*, Ultrathin (50 –90 nm) cross-sections were prepared from Epon embedded P7 sciatic nerves. Abnormal myelin structure, heterogeneity and reduced thickness of myelin sheaths is apparent in AhR^{-/-} mice when compared with WT. Scale bar, 2μm. *B*, Myelin thickness was estimated by g-ratio determination using electronic microscopy pictures obtained from P7 sciatic nerves with no severe myelin structure abnormality. Myelin thickness is not altered in AhR^{-/-} mice. Five animals per genotype were used. *C*, Axonal perimeter was measured. AhR^{-/-} mice have larger axon than WT mice. *E*, Quantification of the number of myelinated axons in 481.4 μm² area. AhR^{-/-} mice have fewer myelinated axon than WT. ****p*<0.001 by Student's *t* test when compared with control (WT).

4. AhR knock out alters myelin gene expression

Afterwards, we assayed the expression of myelin genes in AhR $-/-$ animals. Proteins were extracted from the sciatic nerves of either WT or AhR $-/-$ mice (7-days-old (Fig. 6A), 8-weeks-old (Fig. 6B), and 20-weeks-old male mice (Fig. 6C)) and processed for western-blot experiments. In 7-days-old AhR KO mice, we observed a significant decrease of P0 (-40%) and PMP22 protein expression (Fig. 6A). Whilst in adult animals (8-weeks and 20-weeks-old mice), P0 and PMP22 expression were increased (Fig. 6B and C). It is noteworthy that the KO of AhR provoked a greater augmentation of P0 and PMP22 expression in the sciatic nerve of 8 weeks old than in 20 weeks old animals (for P0 4-folds increase in 8 weeks-old vs 2-folds increase for 20-weeks-old; for PMP22 3-folds increase in 8 weeks-old vs 1.5-folds increase for 20-weeks-old). This increase in myelin protein expression could explain in part the severe phenotype of AhR $-/-$ animals.

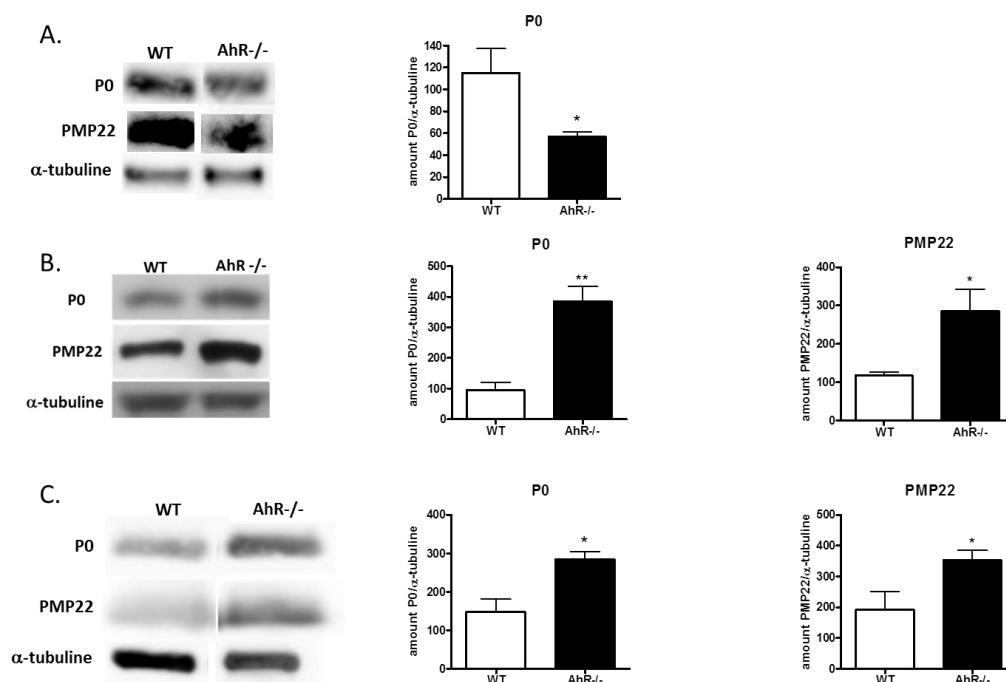


Figure 6. Expression of myelin genes AhR KO mice. 7 days-old (A), Eight-weeks-old (B) and twenty-week-old (C) male WT or AhR^{-/-} mice were sacrificed, and then their sciatic nerves were dissected (at least n=3 per group). Proteins were extracted, and Western blots were performed using antibodies against P0, PMP22 or α -tubulin. Figures represent a typical experiment. Western blots quantification using Image J software. * $p < .005$, ** $p < .001$ by Student's *t* test when compared with control (WT).

5. Effect of the AhR inhibition on the expression of myelin genes in Schwann cells

We addressed the question about the effect of the inhibition of AhR in Schwann cell line (MSC80 cells). We adopted two strategies: (i) the knock-down of AhR by siRNA, (ii) the overexpression of AhRR, the antagonist receptor of AhR.

A. AhR Knock down alters myelin gene expression

First, we transfected MSC80 cells with either a non-targeting siRNA (NT) or a siRNA specifically targeting AhR (siAhR). The efficacy of the knock-down was evaluated at the mRNA level by real-time PCR (65% extinction of AhR mRNA after 24h, and 50% inhibition after 48h) (Fig. 7A) and at the protein level (70% inhibition of AhR expression after 24h and 48h) (Fig. 7B). We also assessed the functional efficacy of the siRNA on an AhR target gene, cytochrome 1A1 (cyp1A1) using a Cyp1A1 reporter gene (Fig. 7C). As expected the silencing of AhR reduced drastically the expression cyp1A1 promoter activity (more than 80% inhibition at 24h and 48h).

Figure 7

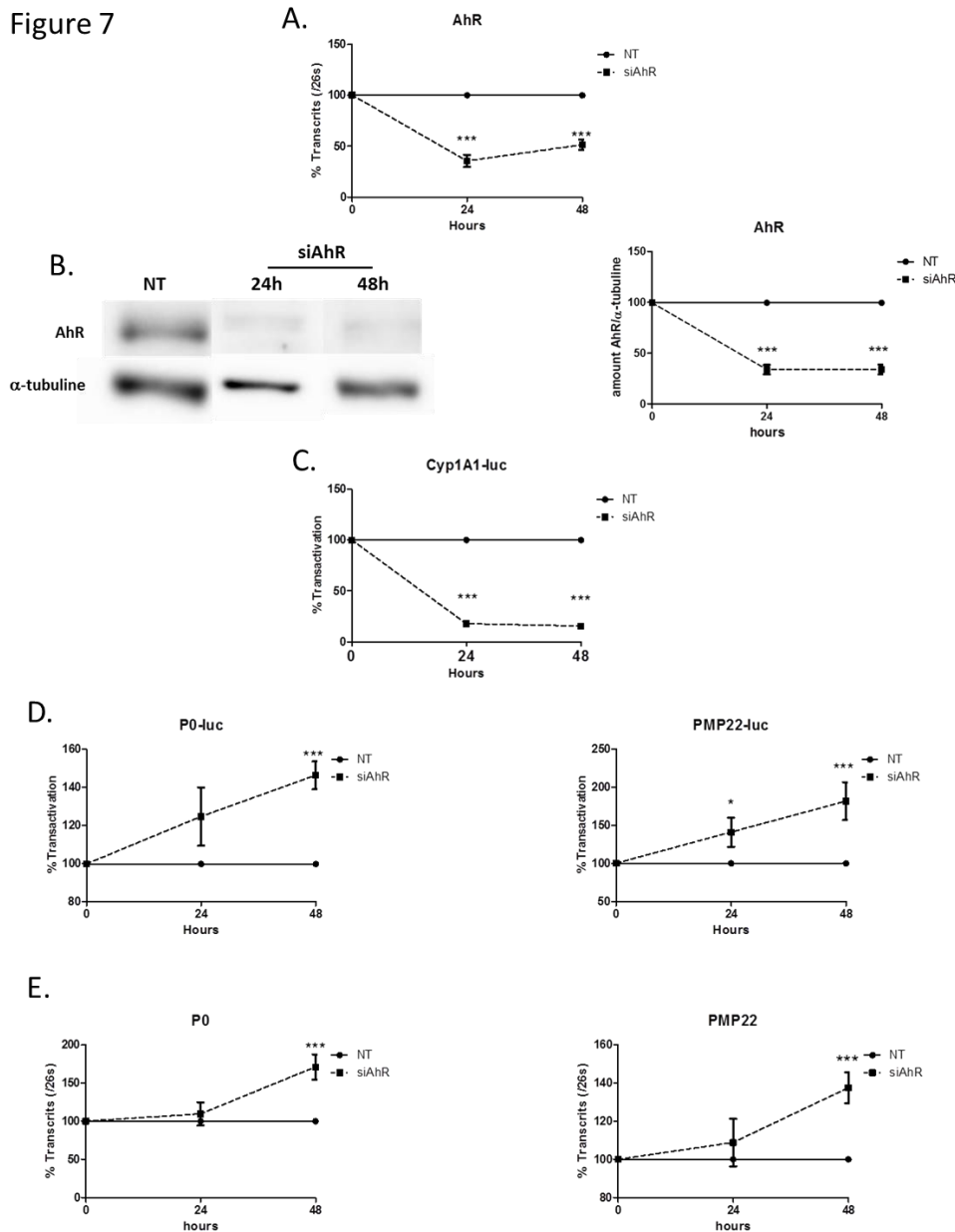


Figure 7 : Effect of siRNA against AhR on myelin genes expression in MSC80 cells. MSC80 cells were transfected with siRNA directed against AhR (siAhR) or a non targeting siRNA (NT) during 24 h or 48h. **A**, Total RNA was extracted, and quantitative real-time PCR experiments were performed using primers recognizing AhR. The RT-PCR was normalized using 26S RNA, and they represent the mean \pm /SEM of at least eight independent experiments. **B**, Proteins were extracted, and Western blots were performed using antibodies against AhR and α -tubulin (normalization of the Western blots). Figures represent a typical experiment. Western blots quantification was done using Image J software. The data represent the mean \pm /SEM of eight independent experiments. **C**, MSC80 cells were transiently transfected CYP1A1-luc construct and with either siAhR or NT. 24 h or 48h after medium change, β -galactosidase and luciferase activities were analyzed. Results represent the means \pm /SEM of at least six independent experiments performed in duplicate. MSC80 cells were transfected with siRNA directed against AhR or siRNA control non targeting (NT) during 24 h and 48h. **D**, MSC80 cells were transiently transfected with MPZ-Luc PMP22-Luc constructs and with either siAhR or NT. 24 h or 48h after, β -galactosidase and luciferase activities were analyzed. Results represent the means \pm /SEM of at least six independent experiments performed in duplicate. **E**, Total RNA was extracted, and quantitative real-time PCR experiments were performed using primers recognizing MPZ, PMP22. The RT-PCR was normalized using 26S RNA, and they represent the mean \pm /SEM of at least eight independent experiments. * p < 0.05, *** p < 0.001 by Tukey's post hoc tests after one-way ANOVA when compared with control.

We tested the effect of AhR knock-down on MPZ and PMP22 promoters (Fig. 7D). We transfected MPZ and PMP22 reporter plasmids in MSC80 cells, with either NT or siRNA against AhR. We observed a significant increase in P0 promoter activity after 48h of AhR knock-down (+50%). PMP22 promoter activity was enhanced after 24h (+40%), and kept augmented after 48h (+80%). We also quantified myelin genes transcripts after AhR silencing (Fig. 7E). While the down-regulation of AhR expression did not alter myelin gene expression at 24h, 48h of transfection with the siAhR increased P0 and PMP22 transcripts by 50%.

Taken together, the knock-down of AhR in mice or in Schwann cells led to increased myelin gene expression.

B. Effect of the overexpression of AhR and AhRR on myelin gene expression

To confirm the endogenous effect of AhR on myelination, we overexpressed an endogenous inhibitor of AhR, called AhRR (Fig. 8). AhRR is able to replace AhR in the transcriptional complex to repress its activity. The overexpression of AhRR in MSC80 repressed, as expected, cyp1A1 promoter activity (-60%) (Fig. 8A). Unexpectedly, P0 (Fig. 8B) and PMP22 (Fig. 8C) promoters were inhibited by 30%. To the opposite, the overexpression of AhR increased by 4-folds the AhR target gene, cyp1A1 (Fig. 8D) by 1,5 folds the transcriptional activities P0-luc (Fig. 8E), and by 2 folds PMP22 (Fig. 8F).

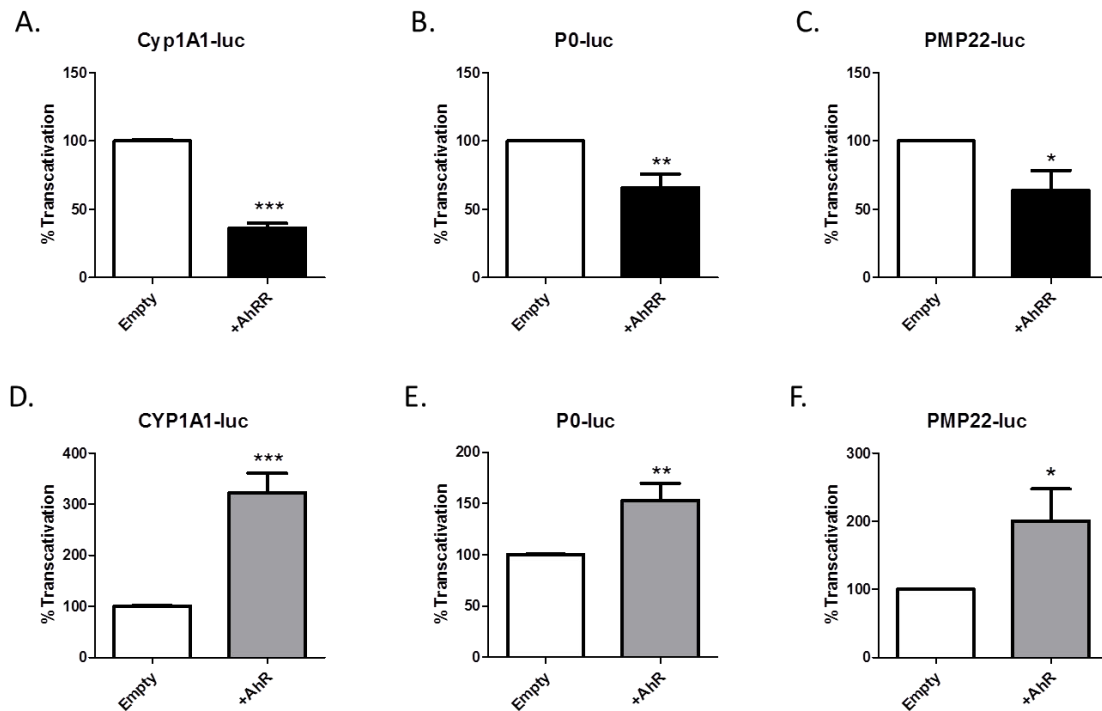


Figure 8 : Effect of AhRR and AhR overexpression on the expression of P0 and PMP22 in MSC80 cells. MSC80 cells were transiently transfected with an empty plasmid (pcDNA3) or with plasmid that express AhRR and with CYP1A1-luc (A), MPZ-Luc (B), PMP22-Luc (C) constructs. 8h after medium change, β -galactosidase and luciferase activities were analyzed. Results represent the means \pm SEM of at least six independent experiments performed in duplicate. * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 by Student's t test when compared with control (Empty vector). MSC80 cells were transiently transfected with an empty plasmid (pcDNA3) or with plasmid that expresses AhR and with CYP1A1-luc (D), P0-Luc (E), or PMP22-Luc (F) constructs. 24h after medium change, β -galactosidase and luciferase activities were analyzed. Results represent the means \pm SEM of at least six independent experiments performed in duplicate. * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 by Student's t test when compared with control (Empty).

C. How could we explain the discrepancy between the effect of siRNA against AhR and AhRR on myelin genes?

One of the possible mechanisms is that the absence of AhR in Schwann cells could be compensated by another signaling pathway. We previously showed that Wnt/ β -catenin pathway enhances the expression of peripheral myelin genes (Tawk et al, 2011). Therefore, we addressed the question whether the silencing of AhR affects the expression of Wnt/ β -catenin pathway components. At 48h, but not at 24h after transfection of the

siAhR, we observed a significant increase in the expression levels of LRP6 (Fig. 9A), Disheveled 2 (Fig. 9B), Axin2 (Fig. 9C), β -catenin (Fig. 9D). We also detected a 50% increase of the protein level of β -catenin (Fig. 9E). Then, we assayed the functionality of the Wnt/ β -catenin pathway. We showed that SuperTOP Flash-Luciferase construct was activated by 60% 24h after transfection of siAhR, and by 2.5-folds after 48h of transfection of siAhR (Fig. 9F). Those observations could explain, at least in part, why the silencing of AhR activates myelin gene expression: AhR silencing activates Wnt pathway that could participate in myelin genes stimulation. Interestingly, the overexpression of AhRR did not affect Wnt/ β -catenin signaling pathway. As a matter of fact, SuperTOP-Flash promoter activity was not altered when AhRR was transfected (Fig. 9G). Therefore, the severe knock-down of AhR (by siRNA approach) would provoke a compensatory mechanism via the Wnt pathway that is not activated when AhRR is overexpressed.

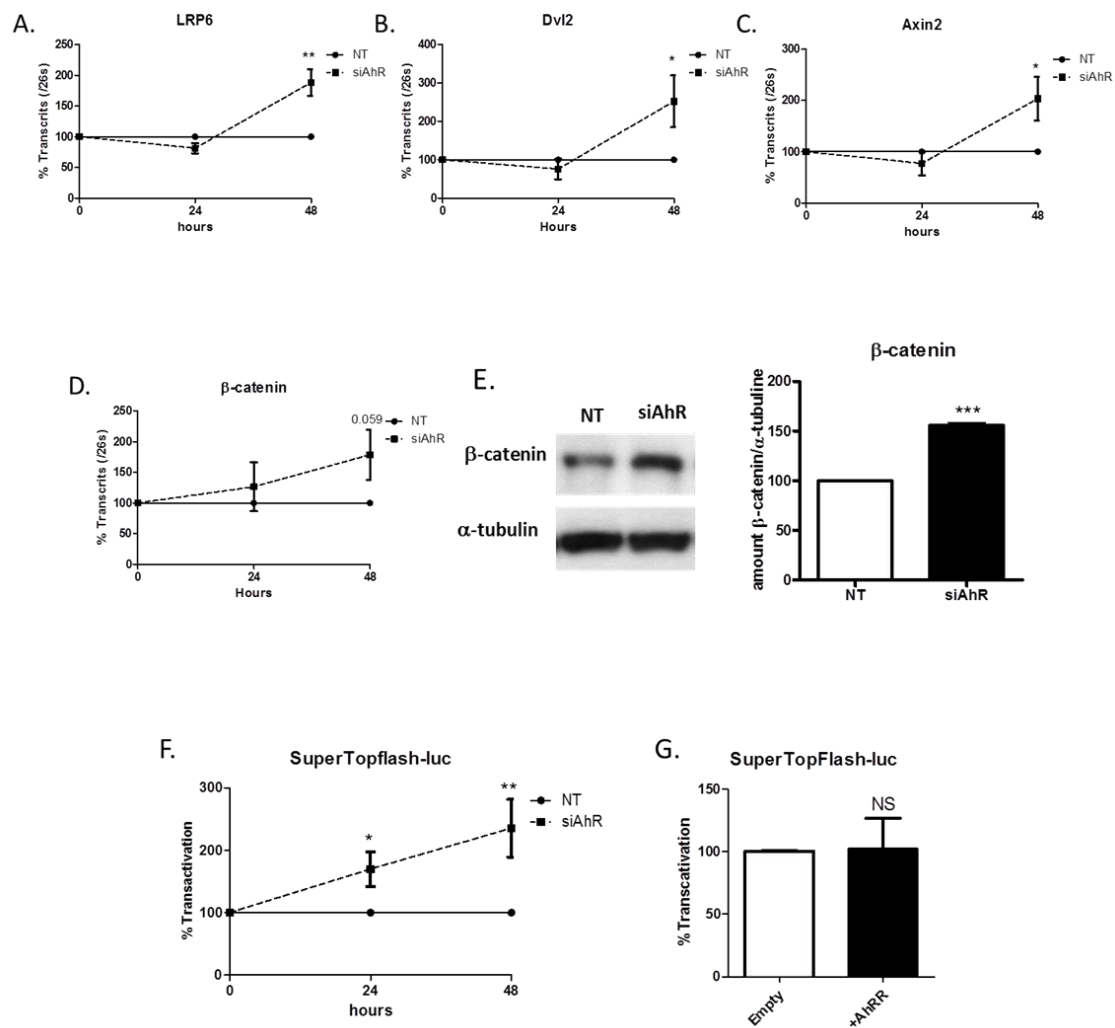


Figure 9 : Effects of siAhR and AhRR on Wnt/β-catenin components in MSC80 cells. MSC80 cells were transfected with siRNA directed against AhR or siRNA control non-targeting (NT) during 24 h and 48h. Total RNA was extracted, and quantitative real-time PCR experiments were performed using primers recognizing LRP6(A), Dvl2 (B), Axin 2 (C) and β-catenin (D). The RT-qPCR was normalized using 26S RNA, and they represent the mean +/- SEM of at least eight independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ by Tukey's post hoc tests after one-way ANOVA when compared with control (NT). E, After 48h of transfection of siAhR or NT, Proteins were extracted, and Western blots were performed using anti-β-catenin antibody to verify its expression in MSC80 cells. α-tubulin was used to normalize the Western blots. Figures represent a typical experiment. Western blots were quantified using Image J software. *** $p < .001$ by Student's t test when compared with control (NT). F, MSC80 cells were transiently transfected with Super Topflash-luc and siRNA directed against AhR or siRNA control non-targeting (NT) during 24 h and 48h. β-galactosidase and luciferase activities were analyzed. Results represent the means +/- SEM of at least six independent experiments performed in duplicate. G, MSC80 cells were transiently transfected with an empty plasmid or with plasmid that express AhRR and with Super Topflash-luc. 8h after medium change, β-galactosidase and luciferase activities were analyzed. Results represent the means +/- SEM of at least five independent experiments performed in duplicate. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ by Tukey's post hoc tests after one-way ANOVA when compared with control.

5. Effect of TCDD.

We assayed the effect of TCDD on myelin gene expression. TCDD is an environmental pollutant that acts as a ligand of AhR. TCDD (50nM) failed to regulate MPZ and PMP22 promoters (Fig. 10A and B). As a control for the efficacy of TCDD treatment, we used CYP1A1 reporter construct and showed that TCDD (50nM) activated by 3.5 folds CYP1A1 (Fig. 10C).

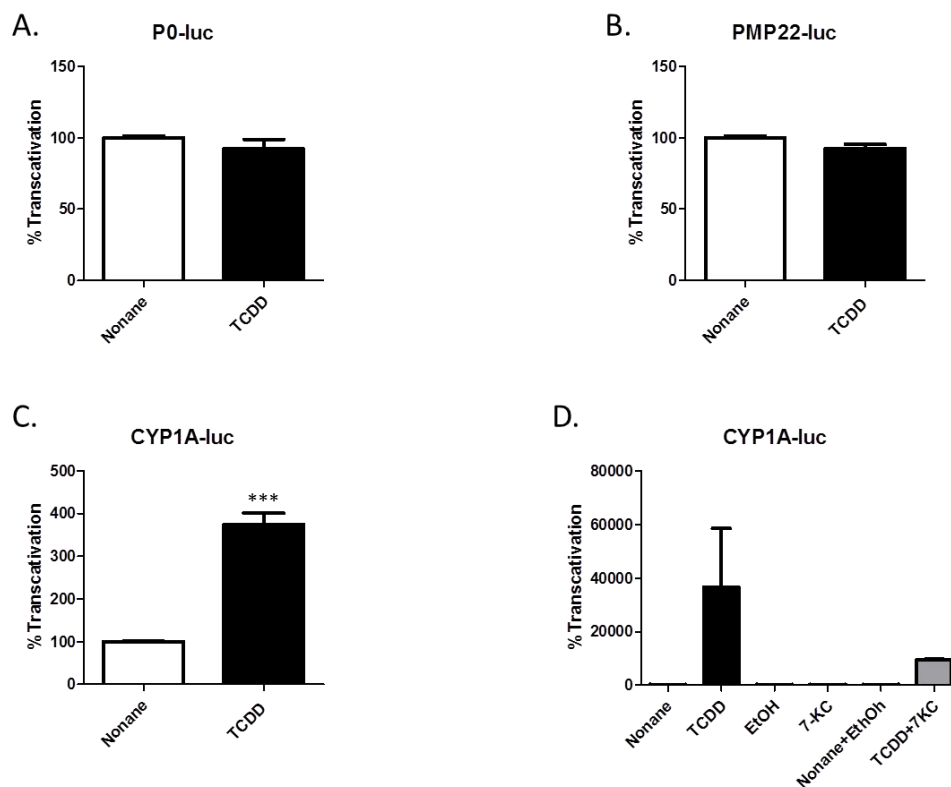


Figure 10 : Effects of AhR activation by TCDD on the expression of MPZ and PMP22 in MSC80 cells. MSC80 cells were transiently transfected with (A), MPZ-Luc (B), PMP22-Luc (C), CYP1A1-luc constructs. 24h after MSC80 cells were induced with vehicle nonane or with 50nM of TCDD. 24h later β -galactosidase and luciferase activities were analyzed. Results represent the means \pm SEM of at least five independent experiments performed in duplicate. *** $p < 0.001$ by Student's *t* test when compared with control (Nonane). D, HEPG2 cells were transiently transfected with CYP1A1-luc construct. 24h after MSC80 cells were induced with vehicle nonane, 50nM of TCDD, Ethanol (EtOH), 7KC or TCDD (50nM) + 7KC. 24h later β -galactosidase and luciferase activities were analyzed ($n=2$).

Usually, TCDD dramatically stimulates CYP1A1 (50-folds to 300-folds in HepG2 cells, not shown) while we have a faint stimulation in MSC80 cells. This weak effect of TCDD on CYP1A1 and on myelin genes could be due to the presence of high amounts of 7-ketocholesterol (7-KC), an endogenous modulator of AhR. We quantified by GC/MS the amount of 7-KC in MSC80 cells and found it at high concentration (200.44 ± 16.74 ng/40M cells). 24(S) cholesterol, which is a main oxysterol in the nervous system, is at 3.42 ± 0.71 ng/40M cells). To analyze if 7-KC is able to antagonize TCDD in MSC80 cells, we transfected CYP1A1 promoter and incubated the cells with TCDD with or without 7-KC. Interestingly, 7-KC failed to modulate CYP1A1 promoter activity but antagonized TCDD effect. Thus, we think that the 7-ketocholesterol protects myelin genes from an exogenous TCDD modulation.

DISCUSSION

Au cours du développement de la myéline dans le SNP, plusieurs facteurs de transcription ont été mis en évidence pour leur implication dans la survie, la prolifération et la différenciation des CS. Nous pouvons bien sûr citer en particulier, les neurégulines (NRG) et leurs récepteurs membranaires erbB qui en activant la voie PI3K/Akt, jouent un rôle important dans la survie cellulaire et le contrôle de la différenciation (Nave and Salzer, 2006). D'autres voies et facteurs de transcription sont impliqués dans les premières étapes de la myélinisation. Par exemple, Krox20 et Sox10 permettent l'initiation de l'expression des gènes de la myéline P0 et PMP22. Notch, c-Jun et Sox2, au contraire empêchent cette expression (pour revue (Jessen and Mirsky, 2005b)). Il en est de même dans le SNC avec mTOR, RXR, Nkx2.2, Olig2, Fyn...(pour revue (Boulanger and Messier, 2014)). La balance entre toutes ces voies est fondamentale car l'expression des gènes de la myéline est finement régulée. En effet, une augmentation de l'ordre de 20% de l'expression de la PMP22, par exemple, provoque l'apparition d'une pathologie gravement invalidante : la CMT1-A. Il est donc certain, que les gènes de la myéline sont sujets à des régulations négatives et positives qui les maintiennent à un niveau constant, excepté en cas de lésion. Dans notre travail, nous avons voulu identifier de nouvelles voies impliquées dans le contrôle de l'expression des gènes de la myéline périphérique et centrale.

Ce travail a débuté après que l'on ait observé que le cerveau, le nerf sciatique ainsi que les oligodendrocytes et les CS contenaient des quantités élevées d'oxystérols. De façon intéressante, ces mêmes tissus et cellules expriment les enzymes impliquées dans la synthèse de ces dérivés oxydés du cholestérol. Nous nous sommes alors naturellement interrogés sur leur importance dans les processus de myélinisation.

1- Rôle des oxystérols oxydés sur la chaîne latérale dans le processus de myélinisation :

1.1- Dans le système nerveux périphérique

Les oxystérols oxydés sur la chaîne carbonée latérale du cholestérol sont des ligands des récepteurs nucléaires LXR α et β . Nous avons montré que ces oxystérols, en quantité basale, par un mécanisme autocrine/paracrine, ou après ajout exogène, réduisent l'expression des gènes de la myéline dans les CS. L'inactivation des deux isoformes du LXRs (LXRdKO) provoque une hypomyélinisation causée par une altération de l'expression des gènes de la myéline.

Environ à la même période, d'autres équipes ont publié des résultats convergents. La gaine de myéline étant riche en cholestérol, ces équipes se sont penchées sur les conséquences d'une perturbation de l'homéostasie de ce dernier dans la myélinisation. Ils ont diminué sa quantité en invalidant spécifiquement dans les CS, deux protéines importantes pour sa biosynthèse, la squalène synthase (SQS) (Saher et al., 2005) et la sterol regulatory element-binding protein cleavage action protein (SCAP) (Verheijen et al., 2009). Ces délétions provoquent une hypomyélinisation sévère et une expression anormale des gènes de la myéline périphérique. Chez les souris SQS^{-/-}, la protéine P0 est piégée dans le réticulum endoplasmique et n'est donc plus adressée normalement à la membrane. Les souris SCAP^{-/-} ont, quant à elles, une quantité de transcrits codant pour PMP22 très fortement réduite. Ces études démontrent l'importance du cholestérol dans la myélinisation et la régulation des gènes de la myéline. Or, la principale fonction connue des oxystérols est de contrôler la quantité de cholestérol. Ils diminuent sa biosynthèse et son absorption, augmentent son élimination par les acides biliaires, son excrétion par les transporteurs ABC et sa conversion en AG. Nos résultats indiquent que le traitement des CS par les oxystérols accroît l'expression

de ABCA1. Ceci pourrait augmenter le relargage du cholestérol en dehors de la cellule et ainsi diminuer l'expression des gènes de la myéline.

Nous avons montré que les oxystérols inhibent l'expression des gènes de la myéline P0 et PMP22. Les expériences de ChiP réalisées, nous indiquent que le traitement des CS par les oxystérols augmente la quantité de LXRs liés à leurs éléments de réponse, les LXRE, sur les promoteurs des gènes P0 et PMP22. Un mécanisme plus direct que celui de la régulation de la cholestérolémie par ABCA1, cité ci-dessus, semble également en jeu. Mais, ce mécanisme d'action est inédit. En effet, habituellement, en l'absence de ligand, les récepteurs nucléaires interagissent avec des corépresseurs comme SMRT et N-CoR qui inactivent l'expression des gènes cibles. En revanche, quand les oxystérols se lient aux récepteurs nucléaires, il y a relargage des corépresseurs et recrutement de coactivateurs, permettant ainsi la transcription des gènes cibles. Cependant, il a déjà été montré que l'activation des LXRs par les oxystérols peut inhiber la transactivation des gènes impliqués dans l'inflammation. En effet, Blaschke et al. ont montré que le LXR ligandé exerce un effet répresseur sur l'expression du gène CRP dans les hépatocytes, et ceci grâce la stabilisation du co-répresseur N-CoR (Blaschke et al., 2006).

Pour tenter d'expliquer ce mécanisme inhabituel observé dans le système nerveux périphérique, nous avons mené une première série d'expériences avec RIP140, un corégulateur capable de réprimer la transcription des gènes cibles quand le ligand se lie à son récepteur (Augereau et al., 2006b). Les expériences d'inactivation de RIP140 par des siARN dans les CS de souris montrent que RIP140 intervient dans l'inhibition basale des gènes de la myéline, mais n'a pas d'effet sur l'inhibition induite par les oxystérols. Cette inhibition basale peut s'expliquer par l'action des oxystérols endogènes ou par l'intervention d'autres facteurs de transcription. Mais nous discuterons de RIP140 plus longuement dans le chapitre 3.

Le LXR, pour son action, s'hétérodimerise avec le RXR. Dans les CS, Latasa *et al* ont montré que l'activation du RXR par l'acide rétinoïque (RA) induit l'expression de P0 et MBP par l'intermédiaire de Krox20 provoquant un stress réticulaire. A contrario, l'activation du RAR par le RA diminue l'expression de MAG. L'ensemble de ces mécanismes aboutit à une réduction du nombre de nœud de Ranvier et à une hypomyélinisation du nerf sciatique (Latasa *et al.*, 2010). Ainsi, les oxystérols pourraient, en partie, détourner l'activité du RXR vers le LXR participant alors indirectement à l'inhibition de l'expression des gènes de la myéline.

Enfin, la voie des oxystérols par le biais LXR est responsable, dans les CS, de l'inhibition de la voie Wnt/ β -caténine. Cette voie est cruciale pour l'expression des gènes de la myéline périphérique. Nous détaillerons ceci dans le chapitre 2.

1.2- Dans le système nerveux central

Depuis quelques années maintenant, nous découvrons le rôle prépondérant joué par les LXRs dans le SNC. L'invalidation de ces récepteurs provoque une atrophie axonale, des anomalies dans la lamination du cortex (Fan *et al.*, 2008), une astrogliose, une perte de neurones dopaminergiques du mésencéphale ventral (Sacchetti *et al.*, 2009) ainsi qu'une accumulation lipidique (Wang *et al.*, 2002).

Dans notre étude, nous avons montré que les LXRs sont également importants pour la myélinisation du cervelet. En effet, les souris LXRdKO présentent une réduction de l'épaisseur de leur gaine de myéline. Ceci est corrélé à une diminution de l'expression de MBP et de PLP. A l'inverse, les souris ayant été traitées par le ligand synthétique des LXRs, le T09, voient l'expression de ces mêmes gènes fortement stimulée. L'effet du T09 est sans nul doute dépendant du LXR car on ne retrouve pas cette augmentation chez les souris LXRdKO traitées. Ces résultats sont l'inverse de nos observations réalisées dans le SNP. D'ailleurs, les transcrits

codant pour P0 et PMP22 sont eux aussi diminués dans le cerveau des souris LXRdKO. Ceci laisse à penser que les LXRs régulent l'expression des gènes de la myéline de façon cellule ou du moins tissu spécifique. Il serait d'ailleurs plus juste de parler de régio-spécificité. En effet, contrairement à ce que nous avons observé dans le cervelet, nous n'avons pas constaté, dans la moelle épinière et dans le corps calleux des souris LXRdKO, de variation dans l'expression des gènes de la myéline et l'administration de T09 ne provoque pas de changements significatifs dans les niveaux d'expression de MBP et de PLP (résultats non montrés). Comment expliquer cette spécificité régionale? Nous pouvons formuler quelques hypothèses. Tout d'abord, les LXRs sont exprimés de façon bien plus importante dans le cervelet que dans la moelle épinière et le corps calleux (données NURSA). Nous avons également montré que l'isoforme LXR β (isoforme majoritaire du LXR dans le SNC) est fortement exprimée par les oligodendrocytes (Trousson et al., 2009) et que son expression se trouve même renforcée par leur différenciation (Nelissen et al., 2012). Le traitement par T09 des souris WT provoque une augmentation d'un facteur 15 des transcrits ABCA1 dans le cervelet, alors qu'elle n'est que d'un facteur 6 dans la moelle épinière et d'un facteur 3 dans le corps calleux (résultats non montrés).

Bien que les LXRs soient exprimés dans les oligodendrocytes, ils le sont aussi dans de nombreux autres types cellulaires. En effet, les neurones, la microglie et les astrocytes expriment ces récepteurs (résultats non montrés). Il est donc tout à fait envisageable que ces spécificités régionales soient également dues à un contexte et/ ou à un dialogue cellulaire différent. D'ailleurs, le traitement des oligodendrocytes par le 25OH provoque leur apoptose (par un mécanisme d'action indépendant des LXRs) (Trousson et al., 2009). Les premières observations réalisées sur des cultures primaires enrichies en oligodendrocytes semblent

confirmer ce résultat. La présence des astrocytes pourrait donc être indispensable à l'effet promyélinisant des oxystérols dans le SNC.

Nous nous sommes ensuite intéressés au potentiel thérapeutique du T09 et du 25OH. Sur des cultures organotypiques de cervelet démyélinisées par un traitement à la lysolecithine, l'ajout de ces deux molécules augmente, par le biais des LXRs, le nombre d'axones de cellule de Purkinje remyélinisés. Les mécanismes de la remyélinisation dans le SNC sont totalement différents de la régénération wallerienne du SNP. Dans le SNP, après lésion, les CS perdent leurs contacts axonaux afin de se différencier, de se multiplier, de créer un environnement protecteur et propice à la repousse axonale et enfin se redifférencient en CS myélinisantes pour reformer la gaine de myéline. Les oligodendrocytes ne semblent pas posséder une telle plasticité. La remyélinisation se fait toujours grâce à un nouveau lot d'OPCs. Chez la souris, de manière physiologique, il y a un renouvellement intense des oligodendrocytes du nerf optique. Ce renouvellement se fait par la multiplication des OPCs (Young et al., 2013). Le traitement, par le T09, des tranches lésées augmente la quantité d'OPC Nkx2.2 en favorisant soit leur recrutement soit leur prolifération. Dans ces mêmes conditions de lésions, le 25OH n'augmente pas le nombre d'OPC Nkx2.2. Il se pourrait donc que le T09 et le 25OH aient des mécanismes d'action différents dans certains aspects de la remyélinisation.

Les OPCs, afin de rentrer en contacts avec les axones à myéliniser, forment des protubérances. Le traitement de cultures primaires d'OPC, par le 25OH ou par le T09, accroît la taille et le nombre des prolongements formés par ces cellules. Cela pourrait augmenter le nombre de contacts entre les oligodendrocytes et les axones, permettant ainsi une remyélinisation plus efficace.

Comme nous l'avons mentionné ci-dessus, les oxystérols induisent l'expression de MBP et de PLP. Ces deux protéines, indispensables à la bonne compaction de la gaine de myéline, sont des marqueurs d'oligodendrocytes myélinisants. Le 25OH et le T09 pourraient donc favoriser la différenciation oligodendrocytaire et/ou aboutir, plus rapidement, à une meilleure structure de la gaine. Parallèlement, l'équipe du Pr Franklin a montré que le partenaire des LXRs, le RXR γ , est également impliqué dans la remyélinisation. L'administration d'acide rétinoïque (RA) à des souris ayant subi des lésions de la gaine de myéline permet d'accélérer la remyélinisation en augmentant la différenciation des OPCs en oligodendrocytes matures (Huang et al., 2011). Il est également intéressant de constater que dans des conditions physiologiques, le T09 et le 25OH ne provoquent pas d'hypermyélinisation ou de démyélinisation des gaines. L'action thérapeutique du T09 pourrait se révéler très intéressante, notamment, pour les maladies à composante inflammatoire du système nerveux, comme par exemple la sclérose en plaque. En effet, il pourrait agir sur l'ensemble des phases temporelles de la pathologie. Dans un premier temps, le T09 peut contrôler l'inflammation. En effet, Cui *et al* démontrent clairement le potentiel anti inflammatoire du T09 après EAE. En activant les LXRs, cette molécule, augmente la quantité de ShREBP. Ce dernier va se lier au AhR afin de moduler négativement l'activité des Th17 et ainsi diminuer l'inflammation (Cui et al., 2011). Dans un second temps, comme nous l'avons démontré, le T09 permet une remyélinisation post-lésionnelle plus rapide et plus efficace. Enfin, le T09 promeut la régénération neuronale grâce à l'activation de la voie Pi3K/AKT et à l'inhibition de l'expression du récepteur de Nogo : NgR1 (Chen et al., 2010). Dans les oligodendrocytes, la voie Pi3K/AKT augmente l'expression de MBP et de PLP (Flores et al., 2008). Enfin, il est important de souligner que l'activation du LXR par T09 permet également d'augmenter la production de neuro-progestérone. Cette dernière est connue pour ses capacités

neuroprotective (Robertson et al., 2006) (Stein, 2008) et promyélinisante (Ghoumari et al., 2003) (Garay et al., 2007) (Hussain et al., 2011).

2- La β -caténine, un carrefour incontournable dans l'expression des gènes de la myéline : dialogue entre la voie Wnt/ β -caténine et les oxystérols dans la myélinisation :

Nous avons montrés que les oxystérols régulaient de manière différentielle l'expression des gènes de la myéline périphérique et centrale. Cela n'est pas dû à une différence propre à ces gènes. En effet, nous retrouvons cette disparité d'expression pour P0 et PMP22 dans le SNP et le SNC. Les oxystérols provoquent leur répression dans le SNP mais augmente leur expression dans le SNC. Comment expliquer alors cette disparité ?

Lors de mon arrivée au laboratoire, l'équipe d'accueil travaillait sur la voie Wnt/ β -caténine. Mes collègues ont démontré que l'activation de cette voie, au début de la myélinisation, provoquait une augmentation de l'expression des gènes de la myéline du SNC et du SNP (Tawk et al., 2011).

Un mois après la parution de cet article, Claire Jacob *et al* ont montré qu'à partir de P5 et jusqu'à P21, la quantité de β -caténine active augmente fortement afin de réguler positivement l'expression de Sox10, de Krox20 et de P0 et donc la différenciation et la myélinisation des CS. Ce phénomène est sans doute dépendant de Wnt car la surexpression de DKK1 ou de SRF1 abolit la régulation positive des gènes mentionnés ci-dessus (Jacob et al., 2011). De plus nous avons démontré que le chlorure de lithium, en bloquant l'action de la GSK3 β , augmente la quantité de β -caténine ce qui permet d'accélérer la remyélinisation après une lésion mécanique (nerve crush) du nerf facial et du nerf sciatique chez la souris (Makoukji et al., 2012). Des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine ont montré que les LXRs se lient de façon directe à la β -caténine, *via* les répétitions Armadillo, et inhibe sa

transactivation (Shah et al., 2003). D'autres études ont indiqué que l'activation des récepteurs RXR et PPAR γ par leurs ligands augmente la dégradation de la β -caténine de manière indépendamment de la GSK3 β (Masiello et al., 2004) (Xiao et al., 2003). Nous nous sommes donc interrogés sur l'existence possible d'un dialogue entre les oxystérols et la voie Wnt/ β -caténine. Nous avons montré que les oxystérols, dans le SNP, entraînent une diminution de la quantité d'ARNm codant pour les principaux composants de la voie Wnt/ β -caténine. De plus, nous avons observé, par microscopie confocale, que la β -caténine, suite au traitement par les oxystérols, est relocalisée dans l'appareil de Golgi. Avec le réticulum endoplasmique, cet organe est le siège des glycosylations protéiques. La β -caténine subit des O-N-acétylglucosaminylation (O-GlcNac) dans les MCF7 (Zhu et al., 2001) et dans les cellules cancéreuses de colon (Sayat et al., 2008) afin de diminuer sa quantité nucléaire et donc son potentiel transactivateur. Cette observation a été validée par des expériences de CHIP montrant que les oxystérols décrochent la β -caténine des facteurs de transcription TCF/LEF situés au niveau des promoteurs de MPZ et PMP22. Ces résultats sont confirmés *in vivo* : l'inactivation des LXRs chez la souris induit une surexpression de la β -caténine dans le nerf sciatique.

Nous pouvons donc conclure qu'une partie du mécanisme d'action des oxystérols visant à réduire l'expression des gènes de la myéline dans le SNP passent par une diminution de la quantité de β -caténine liée aux promoteurs de ces gènes.

L'ensemble de nos résultats nous permet de proposer le modèle d'action suivant :

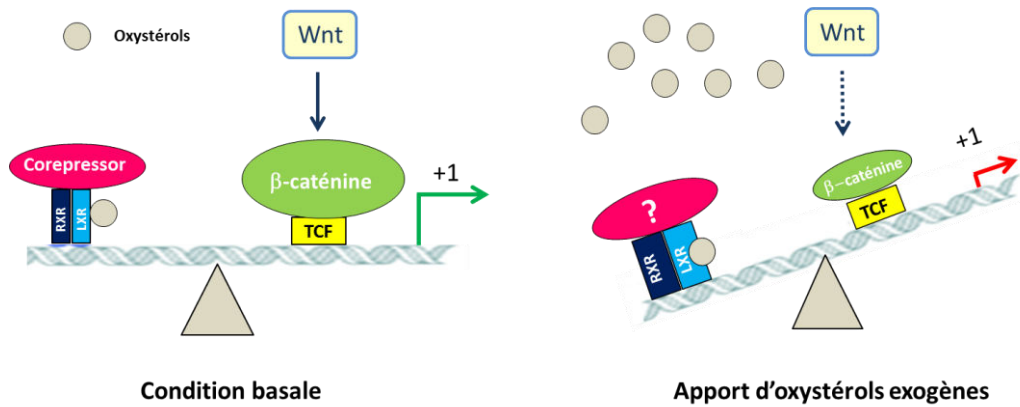


Figure 52 : Modèle schématique du dialogue entre les oxystérols et la voie Wnt/ β -caténine pour la régulation de l'expression des gènes de la myéline périphérique. En condition basale, l'équilibre entre la voie Wnt/ β -caténine et les LXR permet une régulation fine de l'expression de *PO* et de *PMP22*. Les ligands Wnt en activant la voie Wnt permettent la liaison de la β -caténine sur les éléments de réponse aux TCFs des promoteurs *PO* et *PMP22*, favorisant ainsi leur activité transcriptionnelle. Les oxystérols endogènes répriment l'activité des promoteurs *PO* et *PMP22*, en permettant la liaison de leurs récepteurs, les LXR, sur leurs éléments de réponses LXRE, et en contrôlant la quantité de β -caténine. L'apport d'oxystérols exogène favorise la liaison des LXR sur les LXRE et réprime les constituants de la voie Wnt/ β -caténine. Il y aura alors un déséquilibre en faveur de la voie des LXR aboutissant à une diminution de l'expression de *PO* et *PMP22*.

Mais qu'en est-il du dialogue entre la voie Wnt/ β -caténine et les oxystérols dans le SNC ? Est-ce qu'une différence dans ce dialogue pourrait expliquer l'effet opposé des oxystérols entre le SNC et le SNP ?

Contrairement à nos observations dans le SNP, le 25OH augmente la quantité de transcrits des composants de la voie Wnt/ β -caténine dans les oligodendrocytes. Ceci est corrélé à l'inhibition des transcrits β -caténine dans le cerveau des souris LXRdKO. Mais de manière surprenante, le taux protéique de β -caténine est diminué au niveau oligodendrocytaire et est augmenté dans le cerveau des animaux LXRdKO. Cette divergence entre transcrits et protéines pourrait être la résultante d'un rétrocontrôle post traductionnel visant, dans le cas des 158N, à diminuer l'expression des gènes de la myéline induite par le 25OH, en abaissant la quantité de β -caténine. A l'inverse, dans le cas des animaux LXRdKO, l'augmentation de la β -caténine permettrait de rattraper le déficit d'expression de PLP et

MBP. De manière intéressante, nous avons constaté que contrairement aux quantités détectées dans le cerveau, la quantité protéique de β -caténine est diminuée de moitié dans le cervelet des souris LXRdKO (résultats non montrés). Ceci pourrait expliquer la diminution de MBP et PLP spécifique au cervelet de ces animaux.

Dans le SNC, la fonction de la voie Wnt/ β -caténine dans le processus de myélinisation est un peu plus complexe que dans le SNP. De nombreux articles indiquent que cette voie retarde la différenciation des OPCs en oligodendrocytes (Shimizu et al., 2005) (Feigenson et al., 2009) (Ye et al., 2009) (Fancy et al., 2011). Ces résultats semblent contraires à ceux publiés par notre équipe qui montrent que la voie Wnt active l'expression de MBP et de PLP dans les oligodendrocytes. Cependant, dans cet article, il n'est pas question de différenciation mais d'expression des gènes de la myéline MBP et PLP. La voie Wnt/ β -caténine pourrait être un régulateur négatif de la différenciation des oligodendrocytes mais un stimulateur des gènes de la myéline. Ceci n'est pas surprenant, car il est rare qu'une voie unique participe de la même façon à toutes les étapes du développement. Dans le SNP, Claire Jacob indique que, à P2, l'HDAC1, en régulant négativement la quantité de β -caténine active, protège les CS de l'apoptose. En revanche, à P5 l'expression de la β -caténine active augmente fortement afin de réguler positivement l'expression de Sox10, Krox20 et P0 (Jacob et al., 2011). D'ailleurs l'induction par Wnt1 de cultures primaires gliales enrichies en OPCs ne stimule pas l'expression de PLP alors que la même induction sur des cultures primaires gliales enrichie en oligodendrocytes active l'expression de PLP (Tawk et al., 2011). Nous pouvons citer dans ce sens l'exemple de la voie Notch. Cette voie, qui comme la voie Wnt est pléiotropique, régule différenciellement toutes les étapes du développement de la lignée schwannienne. Par exemple, au stade embryonnaire, la voie Notch accélère la différenciation des précurseurs des

CS en CS, tout en contrôlant leur prolifération. Après la naissance, la voie Notch régule négativement la myélinisation (Jessen and Mirsky, 2005b). Ainsi, si la voie Wnt s'avèrerait favorable à la multiplication, spécification, différenciation puis expression des gènes de la myéline, ceci aurait un effet très délétère car les axones seraient myélinisés avant la naissance ce qui empêcherait le remodelage des synapses et figerait les axones dès la naissance. De plus, nous avons montré que la suractivation de la voie Wnt par la délétion de NF1 était responsable de l'induction de la tumorigenèse des CS.

Enfin, comme nous l'avons mentionné ci-dessus, il est important de prendre en compte l'environnement cellulaire. Dans une étude qui n'est pas encore publiée, l'équipe du Dr Gressen montre une différence d'action de la voie Wnt sur les oligodendrocytes en fonction de la présence ou de l'absence de microglie. La voie Wnt favorise la prolifération et retarde la différenciation des OPCs dans un environnement riche en microglie, alors qu'au contraire cette voie promeut la différenciation des OPCs et l'expression des gènes de la myéline dans un environnement où la microglie est absente. Il est à noter que la substance grise est plus riche en microglie que la substance blanche et que le cervelet est l'une des régions cérébrales les plus pauvres en microglie (Lawson et al., 1990). Ceci pourrait encore une fois expliquer en partie nos résultats observés spécifiquement dans cette région.

3- Rôle de RIP140 dans la myélinisation :

3.1- Dans les cellules de Schwann de souris

Comme nous l'avons mentionné ci-dessus RIP140 n'intervient pas dans le changement d'expression des gènes de la myéline après traitement par les oxystérols. En revanche, il semble être important pour la régulation de l'expression basale de PO et PMP22. En effet, son invalidation dans les cellules de souris MSC80 provoque une augmentation de l'activité transcriptionnelle de ces gènes, ce qui se répercute sur la quantité de leurs ARNm. Donc, il

semblerait que RIP140 endogène régule négativement l'expression des gènes de la myéline périphérique. Cependant, à notre grande surprise, la surexpression de RIP140 entraîne également une augmentation de l'activité transcriptionnelle de P0 et de PMP22. Pour autant, RIP140 est capable de jouer un rôle à la fois de coactivateur et de corépresseur en fonction des gènes cibles au sein d'un même type cellulaire (Ordóñez-Morán and Muñoz, 2009). Par ailleurs, dans les cultures primaires d'hépatocytes de souris, RIP140 a été montré dans une étude comme étant un coactivateur (Herzog et al., 2007) et dans un autre article comme étant un corépresseur (Berriel Diaz et al., 2008) des LXRs régulant ainsi positivement ou négativement l'expression des gènes de la lipogenèse FAS, SCD-1 ou SREBP1c.

De plus, RIP140 possède de nombreux motifs d'interaction, offrant ainsi une importante diversité de recrutement de récepteurs nucléaires et autres facteurs de transcriptions. Ainsi, afin d'expliquer l'ambiguïté d'action de RIP140 sur les gènes de la myéline, nous pouvons supposer qu'en condition basale, RIP140 jouerait un rôle de corépresseur sur l'expression des gènes de la myéline P0 et PMP22 grâce à une interaction de forte affinité avec un récepteur nucléaire impliqué dans la régulation négative de ces mêmes gènes. A contrario, une surexpression de RIP140, le ferait évoluer vers un rôle de coactivateur. En effet, l'augmentation de quantité de RIP140, permettrait sa liaison avec d'autres récepteurs nucléaires de plus faibles affinités, mais impliqués dans une régulation positive de P0 et PMP22. De plus, comme l'ont avancé Castet *et al* en 2006 pour expliquer le rôle coactivateur de RIP140 sur les gènes cibles du ERR, celui-ci pourrait séquestrer les enzymes répressives de la transcription. Il serait donc possible que RIP140 surexprimé chélate les HDACs et par conséquent active l'expression des gènes de la myéline (Castet et al., 2006).

3.2- Chez le poisson zèbre

L'invalidation partielle de l'un des orthologues de RIP140 (nRIP1a) chez le poisson zèbre provoque une inhibition de l'expression du gène de la myéline périphérique (MBP) dans la PLLn et centrale dans la moelle épinière (MBP et MPZ). La gaine de myéline chez ces poissons est au mieux décompactée et au pire absente. La migration et la présence des CS ainsi que la mise en place des axones (ce qui ne sous-entend rien sur leurs fonctionnalités) n'est pas impactée par l'invalidation de RIP140. Cette invalidation n'étant pas spécifique du lignage schwannien ou oligodendrocytaire nous ne pouvons pas exclure que le phénotype observé soit relié à un dialogue entre les neurones et les cellules myélinisantes. Cependant, nous pouvons penser que RIP140 régule la myélinisation, du moins en partie, en permettant l'expression des gènes de la myéline chez le poisson zèbre. Comme chez les mammifères, l'expression des gènes de la myéline périphérique est régulée par la séquence d'activation des gènes Sox10 et Krox20 (Monk et al., 2009) faisant ainsi passer la CS du stade pro-myélinisant à celui de myélinisant. Nos résultats préliminaires semblent indiquer que l'invalidation partielle de RIP140 provoque une diminution de l'expression de Sox10 et de Krox 20 à 3dpf.

Comment expliquer la différence induite par l'invalidation de RIP140 entre la souris et le poisson zèbre ?

- Est-ce dû à un problème d'espèce ?

Le poisson zèbre est un modèle d'étude reconnu dans la myélinisation (Lyons et al., 2005) (Kirby et al., 2006) (Buckley et al., 2008). La grande majorité de la machinerie moléculaire impliquée dans la myélinisation est conservée entre le poisson zèbre et les mammifères (Monk and Talbot, 2009). En revanche, la comparaison de séquence entre la protéine murine RI140 et la protéine nRIP1a du poisson zèbre ne révèle que 34% d'homologie. Cependant, les motifs important comme les NR boxes et PINLS sont conservés.

- Est-ce causé par une différence de système ?

A la différence de la culture cellulaire, les études *in vivo* font intervenir beaucoup plus de paramètres. L'invalidation partielle de RIP140 n'est pas spécifique de la CS et il faut tenir compte de l'interconnexion entre les différents types cellulaires. De plus, l'oligomorpholino est injecté au stade 1 cellule. Il y a donc un effet développemental. Contrairement aux expérimentations réalisées avec le siARN qui induisent un mécanisme aigu, avec l'oligomorpholino nous nous rapprochons plus d'un effet chronique. Enfin, l'efficacité et les mécanismes de ces deux techniques d'invalidation n'étant sans doute pas équivalents, nous pourrions avoir une différence d'effet comme celle observée entre Herzog *et al* et Berriel Diaz *et al*.

4- Rôle du AhR dans la myélinisation

Après nous être intéressés aux rôles des oxystérols oxydés sur la chaîne carbonée latérale du cholestérol et de leurs récepteurs LXRs dans la myélinisation, nous nous sommes penchés sur la fonction du cholestérol oxydé en position 7 du cycle carboné (B). Ce dernier module l'action du AhR.

Ce récepteur est surtout connu des toxicologues pour sa capacité à interagir avec les polluants aromatiques comme les dioxines et les PCBs. Cependant, son apparition dans l'évolution est antérieure à sa fonction détoxifiante. En effet, le AhR des invertébrés est incapable d'interagir avec les ligands exogènes du AhR des vertébrés (Reitzel et al., 2014). Chez les invertébrés, plusieurs études ont démontré l'importance physiologique de ce récepteur dans le système nerveux, notamment dans la régulation de l'arborisation dendritique (Huang et al., 2004) (Kim et al., 2006). En est-il de même chez les vertébrés?

Les CS expriment le AhR. L'expression de ce récepteur dans le SNP est précoce. Il est

déecté dès E10 dans le ganglion trigéminal (Abbott and Probst, 1995) et à E12 dans les ganglions rachidiens (Aline Chevallier, résultat non publié) chez la souris.

Les ligands endogènes du AhR (le triptophane et ses dérivés, le FICZ) sont encore à ce jour mal connus (Wei et al., 1998) (Opitz et al., 2011). Ils ne commencent à être identifiés que depuis quelques années. Jean-Francois Savouret *et al*, en 2001, ont démontré que le 7KC est un puissant modulateur de l'activité du AhR (Savouret et al., 2001). Cet oxystérol est capable de déplacer, à faible dose, la liaison de la TCDD, le plus puissant agoniste connu du AhR, et ainsi empêcher l'induction de l'activité transcriptionnelle de l'un de ses gènes cibles : le CYP1A1. Il est intéressant de constater qu'il existe une corrélation entre le niveau d'expression de la 7-HCD, une des enzymes de synthèse du 7KC, et la toxicité de la TCDD. En effet, le hamster qui est une espèce résistante à la TCDD (LD50>3mg/Kg) (Hengstler et al., 1999) exprime fortement cette enzyme (Song et al., 1996). Au contraire, la 7-HCD n'est pas détecté dans le foie des souris (Song et al., 1991) or cette espèce est plus sensible à la TCDD (LD50>150µg/Kg) que le hamster. Par ailleurs, nous avons montré par GC/MS que le 7KC est l'oxystérol majoritairement présent dans le nerf sciatique et dans les MSC80, loin devant le 25OH, 24(S) et le 27OH. Ceci pourrait expliquer la résistance de ces cellules à de fortes doses de TCDD (supérieur à 800nM) ainsi que l'absence d'effet de cette dioxine sur la régulation transcriptionnelle des gènes de la myéline périphérique. Ainsi le 7KC pourrait protéger la myéline des effets toxiques des POPs.

Afin d'étudier le rôle endogène du AhR, nous avons travaillé sur une lignée de souris invalidées pour le AhR (Fernandez-Salguero et al., 1995). Cette invalidation provoque d'importants troubles de la locomotion, de la coordination et de l'équilibre moteur. Ces déficits comportementaux peuvent avoir de multiples origines : musculaires, cérébelleuses, vestibulaires... Bien que cela ne sous entende rien d'un point de vue fonctionnel pour le

système locomoteur, le cervelet des souris AhR^{-/-} ne présente pas de défauts architecturaux et le système vestibulaire régulant le réflexe oculaire ne semble pas non plus endommagé chez ces souris (Chevallier et al., 2013). Comme dans de nombreuses maladies neurodégénératives d'origine myélinique (CMT, HNPP...), ces déficits moteurs pourraient être, au moins en partie, la résultante d'une malformation de la gaine de myéline conduisant à une diminution de la vitesse de conduction nerveuse aboutissant, *in fine*, à une atrophie musculaire.

Afin de mettre en évidence, chez les souris AhR^{-/-} une éventuelle atteinte de la gaine de myéline, nous avons étudié la morphologie des gaines par microscopie électronique. Chez les souris adultes comme chez les juvéniles (P7), nous avons constaté une hétérogénéité phénotypique structurale des gaines de myéline. Nous avons classé les souris AhR^{-/-} en 2 groupes. Le premier groupe (sévère) présente des anomalies majeures de la gaine, avec présence de débris myéliniques. Les axones semblent eux aussi touchés puisqu'ils ont perdu leur forme circulaire au profit d'une morphologie tortueuse. Dans le second groupe (modéré), en revanche, nous n'avons remarqué aucune déformation majeure de la gaine de myéline (décompactations...). Cependant, ces souris, à l'âge adulte, présentent un g-ratio supérieur à celui des WT quel que soit le périmètre des axones. Ceci traduit un affinement de la gaine, et donc une hypomyélinisation des nerfs sciatiques des souris AhR^{-/-}. Cette hypomyélinisation semble progressive puisqu'à P7 nous ne constatons aucune différence significative dans les valeurs des g-ratio entre les deux génotypes. En revanche, la tendance est déjà marquée. Il est intéressant également de signaler que la dichotomie entre les deux groupes sévère et modéré n'est pas toujours tranchée. En effet, chez certains animaux, nous avons constaté, un phénotype sévère à la périphérie du nerf et un phénotype modéré dans des régions plus centrales. Cela pourrait indiquer soit une propagation centripète de la déformation myélinique, soit une fragilité plus importante de la myéline des animaux AhR^{-/-} et donc une

déformation de la gaine lors du prélèvement du nerf sciatique.

Ainsi, ces altérations de la gaine de myéline pourraient être la cause des déficits locomoteurs constatés.

P0 et PMP22 sont les deux protéines majoritaires de la myéline du SNP. Leur niveau ainsi que leur temporalité d'expression sont des facteurs cruciaux pour la bonne structure de la gaine de myéline. A P7, l'invalidation du AhR provoque une diminution de l'expression de P0 et de PMP22. Au contraire, les souris AhR^{-/-} d'âge adulte présentent une augmentation de l'expression de P0 et PMP22. La surexpression (*i.g* CMT1A) ou sous expression (*i.g* HNPP) de ces protéines sont délétères pour la gaine de myéline. A l'heure actuelle, il nous est difficile d'expliquer cette divergence. Mais nous pouvons avancer plusieurs pistes pour y répondre.

Premièrement, les souris AhR^{-/-} P7 présentent une réduction du nombre d'axones myélinisés. Ce déficit est transitoire car cette différence n'est plus visible à l'âge adulte. Nous pouvons donc envisager une corrélation entre la réduction du nombre d'axones myélinisés et la diminution de l'expression de P0 et de PMP22.

Deuxièmement, lors de la modulation du AhR dans les CS *in vitro*, nous avons retrouvé cette divergence d'action sur les gènes de la myéline périphérique. La surexpression du AhRR dans les MSC80 provoque une diminution de l'activité transcriptionnelle des promoteurs P0 et PMP22, et la surexpression du AhR induit l'effet inverse. Cependant, l'invalidation de AhR, par un siARN, entraîne une augmentation de l'activité transcriptionnelle des promoteurs P0 et PMP22. Ceci se répercute sur la quantité de ces transcrits. Mais cet effet n'est particulièrement visible qu'à partir de 48h alors que l'invalidation de AhR est déjà bien marquée après 24h.

Le logiciel Genomatix MatInspector a révélé que les promoteurs des gènes codant pour P0 et PMP22 possèdent des séquences XRE. Comme nous l'avons évoqué, le AhRR réprimerait l'action génomique du AhR en rentrant en compétition avec lui pour son partenaire, l'ARNT,

ainsi que pour les séquences XRE (Hahn et al., 2009). Il semblerait donc que le AhR favorise l'activité transcriptionnelle de P0 et PMP22. Cependant nous devons déterminer, par des expériences de ChiP, si son action est directe ou indirecte.

Chez l'homme, le cancer du côlon est fréquemment associé à une augmentation suivie d'un emballement de l'activité de la voie Wnt/ β -caténine (Hovanes et al., 2001). Le même phénomène a été observé dans les oligodendrocytes invalidés pour APC (Fancy et al., 2014). Le AhR est également impliqué dans le cancer du côlon puisque son invalidation, en augmentant la quantité de β -caténine, favorise l'apparition de ce type de cancer chez la souris. Le AhR est un composant essentiel du complexe ubiquitine ligase E3 permettant la dégradation de la β -caténine présente dans la fraction soluble par le protéasome (Kawajiri et al., 2009). Contrairement à la surexpression du AhR ou du AhR, l'invalidation du AhR par siARN, dans les CS, provoque une augmentation de la fonctionnalité de la β -caténine dès 24h. Cela pourrait, comme dans les cellules cancéreuses de colon et les oligodendrocytes, amorcer l'activation de la voie Wnt/ β -caténine à 48h et donc l'augmentation de l'expression de P0 et PMP22. Il se pourrait donc que l'inhibition de l'activité transcriptionnelle de P0 et PMP22 par un effet génique du AhR soit masqué par la régulation protéique de la β -caténine. Les résultats préliminaires obtenus *in vivo* semblent confirmer eux aussi un mécanisme de régulation différentiel des gènes de la myéline par le AhR, corrélé au niveau d'expression de la β -caténine. En effet, à P7, nous n'avons pas observé de variation d'expression de la β -caténine entre les animaux WT et AhR^{-/-}. En revanche, à P14, il semblerait que la quantité de β -caténine ait tendance à être plus élevée chez les AhR^{-/-} que chez les WT. Nous constatons alors un changement de système car la PMP22 est surexprimée par les AhR^{-/-}. La quantité de P0 est également augmentée car ces animaux rattrapent le déficit d'expression observé à P7. Mais la suractivation de la voie Wnt/ β -caténine ne semble pas intemporelle. A 8 semaines, nous avons

observé, chez les animaux AhR^{-/-}, une diminution de la quantité des transcrits codant pour P0 et PMP22 ainsi que ceux codant pour les constituants de la voie Wnt. Il pourrait s'agir d'un mécanisme de rétrocontrôle visant à limiter la surexpression protéique de P0 et de PMP22.

AhR est impliqué dans l'expression des gènes de la myéline périphérique

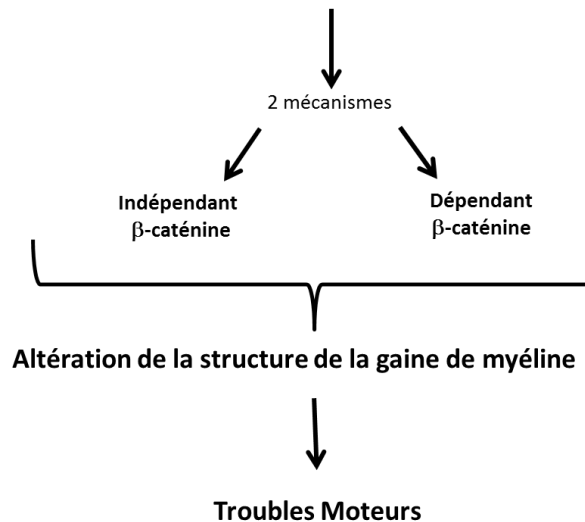


Figure 53 : Schéma récapitulatif de l'action du AhR dans la régulation de la myélinisation. AhR serait impliqué dans la modulation de la myélinisation via deux mécanismes distincts. Le premier serait indépendant de la β -caténine alors que le second modulerait positivement la quantité de β -caténine.

Dans ce travail, nous avons montré que le AhR est impliqué dans l'expression des gènes de la myéline et ce probablement par l'intermédiaire de deux mécanismes différents. Le premier est indépendant de la β -caténine tandis que le second semble lié à l'activité de la voie Wnt/ β -caténine comme l'attestent les expériences d'inactivation par siARN ou dans les souris AhR^{-/-}. L'inactivation du AhR provoque donc une atteinte de la gaine de myéline conduisant à des déficits moteurs.

5- Conclusion générale

Le travail que nous avons réalisé a un double impact :

D'un point de vue fondamental, il nous permet de mieux comprendre les voies de signalisations gouvernant le processus de myélinisation. Nous avons mis en évidence des dialogues complexes entre la voie des oxysterols relayés par le LXR et le AhR et la voie Wnt/ β -caténine. La cellule de Schwann ou l'oligodendrocyte module ces voies de signalisation pour obtenir un niveau d'expression basal des gènes de la myéline et éviter une éventuelle surexpression ou sous-expression qui sont délétères pour la formation de la gaine de myéline. Un équilibre délicat se met en place par un jeu de compensation entre ces différentes voies de signalisations pour aboutir à une expression invariable de ces gènes.

D'un point de vue thérapeutique, nous avons modulé ces voies pour permettre une réexpression des gènes de la myéline en cas de lésion. Nous avons profité de la participation de la voie Wnt dans l'expression des gènes de la myéline pour mimer son effet en cas de lésion du nerf périphérique. Le lithium, stabilisateur de la β -caténine, a permis une remyélinisation après lésion des nerfs sciatiques et faciaux. Dans la même philosophie, nous avons utilisé des modulateurs du LXR pour remyéliniser le cervelet après une démyélinisation chimique par la lysolécithine. L'équipe de KA Nave s'est appuyée sur nos résultats montrant une inhibition de PMP22 par le LXR pour développer une thérapie de la CMT1A basée sur des modulateurs du LXR

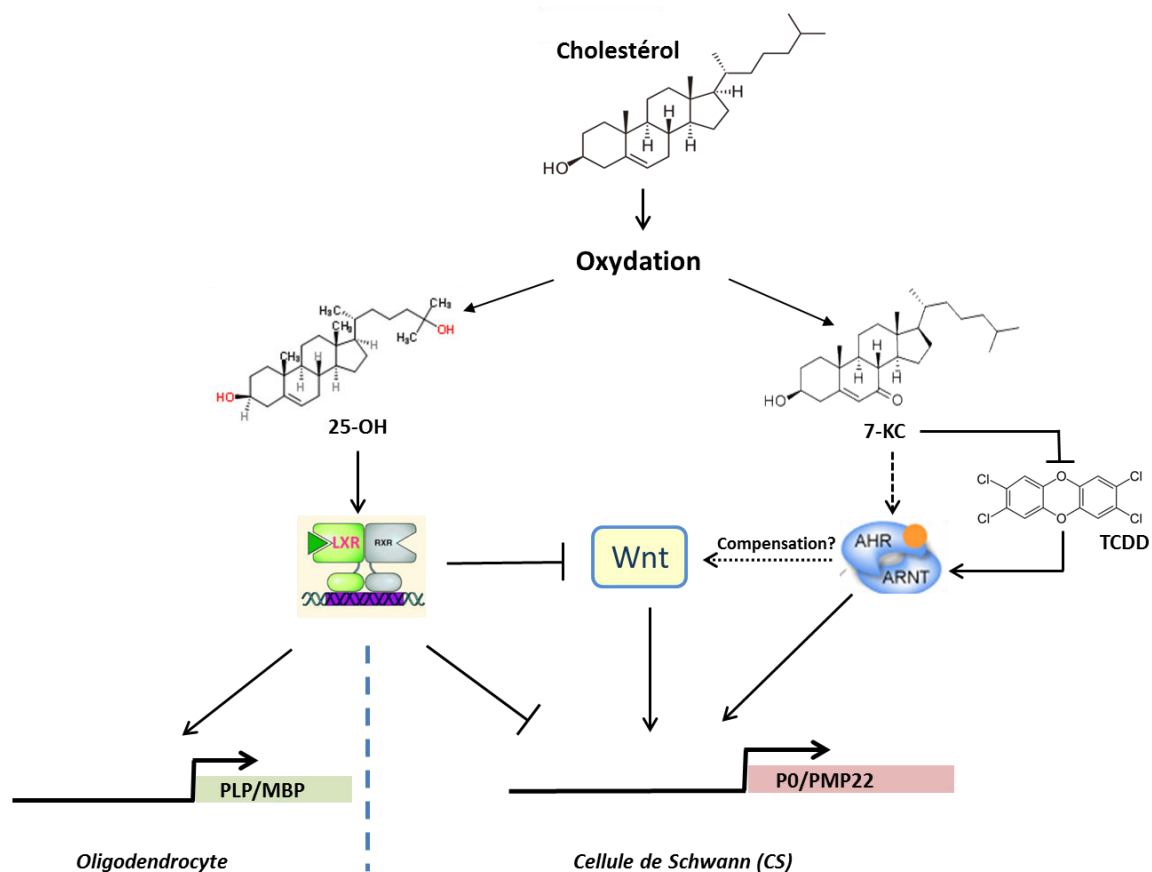


Figure 54 : Schéma récapitulatif de mes travaux de thèse. Les oxystérols sont des dérivés oxydés du cholestérol. Ils sont divisés en deux groupes. Le premier groupe, dont fait partie le 25OH, est constitué par les oxystérols oxydés sur la chaîne latérale du cholestérol. Ils se lient aux récepteurs LXR. Dans les oligodendrocytes, ils activent l'expression des gènes de la myéline MBP et PLP. Ces ligands des LXR améliorent la remyélinisation après démyélinisation par la lysolécithine. Dans les CS, ces oxystérols répriment les gènes de la myéline PO et PMP22, par une action directe des LXR et par une inhibition de la voie Wnt/ β -caténine. Le 7KC est un oxystérol du deuxième groupe, oxydé sur le noyau stérol du cholestérol. Cet oxystérol est un modulateur du récepteur à la dioxine, le AhR. Il empêche l'action de la TCDD sur ses gènes cibles. Le AhR active l'expression des gènes de la myéline périphérique. Son invalidation entraîne une augmentation de l'activité de la voie Wnt, soit par compensation, soit par un effet propre aboutissant à une expression accrue de PO et de PM22.

Perspectives

Mon travail de thèse ne représente pas une finalité. Bien au contraire. Il n'est que la suite du travail de mes prédécesseurs et le début de celui de mes successeurs. Dans les prochains paragraphes, je tenterais de déterminer les principaux axes des projets qui seront développés.

LXR et remyélinisation – mécanistique moléculaire

Nous avons montré que les oxystérols induisaient une remyélinisation des axones des cellules de Purkinje. Cependant le mécanisme d'action de ce processus reste encore à éclaircir. Nous avons vu que le T09 et le 25OH augmentait la quantité d'OPC Nkx2.2+ dans des conditions « physiologique » de culture. En revanche, après lésion seul le T09 est capable d'augmenter cette population oligodendrocytaire. Il semblerait donc que le 25OH n'ait pas exactement la même mécanique d'action que le T09, ou est-ce une **question de cinétique** ? Les comptages ont été effectués 72h après le traitement. Nous devrions envisager de regarder la quantité de cellule Nkx2.2+ après une cinétique de traitement plus courte (16h, 24h et 48h). Nous pouvons également nous interroger sur la provenance de ces OPCs. Sommes-nous dans un **processus prolifératifs** ? Si oui, nous devrions constater un co-marquage Ki67/Nkx2.2. Les oxystérols sont-ils capables d'induire la **migration** d'OPCs vers le lieu de la lésion ? Pour répondre à cette question, nous pouvons tenter de réaliser des co-cultures organotypiques de cervelet et de tronc cérébral, qui est un réservoir très riche en OPCs.

Pour une remyélinisation optimale, il faut un recrutement des OPCs sur le lieu de la lésion et une différenciation rapide de ces derniers. Vu la capacité du T09 à stimuler l'expression de PLP et MBP et d'augmenter la population Nkx2.2+, il semblerait que le T09 possède ces deux caractéristiques.

Par ailleurs, nous avons montré une interaction fonctionnelle entre la voie Wnt et les LXR. Or, comme nous l'avons répété dans ce manuscrit, **la voie Wnt/ β -caténine** est centrale dans le processus myélinique. Fancy *et al* ont montré que la remyélinisation était accélérée par l'inhibition de cette voie (Fancy et al., 2011). Ceci est en contradiction avec nos résultats préliminaires qui semblent indiquer que le T09 et le 25OH augmente l'expression des constituants de la voie Wnt/ β -caténine après lésion. De plus, les études que nous menons en parallèle sur l'influence du Lithium sur la remyélinisation du cervelet indique clairement que la stimulation de la voie Wnt/ β -caténine est bénéfique. Des études plus approfondies devront être menées.

LXR et remyélinisation – mécanistique tissulaire

Lors de la soumission de cet article, la principale question des « reviewers » étaient : L'action des LXRs est-elle portée **spécifiquement par les oligodendrocytes** ? Répondre à cette interrogation est complexe, nous pouvons envisager deux stratégies :

- créer une souris LXRs dKO spécifiquement dans les oligodendrocytes
- utiliser des cultures primaires d'oligodendrocytes purs

Réaliser un LXRs dKO spécifiquement dans les oligodendrocytes est délicat car les deux isoformes α et β du LXR sont codés par deux gènes différents, ce qui réduit considérablement la probabilité d'obtenir une souris invalidée pour les LXR α et β spécifiquement dans les oligodendrocytes.

Concernant les cultures d'oligodendrocytes, les cultures primaires que nous avons réalisées sont des cultures gliales mixtes OPCs/Astrocytes. Nous ne pouvons donc pas exclure que l'effet des oxystérols sur la population oligodendrocytaire est relayé par les astrocytes. En effet, un traitement au 25-OH de nos cultures mixtes ne semble pas induire de toxicité alors

que nous avons montré que les oxystérols sont toxiques pour la lignée oligodendrocytaire 158N (Trousson et al., 2009). De plus, un résultat préliminaire obtenu, avec l'aide du Dr Nait-Oumesmar, à partir d'oligosphères traitées par le T09 et le 25OH semble aller dans ce sens : le 25-OH peut induire l'apoptose des oligodendrocytes. Ainsi les astrocytes paraissent être indispensable aux effets bénéfiques des oxystérols sur la myéline.

Actuellement, nous tentons de réaliser des **cultures primaires enrichies en OPCs** que nous pourrions induire par les oxystérols afin de comparer les niveaux d'expression des gènes de la myéline avec ceux obtenus sur les cultures mixtes. Cette technique est assez délicate chez la souris, d'autant que les oligodendrocytes purifiés ne survivent que quelques jours en culture.

Afin d'étudier l'importance des LXR dans le dialogue oligodendrocytes/astrocytes, nous envisageons de réaliser des cultures gliales mixtes où les OPC proviendront de souris LXRdKO alors que les astrocytes proviendront des souris WT (et inversement). Nous étudierons l'expression des gènes de la myéline en condition basal ou après traitement par les oxystérols.

LXR et myéline – modèle alternatif

Afin de s'affranchir du modèle murin, nous commençons à travailler sur **le poisson zèbre**. Nous avons débuté une série d'expérience visant à invalider le LXR (le poisson zèbre ne possède pas d'isoforme du LXR) spécifiquement dans les oligodendrocytes. Pour ce faire nous utilisons un oligomorpholino photoactivable dirigé contre le LXR. Ce dernier est injecté dans la lignée transgénique MBP ::EGFP. Cela nous permet de visualiser dès le début de la myélinisation les oligodendrocytes et donc de photoactiver l'oligomorpholino spécifiquement dans ces cellules. Nous pouvons également réaliser cette expérience sur des OPCs grâce à la

lignée Nkx2.2 ::EGFP. Les premiers résultats sont encourageants. Nous avons montrés que l'invalidation totale du LXR chez le poisson zèbre entraîne, comme chez la souris, une réduction de l'expression des gènes de la myéline. De plus, nous arrivons, grâce à un microscope biphotonique, à photoactiver spécifiquement les oligodendrocytes. Si nous arrivons à mener au bout ce projet, cela nous permettra, certes, de savoir si l'action du LXR est spécifiquement oligodendrocytaire, mais nous aurons également développer un outil permettant d'invalider spécifiquement l'expression d'une protéine dans une cellule et non plus dans une population cellulaire (utilisation de contrôle interne) et cela au stade de développement désiré (il ne faut pas n'ont plus que ce stade soit trop tardif car nous risquons d'avoir une dilution de l'oligomorpholino).

AhR et myéline

Lors de ma thèse, nous avons également montré que le AhR régula l'expression des gènes de la myéline périphérique. Nous avons constaté une diminution de l'expression de P0 et PMP22 chez les souriceaux p7 invalidés pour ce récepteur et une augmentation de l'expression de ces protéines chez les souris adultes. Nous devons donc déterminer à quel stade développemental s'effectue cette bascule. Les résultats préliminaires semblent indiquer un changement du profil d'expression de ces gènes à P14. Nous devons confirmer cela à P21.

La régulation de l'expression des gènes de la myéline par le AhR semble faire intervenir deux mécanismes d'action. Le premier est indépendant de la β -caténine. Il pourrait être causé par une liaison directe du AhR sur les promoteurs de P0 et de PMP22. Afin de vérifier cela, nous réaliserons des immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) de ce récepteur sur les XRE des gènes de la myéline. Si le résultat est positif, nous déterminerons la nature des corégulateurs interagissant avec AhR. Nous penchons vers la liaison d'un coactivateur comme

CBP ou SRC (p160). Le second mécanisme semble dépendant de la voie Wnt/ β -caténine. Cette voie commence à être active entre P5 et P7 (Jacob et al., 2011) (Tawk et al., 2011). Il serait donc intéressant de corréler l'activité de cette voie au profil d'expression de P0 et PMP22 des animaux invalidés pour le AhR. Nous envisageons d'effectuer des ChIP de la β -caténine in-vivo sur les promoteurs des gènes de la myéline des souris AhR^{-/-} au cours du développement.

L'analyse des facteurs de transcription contrôlant la cinétique de myélinisation sera également effectuée. Les derniers résultats obtenus indiquent que les animaux AhR^{-/-} à p7 présentent une augmentation de l'expression de Sox2. Aucune variation de Krox20 n'a été constatée. Cela confirme l'inhibition de P0 et de PMP22 à ce stade du développement.

Les troubles locomoteurs des souris AhR^{-/-} sont, au moins en partie, la conséquence de l'altération myélinique les frappant. Afin de confirmer cela, nous mesurons la vitesse de conduction nerveuse et rechercherons une éventuelle atrophie musculaire de ces animaux.

L'activation du AhR par ces ligands (TCDD) provoque la libération de la Src kinase qui sera alors à son tour active (Köhle et al., 1999). Elle phosphorylera les kinases FAK (Tomkiewicz et al., 2013) et RAS. FAK est acteur positif de la myélinisation (Grove et al., 2007). RAS est une protéine carrefour qui pourra entre autre activé la voie AKT et la voie ERK qui sont également impliquées dans la myélinisation. Il serait donc intéressant d'étudier le statu de Src chez les animaux invalidé pour AhR.

Chez les invertébrés AhR régule l'arborisation dendritique des neurones du SNP (Kim 2006). La surexpression de ce répéteur entraine la différenciation des cellules neuronales neuro2A (Akahoshi et al., 2006). Nos résultats de microscopie électronique indiquent, chez les souris AhR^{-/-}, une altération de la morphologie des axones du phénotype sévère et une augmentation du diamètre axonal du phénotype modéré. Les souris invalidées pour le AhR^{-/-} utilisées pour ce projet sont des KO totales. Afin de déterminer avec certitude l'origine des

altérations observées, nous utiliserons des souris spécifiquement invalidées pour le AhR dans les CS et les motoneurones.

Enfin, nous réaliserons une lésion par compression du nerf sciatique et nous comparerons la vitesse de récupération fonctionnelle des animaux WT et AhR^{-/-}.

Le 7KC est un modulateur du AhR (Savouret et al., 2001). Les CS et les nefs sciatiques contiennent de fortes quantités de cet oxystérol. Nous avons montré que l'apport de 7KC dans les cellules HepG2 diminuait la réponse du Cyp1A1 à la TCDD. Nous réaliserons la même expérience dans les MSC80. Cependant, il sera difficile de confirmer un éventuel rôle protecteur de cet oxystérol contre les ligands exogènes du AhR. En effet, nous ne pouvons pas diminuer la quantité de 7KC dans les MSC80 car il est produit majoritairement par auto-oxydation. Les conséquences d'une administration de TCDD à des souris sont également difficiles à interpréter car elles peuvent être la résultante de la réponse d'autres types cellulaires (i.g les axones).

RIP140 et myéline

Nous avons également démontré l'implication de RIP140 dans la régulation des gènes de la myéline du SNP. Les résultats obtenus chez le poisson zèbre semble également indiquer qu'il contrôle l'expression des gènes de la myéline du SNC. Nous devons approfondir cela.

Face à la diversité d'action de RIP140, il sera difficile de se passer d'un modèle in vivo où RIP140 sera invalidé spécifiquement dans les CS et les oligodendrocytes. Nous comptons pour cela sur le modèle d'inactivation par oligomorpholinos photoactivables en cours de développement pour le projet LXR.

ANNEXE

Avant-propos

L'expression des gènes de la myéline (MPZ et PMP22) est finement régulée. Une légère dérégulation de leur expression est responsable de neuropathies héréditaires démyélinisantes telles que la maladie de Charcot-Marie-Tooth (CMT). Cependant, peu de voies de signalisation sont connues pour participer à cette régulation (i.g : glucocorticoïdes, progestérone...). La découverte que la β -caténine est un coactivateur du GR dans les CS (Fonte et al., 2005), a incité mon équipe d'accueil à étudier l'implication de la voie Wnt/ β -caténine dans la régulation de l'expression des gènes de la myéline. Cette voie de signalisation est particulièrement active lors de l'embryogénèse et dans le développement du système nerveux est très bien documentée. Néanmoins, peu de choses étaient connues quant à sa participation dans la myélinisation et dans la régulation des gènes de la myéline.

Dans deux précédents articles (Tawk et al., 2011) (Makoukji et al., 2012), l'équipe d'accueil a démontré :

1. grâce à des expériences fonctionnelles utilisant la stratégie des siRNA et des dominants-négatifs, que les principaux éléments de la voie Wnt/ β -caténine (le corécepteur LRP6, la plateforme Dishevelled, la GSK3 β , la β -caténine et les effecteurs transcriptionnels TCF/LEF) sont essentiels pour l'expression des gènes de la myéline.
2. le rôle important de la voie Wnt/ β -caténine dans l'initiation de la myélinisation et la formation de la gaine de myéline, dans le système nerveux central et périphérique *in vivo*.
3. les inhibiteurs de la GSK3 β , notamment, le chlorure de lithium, activent l'expression des gènes de la myéline *in vivo* chez la souris et *in vitro* dans une lignée de cellules

de Schwann de souris. De plus, l'administration de LiCl aux souris, après pincement du nerf sciatique ou facial, stimule les gènes de la myéline et induit une formation plus rapide de la gaine de myéline. Enfin, ces résultats montrent une récupération fonctionnelle des souris après traitement par le LiCl.

Nos objectifs sont les suivants :

1. Explorer l'intervention de la voie Wnt/ β -caténine dans des pathologies impliquant les cellules de Schwann comme :
 - la Neurofibromatose de type 1,
 - les neurofibromes plexiformes,
 - les tumeurs malignes des gaines des nerfs périphériques (MPNST)
2. Analyser le mécanisme d'action moléculaire de la voie Wnt après extinction du gène NF1.

Résumé des résultats obtenus :

1. La voie Wnt et l'expression de ses composants sont dérégulés dans les pathologies citées ci-dessus.
2. L'inactivation de NF1 provoque l'activation de la voie Wnt dans les cellules de Schwann.

The Activation of the WNT Signaling Pathway Is a Hallmark in Neurofibromatosis Type 1 Tumorigenesis

Armelle Luscan^{1,4}, Ghjuvan'Ghjacumu Shackleford⁵, Julien Masliah-Planchon¹, Ingrid Laurendeau¹, Nicolas Ortonne¹⁰, Jennifer Varin¹, François Lallemand¹⁴, Karen Leroy¹¹, Valérie Dumaine⁶, Mikael Hivelin^{2,12}, Didier Borderie⁷, Thomas De Raedt¹⁵, Laurence Valeyrie-Allanore¹³, Frédérique Larousserie⁸, Benoît Terris^{3,9}, Laurent Lantieri², Michel Vidaud^{1,4}, Dominique Vidaud^{1,4}, Pierre Wolkenstein¹³, Béatrice Parfait^{1,4}, Ivan Biéche^{1,14}, Charbel Massaad⁵, and Eric Pasmant^{1,4}

Clin Cancer Res 2014;20:358-371. Published OnlineFirst November 11, 2013.

Clinical Cancer Research



The Activation of the WNT Signaling Pathway Is a Hallmark in Neurofibromatosis Type 1 Tumorigenesis

Armelle Luscan, Ghjuvan'Ghjacumu Shackelford, Julien Masliah-Planchon, et al.

Clin Cancer Res 2014;20:358-371. Published OnlineFirst November 11, 2013.

Updated version Access the most recent version of this article at:
[doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-0780](https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-0780)

Supplementary Material Access the most recent supplemental material at:
<http://clincancerres.aacrjournals.org/content/suppl/2013/11/11/1078-0432.CCR-13-0780.DC1.html>

Cited Articles This article cites by 52 articles, 16 of which you can access for free at:
<http://clincancerres.aacrjournals.org/content/20/2/358.full.html#ref-list-1>

E-mail alerts [Sign up to receive free email-alerts](#) related to this article or journal.

Reprints and Subscriptions To order reprints of this article or to subscribe to the journal, contact the AACR Publications Department at pubs@aacr.org.

Permissions To request permission to re-use all or part of this article, contact the AACR Publications Department at permissions@aacr.org.

The Activation of the WNT Signaling Pathway Is a Hallmark in Neurofibromatosis Type 1 Tumorigenesis

Armelle Luscan^{1,4}, Ghjuvan'Ghjacumu Shackelford⁵, Julien Masliah-Planchon¹, Ingrid Laurendeau¹, Nicolas Ortonne¹⁰, Jennifer Varin¹, François Lallemand¹⁴, Karen Leroy¹¹, Valérie Dumaine⁶, Mikael Hivelin^{2,12}, Didier Borderie⁷, Thomas De Raedt¹⁵, Laurence Valeyrie-Allanore¹³, Frédérique Larousserie⁸, Benoît Terris^{3,9}, Laurent Lantieri², Michel Vidaud^{1,4}, Dominique Vidaud^{1,4}, Pierre Wolkenstein¹³, Béatrice Parfait^{1,4}, Ivan Bièche^{1,14}, Charbel Massaad⁵, and Eric Pasmant^{1,4}

Abstract

Purpose: The hallmark of neurofibromatosis type 1 (NF1) is the onset of dermal or plexiform neurofibromas, mainly composed of Schwann cells. Plexiform neurofibromas can transform into malignant peripheral nerve sheath tumors (MPNST) that are resistant to therapies.

Experimental Design: The aim of this study was to identify an additional pathway in the NF1 tumorigenesis. We focused our work on Wnt signaling that is highly implicated in cancer, mainly in regulating the proliferation of cancer stem cells. We quantified mRNAs of 89 Wnt pathway genes in 57 NF1-associated tumors including dermal and plexiform neurofibromas and MPNSTs. Expression of two major stem cell marker genes and five major epithelial–mesenchymal transition marker genes was also assessed. The expression of significantly deregulated Wnt genes was then studied in normal human Schwann cells, fibroblasts, endothelial cells, and mast cells and in seven MPNST cell lines.

Results: The expression of nine Wnt genes was significantly deregulated in plexiform neurofibromas in comparison with dermal neurofibromas. Twenty Wnt genes showed altered expression in MPNST biopsies and cell lines. Immunohistochemical studies confirmed the Wnt pathway activation in NF1-associated MPNSTs. We then confirmed that the knockdown of *NF1* in Schwann cells but not in epithelial cells provoked the activation of Wnt pathway by functional transfection assays. Furthermore, we showed that the protein expression of active β -catenin was increased in *NF1*-silenced cell lines. Wnt pathway activation was strongly associated to both cancer stem cell reservoir and Schwann–mesenchymal transition.

Conclusion: We highlighted the implication of Wnt pathway in NF1-associated tumorigenesis. *Clin Cancer Res*; 20(2); 358–71. ©2013 AACR.

Introduction

Neurofibromatosis type 1 (NF1) is an autosomal dominant neurocutaneous disorder affecting 1 in 3,000 individuals worldwide (1). The *NF1* gene is located in the chromosome region 17q11.2. Its protein product, neurofibromin, functions as a negative regulator of RAS proteins.

The main clinical features of NF1 are *café-au-lait* macules, skinfold freckling, iris Lisch nodules, as well as skeletal and cardiovascular abnormalities. NF1 patients have an increased risk of both benign and malignant tumors, therefore, NF1 is classified as a tumor predisposition syndrome. The most common tumors are benign peripheral nerve

Authors' Affiliations: ¹UMR_S745 INSERM, Université Paris Descartes Sorbonne Paris Cité, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques; ²Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Hôpital Européen Georges Pompidou, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), PRES Sorbonne Paris Cité; ³Service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Hôpital Cochin, Université Paris Descartes; ⁴Service de Biochimie et de Génétique Moléculaire, Hôpital Cochin, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP); ⁵UMR8194 CNRS, PRES Sorbonne Paris Cité, Paris Descartes; ⁶Department of Orthopedic Surgery, Cochin Hospital; ⁷Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Faculté de Médecine, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Hôpital Cochin, Laboratory of Biochemistry; ⁸Tumour bank, Cochin Hospital, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Paris Descartes University; ⁹INSERM, U1016, Institut Cochin, and CNRS, UMR8104, Paris; ¹⁰Département de pathologie Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP) and Université Paris Est Créteil (UPEC); ¹¹Platform of Biological Resources; ¹²Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP) and Université Paris Est Créteil

(UPEC), Hôpital Henri-Mondor; ¹³Department of Dermatology, Hôpital Henri-Mondor, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP) and EA 4393 LIC, UPEC, Créteil, France; ¹⁴Laboratoire d'Oncogénétique, Institut Curie, Hôpital René Huguenin; FNCLCC, Saint-Cloud; and ¹⁵Genetics Division, Department of Medicine, Brigham and Women's Hospital, and Harvard Medical School, Boston, Massachusetts

Note: Supplementary data for this article are available at Clinical Cancer Research Online (<http://clincancerres.aacrjournals.org/>).

Corresponding Author: Eric Pasmant, UMR_S745 INSERM, Université Paris Descartes Sorbonne Paris Cité, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, 4 avenue de l'Observatoire, 75006 Paris, France. Phone: 33-1-53-73-97-25; Fax: 33-1-44-07-17-54; E-mail: eric.pasmant@parisdescartes.fr

doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0780

©2013 American Association for Cancer Research.

Translational Relevance

The commonest neurofibromatosis type 1 (NF1)-associated tumors are nerve sheath tumors (NSTs: dermal or plexiform neurofibromas), mainly composed of Schwann cells. Plexiform neurofibromas can undergo malignant transformation to malignant peripheral nerve sheath tumors with a poor vital prognosis. Little is known of the genetic events required for neurofibromas formation or transformation. Here, we found that the Wnt pathway was significantly activated by quantifying mRNAs of 89 Wnt pathway genes in 57 NF1-associated NSTs. We then confirmed that the knockdown of *NF1* in Schwann cells provoked the activation of Wnt pathway by functional transfection assays. We showed that active β -catenin protein expression was increased in *NF1*-silenced cell lines. Wnt pathway activation was strongly associated to both putative cancer stem cell reservoir and Schwann–mesenchymal transition. We highlighted the implication of Wnt pathway in NF1 peripheral nerve sheath tumorigenesis. Elucidation of the role of cellular signaling pathways tumorigenesis will enable to establish molecular targeted therapeutics in NF1.

sheath tumors (neurofibromas), which vary greatly in both number and size, and may be dermal or plexiform (2).

Dermal neurofibromas are typically small and grow as discrete lesions in the dermis whereas plexiform neurofibromas can develop internally along the plexus of major peripheral nerves and become quite large. Plexiform neurofibromas are probably derived from embryonic Schwann cell lineage (3). During development, neural-crest cells migrate along the peripheral nerves, and a subset of cells commit to the Schwann cell lineage. Zheng and colleagues demonstrated that plexiform neurofibromas could originate from *Nf1* deficiency in fetal nonmyelinating Schwann cells (4). Le and colleagues identified a population of progenitor cells residing in the dermis, termed "skin-derived precursors" that form dermal neurofibromas through loss of *Nf1* (5). These differences between dermal and plexiform neurofibromas suggest that the type of progenitor but also the timing of somatic *NF1* mutations may determine the clinical course of these tumors (6).

In contrast to dermal neurofibromas, plexiform neurofibromas can undergo malignant transformation to malignant peripheral nerve sheath tumors (MPNST) in about 10% of NF1 patients (7). Roughly half of all MPNSTs are sporadic; they are found in patients who do not carry any known genetic predisposition for cancer. The remaining MPNSTs are found in patients who are diagnosed with NF1. MPNSTs are resistant to conventional therapies, and their deep-seated position and locally invasive growth hinder complete surgical resection. The 5-year survival rate among patients with MPNSTs ranges from 30% to 50%. In parallel to the double inactivation of the *NF1* gene, additional genetic lesions seem necessary for malignant progression

of plexiform neurofibromas. *TP53* mutations have been identified in MPNSTs but not in benign neurofibromas, indicating that the p53-mediated pathway is involved in malignant progression (6, 8). Alterations of other genes (*p16/CDKN2A*, *p14/ARF*, *p27/KIP1*, *EGFR*, *mTOR*) were also detected in MPNST (9–12).

Although we have now identified some of the genes that when mutated initiate tumor formation and drive progression, the identity of the cell population(s) susceptible to such transforming events remains undefined in the majority of human cancers. Recent studies indicate that a small population of cells (called cancer stem cells) endowed with unique self-renewal properties and tumorigenic potential is present in some, and perhaps, all tumors (13, 14). Many signaling pathways involved in the maintenance of normal stem cells are found to be altered in several human cancers (i.e., Wnt, Hedgehog, and Notch pathways). Moreover, several authors addressed the possible association between the formation of stem cells and the epithelial–mesenchymal transition (EMT). Regulation of the EMT is a crucial step in cancer development (15). Genetic alterations that impair the differentiation program could endow such dedifferentiated cells with attributes that mimic stem cell behavior.

In NF1 tumorigenesis, the question whether these tumors arise from neural crest stem cells or differentiates glia remains very controversial (4, 5, 16, 17). In this regard, we have previously shown a dedifferentiation of Schwann cells, as well as an activation of the Hedgehog signaling pathway, during malignant transformation of plexiform neurofibromas (18). *TWIST1*, an important transcription factor involved in embryonic development and in EMT, was shown to be upregulated in NF1-associated MPNST (19). Taken together, these findings suggest a genetic-driven Schwann–mesenchyme transition (SMT) that could generate cancer stem cells during NF1 tumorigenesis.

Wnt pathway is a major developmental pathway involved in maintenance of normal stem cells (20), and altered in several human cancers (21). Wnt signaling is a complex process that requires interplay of many different proteins. In addition to a large cohort of Wnt ligands, and frizzled receptors, some Wnt pathways also require the presence of coreceptors. Wnt ligands may activate 3 different pathways (Supplementary Fig. S1): (i) the canonical pathway: involving β -catenin and LEF/TCF transcription factor; (ii) the planar cell polarity pathway; and (iii) the Wnt/calcium pathway (20, 22). All 3 pathways have different consequences and drive specific processes for the cells in which they signal.

Little is known of the additional cooperating genetic events potentially required for full plexiform neurofibroma formation. Furthermore, the respective tumorigenic mechanisms of dermal neurofibromas and plexiform neurofibromas have rarely been compared (6). In this manuscript we addressed the potential role of Wnt signaling in NF1 tumorigenesis. We here quantified the gene expression profiles of 89 actors of Wnt pathway in NF1-associated tumors. We identified specific genes involved in Wnt signaling pathway whose expressions significantly differed between

3 NF1-associated tumor types: dermal and plexiform neurofibromas and MPNSTs. We functionally confirmed the crosslink between *NF1* alteration and Wnt pathway activation, using siRNA strategy in a cell line model. Finally, we investigated the link between Wnt signaling pathway activation and the altered expression of stemness and SMT genes.

Materials and Methods

Patients and samples

NF1-related samples were obtained by laser excision (dermal neurofibromas) or surgical excision (plexiform neurofibromas and MPNSTs) from patients with NF1 at Henri Mondor Hospital (Creteil, France). Sample handling and processing was identical for all NF1-related tumors. After clinical examination, the surgical removal of dermal neurofibromas was proposed in case of esthetical burden. Resection or removal of plexiform neurofibromas was proposed for repair or in case of symptoms, pain or compression. The plexiform neurofibromas (deep lesions involving a plexus of nerves) were large, had a nodular aspect, and severely deformed the affected tissues. They were all S100-positive by immunostaining. Four patients with plexiform neurofibromas had developed MPNSTs. The main clinical and histological characteristics of the 16 patients with MPNSTs (validation set) are shown in Supplementary Table S1. Immediately after surgery the tumor samples were flash frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until RNA extraction. NF1-related MPNSTs all arose from plexiform neurofibromas and showed very weak S100 immunostaining (data not shown). MPNST samples from non-NF1 patients were obtained by surgical excision at Cochin Hospital (Paris, France). Dermal neurofibromas were used as "normal" control samples as they never undergo malignant transformation in MPNSTs. Indeed, neurofibromas are heterogeneous benign tumors composed of Schwann cells, fibroblasts, mast cells, and other cells, and have no "normal" tissue equivalent. Gene expression levels determined by real time reverse transcription (RT)-PCR analysis in plexiform neurofibromas and MPNSTs were thus expressed relative to expression levels in dermal neurofibromas.

Cell lines

We analyzed 7 human MPNST cell lines, namely NMS-2, NMS-2PC, 88-3, ST88-14, 90-8, S462, and T265. NMS-2 and NMS-2PC were kind gifts from Dr. Akira Ogose (Niigata University School of Medicine, Niigata, Japan). 88-3, ST88-14, and 90-8 were kind gifts from Dr. Nancy Ratner (Cincinnati Children's Hospital Medical Center, Cincinnati, OH). S462 was a kind gift from Dr. Lan Kluwe (University Hospital Eppendorf, Hamburg, Germany). T265 was a kind gift from Dr. G De Vries (Loyola University, Chicago, IL). MPNST cell lines were grown in RPMI medium supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 10 IU/mL penicillin, and 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin. Normal Schwann cells and fibroblasts were obtained by primary cell culture and differential isolation from normal sciatic nerve biopsies and

skin, respectively, and using cell culture and isolation conditions as previously described (23–25). Normal mast cells were obtained by means of cell culture and various specific purification steps from cord blood-derived human cells, as previously described (26).

We functionally analyzed the crosslink between *NF1* alteration and the Wnt pathway using siRNA strategy in the mouse Schwann cell line MSC80. MSC80 cells exhibit normal Schwann cell characteristics (S100, myelin protein zero, peripheral myelin protein 22 expression) and have retained the capacity to myelinate axons (27). The mouse Schwann cell line MSC80 was maintained in Dulbecco's minimal essential medium (DMEM) supplemented with 10% decomplexed fetal calf serum (Hyclone-Perbio), 1% penicillin, 1% streptomycin (Gibco), and 1% glutamine. Culture cells were grown at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO_2 . A siRNA strategy was also used in 2 human non-Schwann cell lines: the breast cancer cell line, namely MCF-7 (Michigan Cancer Foundation-7), and one embryonic kidney cell line, namely HEK293 (Dr. François Lallemant, Institut Curie, Saint-Cloud, France). We also analyzed mouse embryonic fibroblasts (MEF) derived from wild-type mice and from *Nf1*^{-/-} mice (Dr. Thomas De Readt, Harvard Medical School, Boston, MA).

Human mRNAs quantification by real-time RT-PCR: studied panels

We first quantified the mRNA expression level of the 89 Wnt pathway human genes in a series of 7 dermal neurofibromas, 7 plexiform neurofibromas, and 8 MPNSTs (screening set; $N = 22$ tumors). The 89 Wnt pathway quantified genes encode 19 Wnt ligands, 13 Wnt receptors, 32 proteins involved in canonical Wnt signal transduction, 4 Wnt transcription factors, 10 LEF/TCF-inducible proteins (<http://www.stanford.edu/~rnusse/pathways/targets.html>), and 11 proteins involved in noncanonical Wnt signal pathways including 4 proteins involved in the planar cell polarity pathway and 7 proteins in the Wnt/calcium pathway (Supplementary Table S2). The mRNA expression of the 32 markedly differentially expressed genes was then determined in a larger tumor series including 10 dermal neurofibromas, 31 plexiform neurofibromas, and 16 MPNSTs (validation set: 57 tumors). Expression of 2 major stem cell marker genes (*PROM1* and *NKX2.2*) and 5 major EMT marker genes (*TWIST1*, *SLUG*, *VIM*, *SNAIL*, and *CDH1*) was also assessed in the validation set ($N = 57$ tumors).

We then selected for further study the 24 genes whose expression in the MPNST group and/or in the plexiform neurofibroma group markedly differed (>2-fold) from that in the dermal neurofibroma group. Expression of the 24 genes was studied in normal human Schwann cells, fibroblasts, endothelial cells, and mast cells, in 7 NF1-related MPNST cell lines, in 4 sporadic MPNSTs, and in *Nf1*^{+/+} and *Nf1*^{-/-} MEFs. Expression of the 24 genes was also studied in the 2 human non-Schwann cell lines (HEK293 and MCF-7) and one mouse Schwann cell line (MSC80) with siRNA-mediated *NF1* knockdown.

mRNAs quantification by real-time RT-PCR: method

We first used real-time quantitative RT-PCR to quantify the mRNA expression of 89 selected Wnt pathway associated-genes in a series of MPNSTs and plexiform neurofibromas, by comparison with dermal neurofibromas. Quantitative RT-PCR is a major alternative to microarrays for molecular tumor profiling, being far more precise, reproducible, and quantitative (28). Furthermore, it is more appropriate for analyzing weakly expressed genes such as the Wnt genes in this study. Finally, RT-PCR requires smaller amounts of total RNA (about 2 ng per target gene), which is more adapted for analyzing small-sized tumors.

The theoretical and practical aspects of real-time quantitative RT-PCR using the ABI Prism 7900 Sequence Detection System (Perkin-Elmer Applied Biosystems) have been described in detail elsewhere (28). We quantified transcripts of 2 endogenous RNA control genes involved in 2 cellular metabolic pathways, namely *TBP*, which encodes the TATA box-binding protein (a component of the DNA-binding protein complex TFIID) and *RPLP0* (also known as 36B4), which encodes acidic ribosomal phosphoprotein P0. *TBP* and *RPLP0* were selected as endogenous controls because the levels of their transcripts in the tumor samples were low (Ct values between 24 and 26) and high (Ct values between 18 and 20), respectively. Each sample was normalized on the basis of its *TBP* (or *RPLP0*) content. Results, expressed as *N*-fold differences in target gene expression relative to the *TBP* (or *RPLP0*) gene, and termed "*N*target," were determined as $N_{target} = 2^{\Delta C_{t_{sample}}}$, where the ΔC_t value of the sample was determined by subtracting the average Ct value of the target gene from the average Ct value of the *TBP* (or *RPLP0*) gene (29). The *N*target values of the tumor samples were subsequently normalized such that the mean of the dermal neurofibroma *N*target values was 1. Primers for *TBP*, *RPLP0*, and the target genes were chosen with the assistance of the computer programs Oligo 6.0 (National Biosciences). For each primer pair, we performed no-template control (NTC) and no-reverse-transcriptase control (RT-negative) assays, which produced negligible signals (usually >40 in Ct values), suggesting that primer-dimer formation and genomic DNA contamination effects were negligible. RNA extraction, cDNA synthesis, and PCR reaction conditions have been described elsewhere (29).

Immunohistochemical study

Formalin fixed, paraffin embedded skin samples were retrieved from the archive material of the department of Pathology of Henri Mondor Hospital. Hematoxylin-eosin-saffron (HES) staining and immunohistochemistry were applied to 3- μ m-thick dewaxed sections. Immunostaining of β -catenin (BD Biosciences Pharmingen) was done using the Bond max device (Menarini diagnostics, France), at a 1:4,000 dilution after antigen retrieval by heat at pH 9. In all samples, we checked the staining of epithelial (epidermis or adnexae) and/or endothelial cells as internal positive controls.

HEK293, MCF-7, and MSC80 cells transfection with siRNA

To knockdown the *NF1* gene, human cell lines (HEK293 and MCF-7) and mouse cells (MSC80) transient transfections were carried out using Effecten reagent (Qiagen) for MSC80, and HiPerFect Transfection Reagent (Qiagen) according to HiPerFect Transfection Reagent Handbook for human cell lines. SiRNAs were purchased from Qiagen: mouse siRNA against *Nf1* (reference GS18015), human siRNA against *NF1* (reference GS4763), and nontargeted (NT) siRNAs (negative control reference 1027310). Mouse *Nf1* and human *NF1* genes were targeted with 4 different sequences of siRNA directed against 4 different regions of the cognate mRNA. We quantified gene expressions at both mRNA (using real-time RT-PCR) and protein (using Western blot) levels to assess the siRNAs efficacy.

Luciferase reporter assay of β -catenin-mediated Wnt signaling pathway activation

Luciferase reporter assay was used to determine the Wnt pathway signaling activity in *Nf1* invalidated or in control (nontargeting; NT) siRNAs MSC80 cells. SuperTOP-Flash-Luc plasmids were kindly provided by Dr. R T Moon (University of Washington School of Medicine, Seattle, WA). One day before transfection, MSC80 cells (1.5×10^5 cells per well) were seeded into 6-well plate and incubated in the DMEM culture medium containing 10% decomplemented fetal calf serum. SuperTOP-Flash-Luc plasmid (0.4 μ g), the pCMV- β -galactosidase expression vector (0.1 μ g), and siRNAs (25 nmol/L) were mixed with a solution containing Effecten reagents (0.85 mg/mL) in DMEM. The mixture was then added to the cells and incubated overnight. Sixteen hours after transfection, the medium was replaced by DMEM culture medium containing 10% decomplemented fetal calf serum. Luciferase activity was determined using an enzymatic method described by Massaad and colleagues (30). The β -galactosidase activity was used for the transfection efficiency normalization.

Protein extraction and Western blot analysis

Cells transfected with NT siRNA or with siRNAs against *NF1* were homogenized in 100 μ L ice-cold RIPA buffer [50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 150 mmol/L NaCl, 0.1% SDS, 0.5% sodium deoxycholate, 1% NP-40, 5 mmol/L EDTA, pH 8.0, 2 mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF; Sigma-Aldrich), 50 μ g/mL leupeptin, 50 μ g/mL pepstatin A, and 50 μ g/mL aprotinin]. Protein concentration of the clarified homogenates (4°C, 15 minutes, 13,500 rev/min) was determined on all samples using the Bradford protein assay (Bio-Rad Laboratories). Aliquots of 30 μ g of total protein extracts were used for each sample. Homogenate proteins were separated on 15% SDS-PAGE gel or on Pre-cast XT 4% to 12% Bis-Tris Criterion Gel (Bio-Rad) for neurofibromin and blotted onto polyvinylidene difluoride membranes. Nonspecific binding sites in the transblots were blocked at 4°C overnight with 5% bovine serum albumin (BSA), 0.01% Tween 20 (Invitrogen), TBS, pH 7.4. Membranes were then incubated at room temperature

for 2 hours with the following primary antibodies diluted in a mixture of 5% BSA blocking agent and TBS-Tween 0.1%: active (dephospho) β -catenin (anti-ABC) clone 8E7 antibody (1:1,000), β -catenin antibody (1:1,000), neurofibromin antibody (1:1,000), and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) antibody (1:10,000). They were then incubated at room temperature for 1 hour 30 minutes with the appropriate secondary antibody diluted in 5% BSA blocking buffer/TBS-Tween 0.1% (anti-mouse and anti-rabbit at 1:20,000), followed by ECL Plus Western blotting detection (Amersham) before exposure to radiographic film Hyperfilm ECL (Amersham). Western blots were quantified by means of NIH Image J Software.

Primary antibodies against neurofibromin (rabbit monoclonal antibody) were purchased from Santa-Cruz (reference sc67), mouse total β -catenin (mouse monoclonal antibody) was purchased from BD Biosciences, human total β -catenin (rabbit polyclonal antibody) was purchased from Cell Signaling (reference #9562), active- β -catenin (mouse monoclonal antibody) and GAPDH (mouse monoclonal antibody) were purchased from Millipore (reference 05-665 and G8795). Secondary antibodies used for Western blotting were horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse and anti-rabbit immunoglobulin G (Millipore).

Statistical analysis

As mRNA levels did not fit a Gaussian distribution, (i) mRNA levels in each subgroup of samples were expressed as their median values and ranges, rather than their mean values and coefficients of variation; and (ii) comparison and relationships between mRNA levels of the different target genes were respectively estimated using nonparametric tests: the Mann-Whitney U test (link between 1 qualitative parameter and 1 quantitative parameter) and the Spearman correlation test (link between 2 quantitative parameters). Differences between the 2 populations were judged significant at confidence levels greater than 95% ($P < 0.05$). In the SuperTOP-Flash Luciferase reporter assay, 2 groups comparisons were performed by the Student T test. A P -value of <0.05 was considered to be statistically significant.

Results

mRNA expression of 89 Wnt pathway genes in 7 dermal neurofibromas, 7 plexiform neurofibromas, and 8 MPNST NF1-related samples (screening set)

Eight (9%) of the 89 genes (i.e., *WNT1*, *WNT7A*, *WNT8A*, *WNT8B*, *WNT9B*, *DKK4*, *KREMEN2*, and *TLE1*) showed very low levels of target gene in dermal neurofibromas, plexiform neurofibromas, and MPNSTs. Their mRNA levels were only detectable but not reliably quantifiable by means of real-time quantitative RT-PCR assays, mainly based on fluorescence SYBR Green methodology ($Ct > 32$). Thirty-two (39.5%) of the 81 remaining genes were expressed at a different level (>2 -fold) in the MPNST group and/or the plexiform neurofibromas group compared with the dermal neurofibromas group: 9 genes were deregulated in

the 7 plexiform neurofibromas as compared with the 7 dermal neurofibromas and 30 genes in the 8 MPNSTs as compared with the 7 dermal neurofibromas (Supplementary Table S3).

mRNA expression of 32 identified Wnt pathway genes in 10 dermal neurofibromas, 31 plexiform neurofibromas, and 16 MPNST NF1-related samples (validation set)

Expression levels of the 32 deregulated genes identified by "screening set" analysis were then determined in 10 dermal neurofibromas, 31 plexiform neurofibromas, and 16 MPNST samples. Nine (28.1%) of the 32 genes were significantly deregulated in the 31 plexiform neurofibromas as compared with the 10 dermal neurofibromas ($P < 0.05$; Fig. 1 and Supplementary Table S4): 8 genes were upregulated (*WNT9A*, *FZD1*, *SFRP4*, *SFRP5*, *TLE2*, *MYC*, *CAMK2B*, and *PRKCQ*) and 1 was downregulated (*SFRP1*) in plexiform neurofibromas. These 9 deregulated genes in plexiform neurofibromas encode 1 Wnt ligand (*WNT9A*), 1 Wnt receptor (*FZD1*), 4 proteins involved in canonical Wnt signal transduction (*SFRP1*, *SFRP4*, *SFRP5*, and *TLE2*), 1 LEF/TCF-inducible protein (*MYC*), and 2 proteins involved in the Wnt/calcium pathway (*CAMK2B* and *PRKCQ*).

Twenty (62.5%) of the 32 genes were significantly deregulated in the 16 MPNSTs as compared with the 10 dermal neurofibromas ($P < 0.05$; Fig. 1; Supplementary Table S4): 14 genes were upregulated (*WT5A*, *FZD1*, *FZD8*, *DKK1*, *WIF1*, *LEF1*, *ID2*, *MSX2*, *SOX9*, *WISP1*, *TWIST1*, *BMP2*, *CAMK2B*, and *PRKCQ*) and 6 were downregulated (*WNT2*, *WNT9A*, *DKK3*, *KREMEN1*, *SFRP1*, and *TCF7*) in MPNSTs.

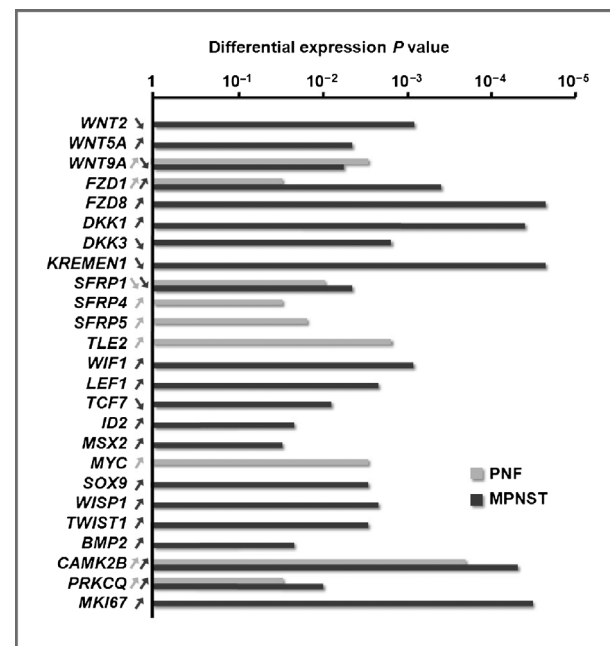


Figure 1. Diagram depicting P values (horizontal bars) for significant gene expression differences between MPNSTs and/or plexiform neurofibromas (PNF) and dermal neurofibromas. Arrows indicate increased (up arrow) or decreased (down arrow) differential expression.

These 20 deregulated genes in MPNSTs encode 3 Wnt ligands (WNT2, WNT5A, and WNT9A), 2 Wnt receptors (FZD1 and FZD8), 5 proteins involved in canonical Wnt signal transduction (DKK1, DKK3, KREMEN1, SFRP1, and WIF1), 2 transcription factors (LEF1 and TCF7), 6 LEF/TCF-inducible proteins (ID2, MSX2, SOX9, WISP1, TWIST1, and BMP2), and 2 proteins involved in the Wnt/calcium pathway (CAMK2B and PRKCCQ).

Taken together, our results showed that 4 genes were specifically deregulated in plexiform neurofibromas, 15 were specifically dysregulated in MPNSTs, and 6 were dysregulated in both tumor types.

In the same set of 57 samples, we also examined the expression of the *NF1* gene, and the proliferation-associated gene *MKI67* that encodes the proliferation-related antigen Ki-67. *NF1* expression was similar in the 3 groups of tumors whereas *MKI67* showed significant overexpression (30.5-fold) in MPNSTs ($P = 0.00005$; Fig. 1 and Supplementary Table S4). This lack of expression difference for *NF1* is probably because of the fact that the *NF1* gene is ubiquitously expressed and therefore expressed in the different cell components of the neurofibromas and MPNSTs, and that *NF1*^{-/-} Schwann cells represent only a fraction of the total Schwann cell population in tumor samples.

The immunohistochemical study of β -catenin in MPNSTs showed a strong diffuse and cytoplasmic staining (Fig. 2). In

contrast, a weaker β -catenin staining was observed in the plexiform neurofibromas (Fig. 2).

mRNA expression of 32 identified Wnt pathway genes in paired plexiform neurofibroma and MPNST samples from 4 patients

We analyzed the mRNA levels of the 32 deregulated genes identified by "screening set" analysis in 4 patients from whom both plexiform neurofibroma and matched MPNST samples were available. We found a clear decrease in the mRNA level of *WNT9A*, *DKK3*, *SFRP4* (all patients), and *WISP1* (patients 1, 3, and 4), upon progression from plexiform neurofibroma to MPNST (Supplementary Fig. S2). We also found a clear increase in the mRNA level of *DKK1* (all patients), *TLE2*, *TCF7*, *WNT2* (patients 1, 2, and 3), and *WNT5A* (patients 3 and 4) during this transition (Supplementary Fig. S2).

mRNA expression of the 24 differentially expressed Wnt pathway genes in 4 non-NF1 (sporadic) MPNSTs

The expression levels of the 24 differentially expressed Wnt pathway genes were also determined in 4 non-NF1 (sporadic) human MPNST biopsies (Supplementary Table S5). According with the data obtained in NF1-associated MPNSTs, the majority of the 14 genes upregulated and of the 6 downregulated in MPNST biopsies showed a trend to be also up- and downregulated.

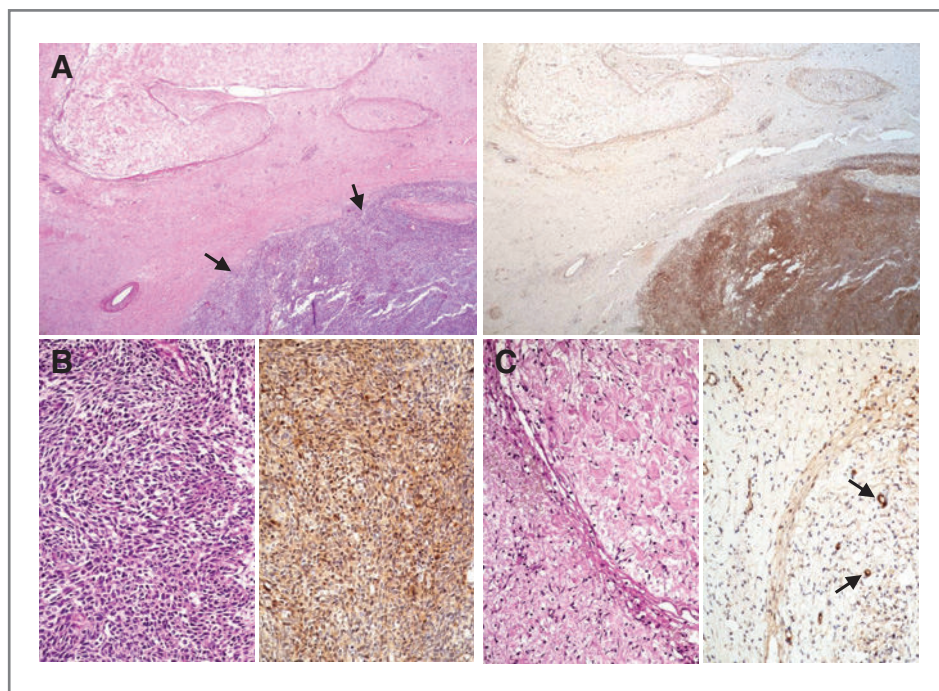


Figure 2. Representative immunohistochemical study of β -catenin in MPNST and plexiform neurofibroma. A, this tissue sample shows an area of plexiform neurofibroma surrounding the MPNST (arrows). The MPNST shows an intense β -catenin staining (left: hematoxylin, eosin, and saffron stain; right: immunohistochemistry revealed by diaminobenzidine, original magnifications $\times 25$). B, the MPNST areas show a diffuse and cytoplasmic expression of β -catenin (left: hematoxylin, eosin, and saffron stain; right: immunohistochemistry revealed by diaminobenzidine, original magnifications $\times 200$). C, the plexiform neurofibromas show a weak cytoplasmic expression of β -catenin in a proportion of Schwann cells, whereas intratumoral vessels are strongly stained, taken as internal positive controls (left: hematoxylin, eosin, and saffron stain; right: immunohistochemistry revealed by diaminobenzidine, original magnifications $\times 200$).

mRNA expression of the 24 differentially Wnt pathway expressed genes in normal human Schwann cells, fibroblasts, endothelial cells, and mast cells

Neurofibromas and MPNSTs are both heterogeneous tumors mainly composed of Schwann cells (60–80%), together with fibroblasts, mast cells, and endothelial cells (3). To investigate cell type-specific expression of the 24 previously identified altered genes in NF1 plexiform neurofibromas and/or MPNSTs (Fig. 1 and Supplementary Table S4), we analyzed their mRNA levels by means of real-time RT-PCR in normal human Schwann cells, fibroblasts, endothelial cells, and mast cells (Table 1). *MYC*, *CAMK2B*, *KREMEN1*, and *BMP2* were similarly expressed in the 4 cell types, suggesting a ubiquitous expression. *TLE2*, *DKK3*, *TCF7*, *FZD1*, *FZD8*, and *DKK1* were similarly expressed in Schwann cells, fibroblasts, and endothelial

cells, but were not expressed in mast cells. Six of these 24 genes (*WISP1*, *WNT5A*, *SFRP1*, *ID2*, *TWIST1*, and *SOX9*) were similarly expressed in Schwann cells and fibroblasts, but were not expressed (Ct > 32) in endothelial cells or mast cells. *WNT2*, *MSX2*, *LEF1*, *SFRP4*, and *SFRP5* were Schwann cell-specific, being expressed more than 20 times in the Schwann cells than in the other 3 cell types. *PRKCQ* was mainly expressed in endothelial cells and mast cells, and *WIF1* only in Schwann cells and endothelial cells. Finally, *WNT9A* was endothelial cells specific (being expressed 10 times more than in the other 3 cell types). It is noteworthy that the endothelial cells specificity of *WNT9A* could explain its expression profile in NF1 tumors, in particular its overexpression in plexiform neurofibromas (well-known to be more angiogenic than the dermal neurofibromas).

Table 1. mRNA expression of 24 identified genes in normal human cells

| | Mast cells | Schwann cells | Fibroblasts | Endothelial cells |
|--|-------------|-------------------------|---------------|-------------------|
| Wnt ligands (n = 3) | | | | |
| <i>WNT2</i> | 0.00 | 0.28^a | 0.00 | 0.00 |
| <i>WNT5A</i> | 0.00 | 33.84 | 39.80 | 0.20 |
| <i>WNT9A</i> | 0.01 | 0.04 | 0.03 | 0.47 |
| Wnt receptors (n = 2) | | | | |
| <i>FZD1</i> | 0.03 | 0.44 | 1.30 | 0.13 |
| <i>FZD8</i> | 0.00 | 3.70 | 0.21 | 0.87 |
| Wnt signal transduction (n = 8) | | | | |
| <i>DKK1</i> | 0.00 | 486.00 | 930.00 | 396.00 |
| <i>DKK3</i> | 0.01 | 3.71 | 0.64 | 0.29 |
| <i>KREMEN1</i> | 0.03 | 0.13 | 0.40 | 0.10 |
| <i>SFRP1</i> | 0.00 | 0.55 | 0.27 | 0.02 |
| <i>SFRP4</i> | 0.00 | 0.83 | 0.02 | 0.00 |
| <i>SFRP5</i> | 0.00 | 0.62 | 0.00 | 0.03 |
| <i>TLE2</i> | 0.00 | 0.11 | 0.30 | 0.41 |
| <i>WIF1</i> | 0.00 | 1.05 | 0.00 | 0.60 |
| Wnt transcriptional factors (n = 2) | | | | |
| <i>LEF1</i> | 0.00 | 0.38 | 0.00 | 0.01 |
| <i>TCF7</i> | 0.00 | 0.40 | 0.72 | 0.20 |
| Lef/Tcf-inducible proteins (n = 7) | | | | |
| <i>ID2</i> | 0.18 | 2.84 | 17.90 | 0.19 |
| <i>MSX2</i> | 0.00 | 0.96 | 0.00 | 0.04 |
| <i>MYC</i> | 0.55 | 0.82 | 0.45 | 0.56 |
| <i>SOX9</i> | 0.00 | 0.93 | 0.31 | 0.00 |
| <i>WISP1</i> | 0.00 | 10.65 | 5.16 | 0.02 |
| <i>TWIST1</i> | 0.00 | 0.60 | 7.02 | 0.01 |
| <i>BMP2</i> | 0.40 | 0.30 | 5.96 | 21.38 |
| Noncanonical Wnt signal: Wnt/calcium pathway (n = 2) | | | | |
| <i>CAMK2B</i> | 0.60 | 1.26 | 0.46 | 2.46 |
| <i>PRKCQ</i> | 2.28 | 0.08 | 0.00 | 1.11 |

NOTE: The gene mRNA levels (calculated as described in Materials and Methods) were based on the amount of the target message relative to the endogenous control *TBP* message, in order to normalize the starting amount and quality of total RNA. Similar results were obtained with a second endogenous control, the *RPLP0* gene (also known as 36B4).

Genes indicated in bold were found to be highly expressed as compared with one or several other normal human cells.

^aFor each gene, mRNA levels were normalized to the 10 dermal neurofibromas.

mRNA expression of the 24 differentially expressed Wnt pathway genes in 7 NF1-associated MPNST cell lines

The expression levels of the 24 identified genes was determined in 7 well-characterized NF1-associated MPNST cell lines, namely NMS-2, NMS-2PC, 88-3, ST88-14, 90-8, S462, and T265 (Table 2). All genes (except *WT9A* in agreement with the fact that it is an endothelial cell-specific gene) were expressed (Ct < 32) in at least 1 NF1-associated MPNST cell line. According with the data obtained in MPNSTs, the majority of the 14 genes upregulated and of the 6 downregulated in MPNST biopsies was also up- and downregulated (>3-fold the median value in 10 dermal neurofibromas) in a fraction of the MPNST cell lines. For example, *WT5A*, *FZD8*, *DKK1*, *WIF1*, *MSX2*, and *CAMK2B* were upregulated in at least 5 of the 7 MPNST cell lines, whereas *WNT2*, *WNT9A*, *DKK3*, *KREMEN1*, and *SFRP1* were downregulated in at least 5 of the 7 MPNST cell lines. These findings confirm

the Schwann cell expression of these genes and their dysregulation in MPNST tumorigenesis.

Relationship between mRNA levels of 24 differentially expressed Wnt pathway genes and 2 major stem cell markers (*PROM1* and *NKX2.2*)

Several studies supported the role of the canonical Wnt signaling in the formation and maintenance of stem cells and cancer stem cells (14, 20–22). To explore the possible involvement of the 24 identified Wnt genes (deregulated in NF1 tumors) in the formation of cancer stem cells, we tested the relationship between the expression of these 24 differentially expressed Wnt genes and 2 major stem cell marker genes, that is *PROM1* (also known as *CD133*) and *NKX2-2*, in our series of 57 NF1-associated tumors. *PROM1* and *NKX2-2* were overexpressed (144- and 87-fold, respectively) in MPNSTs ($P = 0.0007$ and 0.002 , respectively; Mann-Whitney U test) suggesting an increase of the proportion of cancer stem cells in this malign tumor group. We observed

Table 2. mRNA expression of 24 identified genes in 7 NF1-associated MPNST cell lines

| | NMS-2 | NMS-2PC | 88-3 | ST88-14 | 90-8 | S462 | T265 |
|--|-------------------------|---------------|---------------|----------------|----------------|---------------|----------------|
| Wnt ligands (n = 3) | | | | | | | |
| <i>WNT2</i> | 0.08^a | 0.04 | 0.09 | 0.32 | 0.04 | 0.18 | 0.44 |
| <i>WNT5A</i> | 5.76 | 11.52 | 12.65 | 8.79 | 1.42 | 1.13 | 16.15 |
| <i>WNT9A</i> | 0.04 | 0.00 | 0.01 | 0.08 | 0.20 | 0.07 | 0.05 |
| Wnt receptors (n = 2) | | | | | | | |
| <i>FZD1</i> | 1.21 | 0.96 | 0.44 | 1.33 | 0.56 | 0.21 | 0.32 |
| <i>FZD8</i> | 0.45 | 3.99 | 3.56 | 4.17 | 6.93 | 0.22 | 5.38 |
| Wnt signal transduction (n = 8) | | | | | | | |
| <i>DKK1</i> | 868.00 | 716.00 | 796.00 | 6146.00 | 1252.00 | 806.00 | 1648.00 |
| <i>DKK3</i> | 0.12 | 0.10 | 0.23 | 0.91 | 0.17 | 0.03 | 0.23 |
| <i>KREMEN1</i> | 0.13 | 0.36 | 0.12 | 0.45 | 0.14 | 0.05 | 0.11 |
| <i>SFRP1</i> | 0.04 | 0.14 | 0.42 | 0.29 | 0.28 | 0.15 | 0.05 |
| <i>SFRP4</i> | 0.02 | 0.04 | 0.00 | 0.01 | 0.00 | 0.00 | 0.01 |
| <i>SFRP5</i> | 2.71 | 0.70 | 0.57 | 0.63 | 0.00 | 1.19 | 0.88 |
| <i>TLE2</i> | 0.11 | 0.35 | 0.22 | 0.79 | 0.67 | 0.38 | 0.12 |
| <i>WIF1</i> | 35.7 | 37.4 | 27.2 | 96.8 | 48.3 | 30.0 | 25.8 |
| Wnt transcriptional factors (n = 2) | | | | | | | |
| <i>LEF1</i> | 0.63 | 0.98 | 0.24 | 0.61 | 0.33 | 0.55 | 0.20 |
| <i>TCF7</i> | 0.88 | 1.00 | 0.75 | 1.75 | 0.77 | 0.14 | 0.45 |
| Lef/Tcf-inducible proteins (n = 7) | | | | | | | |
| <i>ID2</i> | 3.25 | 0.41 | 1.17 | 0.76 | 0.35 | 1.30 | 0.95 |
| <i>MSX2</i> | 38.20 | 14.00 | 11.80 | 8.00 | 3.28 | 4.80 | 2.46 |
| <i>MYC</i> | 1.64 | 1.52 | 1.59 | 0.35 | 1.73 | 3.96 | 1.84 |
| <i>SOX9</i> | 1.25 | 4.86 | 1.80 | 5.09 | 2.43 | 0.24 | 1.12 |
| <i>WISP1</i> | 0.18 | 0.86 | 0.11 | 0.00 | 1.20 | 0.12 | 0.02 |
| <i>TWIST1</i> | 1.31 | 1.20 | 0.31 | 3.50 | 0.71 | 1.39 | 0.56 |
| <i>BMP2</i> | 0.92 | 0.96 | 13.18 | 5.18 | 0.86 | 0.20 | 4.48 |
| Noncanonical Wnt signal: Wnt/calcium pathway (n = 2) | | | | | | | |
| <i>CAMK2B</i> | 12.18 | 18.36 | 4.08 | 0.00 | 3.54 | 0.00 | 3.48 |
| <i>PRKCQ</i> | 3.13 | 0.91 | 3.36 | 6.16 | 1.92 | 1.95 | 2.00 |

NOTE: The genes indicated in bold were found to be differentially expressed.

^aFor each gene, mRNA levels were normalized to the 10 dermal neurofibromas.

Table 3. Relationship between mRNA levels of the 24 identified genes and stem cell marker and EMT marker genes

| | Stem cell markers | | EMT markers | | |
|--|--|---|---|--|---|
| | <i>PROM1</i> | <i>NKX2-2</i> | <i>TWIST1</i> | <i>SLUG</i> | <i>CDH1</i> |
| Wnt ligands (<i>n</i> = 3) | | | | | |
| <i>WNT2</i> | -0.355^a <i>P</i> = 0.007^b | -0.365 <i>P</i> = 0.005 | +0.285 <i>P</i> = 0.03 | NS | NS |
| <i>WNT5A</i> | +0.484 <i>P</i> = 0.0002 | +0.353 <i>P</i> = 0.007 | NS | NS | NS |
| <i>WNT9A</i> | -0.319 <i>P</i> = 0.015 | -0.406 <i>P</i> = 0.002 | NS | NS | NS |
| Wnt receptors (<i>n</i> = 2) | | | | | |
| <i>FZD1</i> | NS | NS | NS | NS | NS |
| <i>FZD8</i> | +0.398 <i>P</i> = 0.02 | NS | +0.468 <i>P</i> = 0.0003 | NS | -0.278 <i>P</i> = 0.03 |
| Wnt signal transduction (<i>n</i> = 8) | | | | | |
| <i>DKK1</i> | +0.610 <i>P</i> = 0.000001 | +0.385 <i>P</i> = 0.003 | +0.318 <i>P</i> = 0.015 | NS | NS |
| <i>DKK3</i> | -0.386 <i>P</i> = 0.003 | -0.413 <i>P</i> = 0.0015 | NS | NS | NS |
| <i>KREMEN1</i> | -0.439 <i>P</i> = 0.0008 | -0.327 <i>P</i> = 0.01 | NS | NS | +0.371 <i>P</i> = 0.0046 |
| <i>SFRP1</i> | NS | NS | +0.342 <i>P</i> = 0.009 | NS | NS |
| <i>SFRP4</i> | NS | -0.296 <i>P</i> = 0.024 | NS | -0.337 <i>P</i> = 0.024 | NS |
| <i>SFRP5</i> | NS | NS | NS | -0.322 <i>P</i> = 0.014 | NS |
| <i>TLE2</i> | NS | NS | NS | NS | NS |
| <i>WIF1</i> | +0.527 <i>P</i> = 0.00004 | +0.609 <i>P</i> = 0.000001 | +0.307 <i>P</i> = 0.019 | +0.392 <i>P</i> = 0.003 | NS |
| Wnt transcriptional factors (<i>n</i> = 2) | | | | | |
| <i>LEF1</i> | NS | NS | NS | NS | NS |
| <i>TCF7</i> | -0.520 <i>P</i> = 0.00006 | -0.400 <i>P</i> = 0.002 | NS | NS | NS |
| Lef/Tcf-inducible proteins (<i>n</i> = 7) | | | | | |
| <i>ID2</i> | +0.377 <i>P</i> = 0.004 | NS | +0.360 <i>P</i> = 0.006 | NS | NS |
| <i>MSX2</i> | +0.573 <i>P</i> = 0.000007 | +0.384 <i>P</i> = 0.003 | +0.433 <i>P</i> = 0.0009 | +0.293 <i>P</i> = 0.02 | NS |
| <i>MYC</i> | NS | NS | +0.305 <i>P</i> = 0.02 | NS | NS |
| <i>SOX9</i> | NS | NS | +0.344 <i>P</i> = 0.009 | NS | NS |
| <i>WISP1</i> | +0.630 <i>P</i> = 0.0000005 | +0.418 <i>P</i> = 0.001 | +0.309 <i>P</i> = 0.018 | +0.305 <i>P</i> = 0.02 | NS |
| <i>TWIST1</i> | NS | NS | +1.000 <i>P</i> < 10 ⁻⁷ | +0.289 <i>P</i> = 0.028 | NS |
| <i>BMP2</i> | +0.291 <i>P</i> = 0.027 | +0.314 <i>P</i> = 0.017 | +0.377 <i>P</i> = 0.0039 | +0.505 <i>P</i> = 0.00009 | NS |
| Noncanonical Wnt signal: Wnt/calcium pathway (<i>n</i> = 2) | | | | | |
| <i>CAMK2B</i> | +0.314 <i>P</i> = 0.017 | NS | NS | NS | NS |

(Continued on the following page)

Table 3. Relationship between mRNA levels of the 24 identified genes and stem cell marker and EMT marker genes (Cont'd)

| | Stem cell markers | | EMT markers | | |
|---------------|-------------------|---------------|----------------------------|----------------------------|-------------|
| | PROM1 | NKX2-2 | TWIST1 | SLUG | CDH1 |
| <i>PRKCCQ</i> | NS | NS | +0.260 <i>P</i> = 0.048 | +0.312 <i>P</i> = 0.017 | NS |

Abbreviation: NS, not significant.

^aSpearman correlation coefficient.

^b*P* value, Spearman rank correlation test.

The genes indicated in bold were found to be marked significantly differentially expressed (*P* < 0.01).

high statistical significant positive associations between *PROM1* and *NKX2-2*, and *WNT5A*, *DKK1*, *WIF1*, *MSX2*, and *WISP1* (*P* < 0.01 with both *PROM1* and *NKX2-2*), and high statistical significant negative associations between *PROM1* and *NKX2-2*, and *WNT2*, *DKK3*, *KREMEN1*, and *TCF7* (*P* < 0.01 with both *PROM1* and *NKX2-2*; Table 3).

Relationship between mRNA levels of 24 differentially Wnt pathway expressed genes and 5 major EMT markers (*TWIST1*, *SLUG*, *SNAIL*, *VIM*, and *CDH1*)

Regulation of the EMT is a crucial step in cancer development. *TWIST1*, an important transcription factor involved in EMT and upregulated in NF1-associated MPNST (19), is also a major LEF/TCF-inducible gene (<http://www.stanford.edu/~rnusse/pathways/targets.html>). In consequence, to explore the involvement of the Wnt pathway in a possible Schwann-mesenchymal transition during NF1 tumorigenesis, we first tested the expression of 5 major EMT markers (*TWIST1*, *SLUG*, *SNAIL*, *VIM*, and *CDH1*) in our series of 57 NF1-associated tumors. *TWIST1* and *SLUG* were overexpressed (1.6- and 2.1-fold, respectively) in the MPNSTs (*P* = 0.005 and 0.001, respectively), whereas *CDH1* was underexpressed (11-fold; *P* = 0.0006). *SNAIL* and *VIM* showed similar mRNA levels in dermal neurofibromas, plexiform neurofibromas, and MPNSTs. We next tested the relationship between the expression of the 24 identified Wnt genes and of the 3 differentially expressed EMT marker genes (i.e., *TWIST1*, *SLUG*, and *CDH1*). We observed high statistical significant positive associations (*P* < 0.01) between *TWIST1* and *FZD8*, *SFRP1*, *ID2*, *MSX2*, *SOX9*, and *BMP2*, between *SLUG* and *WIF1* and *BMP2*, and between *CDH1* and *KREMEN1*. *CDH1* and *KREMEN1* showed a correlated decreased expression in MPNSTs (Table 3). It is noteworthy that we observed a high statistical significant positive association between *SLUG* and both *PROM1* and *NKX2-2* (*P* = 0.0033 and 0.00068, respectively).

In vitro consequences of NF1 inactivation on Wnt pathway activation state

To analyze the effects of the *NF1* gene inactivation on the Wnt pathway, we knocked down the expression of *NF1* in 2 human cell lines (an embryonic kidney cell line: HEK293

and a breast adenocarcinoma cell line: MCF-7) and 1 mouse Schwann cell line (MSC80) by siRNAs strategy. Cells were transfected with either a nontargeting siRNA (NT) or a siRNA directed against *NF1*. The efficacy of the knockdown of the *NF1* expression was tested by real-time RT-PCR and Western blot. In MSC80 cell line, we found a decreased *Nf1* expression at both mRNA and protein (neurofibromin) levels (Fig. 3A). In human cell lines (HEK293 and MCF-7), a decreased *NF1* expression was confirmed at mRNA level (data not shown).

In the 2 human cell lines (HEK293 and MCF-7), mRNA expression of 24 Wnt pathway genes (cf. supra) was analyzed after the knockdown of *NF1*. Those 2 non-Schwann cell lines showed no clear Wnt gene expression difference for the majority of the 14 upregulated and the 6 downregulated genes in MPNST biopsies and no difference was found in the amount of the active as well as the total β -catenin quantified by Western blot (data not shown).

Similarly, no clear expression difference was found between the MEFs derived from wild-type mice and the MEFs derived from *Nf1*^{-/-} mice, in the majority of the 14 upregulated and of the 6 downregulated genes in MPNST biopsies (data not shown).

In MSC80 Schwann cells, we used a Wnt pathway reporter assay to determine whether the canonical Wnt signaling pathway was modulated after the knockdown of *Nf1*. The silencing of *Nf1* increased by 3-folds (*P* < 0.01) the promoter activity of SuperTOP-Flash-Luc in MSC80 (Fig. 3B). The knockdown of *Nf1* did not alter the promoter activity of SuperFOP-Flash-Luc, a construct that lacks any binding sites for TCF/LEF transcription factors (Fig. 3B). Furthermore, the transcript of *Axin2*, a target gene of Wnt pathway was increased by 2-folds after the silencing of *Nf1* in MSC80 cells (Fig. 3C). To assess whether the knockdown of *Nf1* altered the expression of β -catenin at the protein level, we have quantified by Western blot the amount of the active as well as the total β -catenin. In MSC80 transfected with the siRNA against *Nf1*, we observed a 2-folds increase of the ratio of active- β -catenin/total- β -catenin compared with the control cells (Fig. 3D).

Altogether, those data show that the knockdown of *NF1* in Schwann cells enhances the activity of Wnt/ β -catenin pathway. Those data suggest cell type-specific

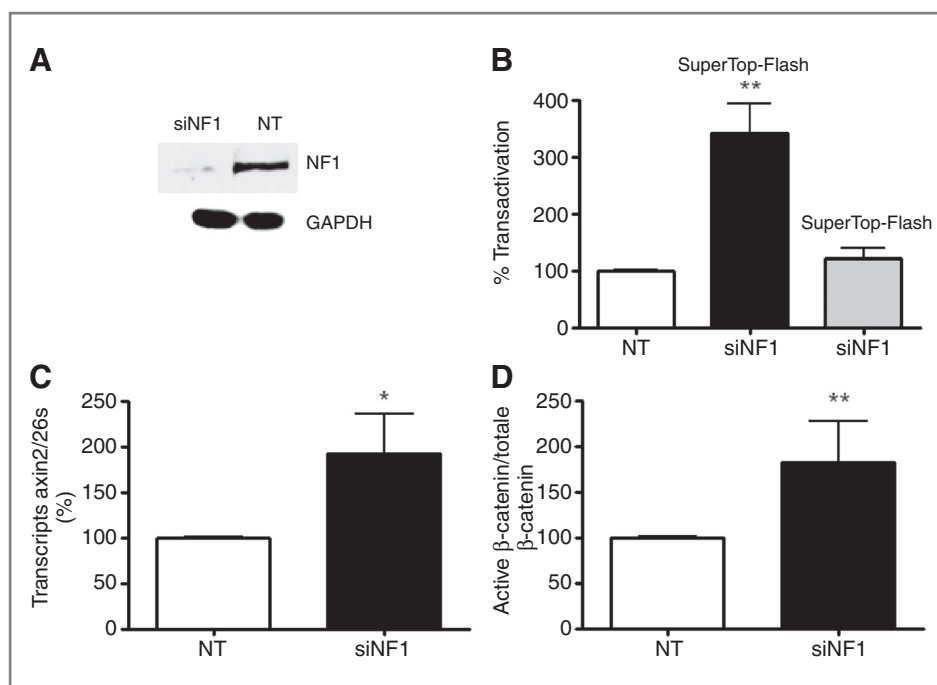


Figure 3. Effect of *Nf1* knockdown on Wnt pathway in MSC80 cells. A, MSC80 cells were transfected with either siRNA-targeting *NF1* or nontargeting siRNA (NT). Western blots using anti-neurofibromin antibodies were performed to verify *Nf1* inactivation at protein level in MSC80 cells. GAPDH was used to normalize the Western blots. Results were reproduced in 3 independent experiments, and figures represent a typical experiment. B, MSC80 cells were transiently cotransfected by the SuperTOP-Flash Luciferase or SuperFOP-Flash Luciferase plasmids with either nontargeting (NT) siRNA or siRNA against *NF1*. Luciferase activity was then analyzed. *, $P < 0.05$, and **, $P < 0.01$ by Tukey *post hoc* tests after one-way ANOVA when compared with control. C, MSC80 cells were transfected with either NT or a siRNA against *Nf1*. Total RNA was extracted and RT-qPCR was performed using specific primer recognizing *Axin2*. D, Western blots were performed using anti-active (dephosphorylated β -catenin) and anti-total β -catenin antibodies. GAPDH was used to normalize the Western blots. The Western blots were quantified using Image J software (rsb.info.nih.gov).

consequences of *NF1* knockdown as Wnt pathway activation was not observed in epithelial (MCF-7) or kidney (HEK293) cell lines, or in MEFs cells but only in Schwann (MSC80) cell lines.

Discussion

WNT signaling pathway orchestrates highly complex molecular events. Aberrant activation of Wnt pathway could trigger cell malignant transformation. In the last 20 years, involvement of the Wnt pathway has mainly been revealed in human epithelial malignancies (31). However, the Wnt pathway may also play a role in tumors of mesenchymal origin (32). Mesenchymal stem cells could differentiate into Schwann cell-like cells (33). In this work, we therefore apprehended the role of Wnt pathway in *NF1* tumorigenesis and more particularly its link with cancer stem cells and putative Schwann–mesenchymal transition.

Wnt pathway is tightly implicated in the myelination process elicited by Schwann cells. We have shown that the selective inhibition of Wnt components by siRNA or dominant negative forms inhibits the expression of myelin genes in mouse Schwann cells (34, 35). Moreover, the activation of Wnt signaling by recombinant Wnt ligands increases the transcription of myelin genes. Importantly, loss-of-function analyses in zebrafish embryos show, *in vivo*, a key role for

Wnt/ β -catenin signaling in the initiation of myelination and in myelin sheath compaction in the central and peripheral nervous systems. Inhibition of Wnt/ β -catenin signaling resulted in hypomyelination, without affecting Schwann cells and oligodendrocytes generation or axonal integrity (21). Thus, the dysregulation of this pathway could lead to either developmental defects or tumorigenesis.

Nine genes were significantly deregulated in plexiform neurofibromas (as compared with dermal neurofibromas): 8 genes were upregulated and 1 was downregulated (Table 4). All these genes (except *WNT9A*, which seems endothelial cell specific) were expressed in normal and tumoral Schwann cells (Table 2). Our results show that among the 3 different Wnt pathways, the canonical Wnt pathway is mainly involved in plexiform neurofibroma development with deregulation of genes encoding major components of this Wnt pathway (Table 4). Little is known about the relevance of these genes (except *MYC*) to cancer biology. A few observations have however described implications of these genes in several cancer types (36–40). Taken together, these findings suggest an alteration of the canonical Wnt pathway *FZD1/SFRP1/TLE2/MYC* in plexiform neurofibroma development.

Our results also showed a major activation of the Wnt canonical pathway during the malignant transformation of plexiform neurofibromas in MPNSTs from *NF1* patients.

Table 4. Major deregulation of the Wnt pathway expression in plexiform neurofibromas and MPNSTs

| Plexiform neurofibromas | MPNSTs | Human tumor types with previous described alterations in WNT pathway components |
|---|---|---|
| Wnt canonical pathway: FZD1 , <i>SFRP4</i> , <i>SFRP5</i> , <i>TLE2</i> , and <i>MYC</i> | ● Upregulated genes FZD1 , <i>FZD8</i> , <i>DKK1</i> , <i>WIF1</i> , <i>LEF1</i> , <i>MSX2</i> , <i>ID2</i> , <i>WISP1</i> , <i>BMP2</i> , <i>TWIST1</i> , and <i>SOX9</i> | Neuroblastoma (36), colorectal cancer (37), and astrocytoma (39), sarcoma (31) |
| SFRP1 | ● Downregulated genes <i>WNT2</i> , SFRP1 , <i>DKK3</i> , <i>KREMEN1</i> , and <i>TCF7</i> | Breast carcinoma (38), Melanoma (40) |
| β-Catenin-independent Wnt pathway: <i>WNT9A</i> , CAMK2B and PRKCQ | ● Wnt/calcium pathway: upregulated genes <i>WNT5A</i> , CAMK2B and PRKCQ ● Wnt/calcium pathway: downregulated genes <i>WNT9A</i> | Melanoma (42–44) |

The genes indicated in bold were found altered both in plexiform neurofibromas and in MPNSTs.

The canonical Wnt pathway is mainly involved in plexiform neurofibromas and MPNSTs. Eight genes were significantly upregulated (*WNT9A*, *FZD1*, *SFRP4*, *SFRP5*, *TLE2*, *MYC*, *CAMK2B*, and *PRKCQ*) and one was downregulated (*SFRP1*) in plexiform neurofibromas (as compared with dermal neurofibromas). Fourteen genes were significantly upregulated (*WNT5A*, *FZD1*, *FZD8*, *DKK1*, *WIF1*, *LEF1*, *MSX2*, *ID2*, *WISP1*, *BMP2*, *TWIST1*, *SOX9*, *CAMK2B*, and *PRKCQ*), and 6 were downregulated (*WNT2*, *WNT9A*, *SFRP1*, *DKK3*, *KREMEN1*, and *TCF7*) in MPNSTs.

Indeed, 20 genes were significantly deregulated in the 16 NF1-related MPNSTs and the 7 MPNST cell lines (Fig. 1 and Supplementary Table S4). These deregulated genes encode molecules mainly involved in the canonical Wnt pathway (Table 4). Among them, *TWIST1* and more recently *SOX9* have already been identified as major genes involved in NF1 tumorigenesis (19, 41). By using immunohistochemical analysis, we confirmed an activation of the Wnt canonical pathway during the malignant transformation of plexiform neurofibromas in MPNSTs from NF1 patients (Fig. 3).

Wnt pathway expression analysis in a small set of non-NF1 (sporadic) MPNSTs also suggested an activation of the canonical Wnt pathway, as in the NF1-related MPNSTs. Our observation confirms previous results showing no difference in whole transcriptome profiling between sporadic and NF1-related MPNSTs that both present inactivation of the 2 *NF1* alleles (42).

An activation of the noncanonical Wnt/calcium pathway was also shown during the malignant transformation of plexiform neurofibromas in MPNSTs. Finally, our results showed a total absence of involvement of the second noncanonical Wnt pathway-planar cell polarity pathway—both in plexiform neurofibroma genesis, as well as in MPNSTs.

Very little is known about the link between Wnt pathway and receptor tyrosine kinase (RTK) RAS/MAPK and PI3K/AKT signaling pathways that are activated in NF1 tumorigenesis *via* the inactivation of the neurofibromin (encoded by *NF1*), which functions as a negative regulator of the RAS proteins. However, several studies with culture cells showed that activation of various tyrosine kinases (ERBB2, MET, and RON) can increase β-catenin signaling (43–45). Moreover, STI-571 (Glivec), a tyrosine kinase inhibitor,

downregulates the β-catenin–signaling activity and suppresses cell proliferation (46). Finally, additional studies showed that RAS pathway activation can strongly cooperate with Wnt signaling to drive development of several type of carcinoma *in vivo* (47, 48), and that PI3K/AKT pathway can regulate Wnt signaling in various cancers (49). Our study emphasizes the potential cooperative link between Wnt pathway and RAS/MAPK and PI3K/AKT signaling pathways in NF1-associated tumorigenesis. To translate our observations into potential therapies, further studies will crucial to know which pathway(s) are critical for this link.

We confirmed the NF1/WNT pathway crosstalk at the functional level. We showed that the silencing of the *Nf1* gene stimulated Wnt pathway activation in Schwann cell lines, as in an *in vitro* model. *Nf1* knockdown induced (i) a Wnt pathway luciferase reporter assay activation, and (ii) an increased active-β-catenin/total-β-catenin ratio (Fig. 3). Our data also suggest Schwann cell–specific consequences of *NF1* knockdown as no significant Wnt gene expression variation was found in 3 non-Schwann cell types (HEK293, MCF-7, and MEFs).

We observed a strong association between Wnt pathway activation and both cancer stem cell reservoir (as judged on the expression level of stem cell markers *PROM1* and *NKX2.2*) and Schwann–mesenchymal transition (as judged on the expression level of EMT markers *TWIST1*, *SLUG*, and *CDH1*; Table 3). It is noteworthy that *NKX2.2* and *TWIST1* are major Wnt targets (<http://www.stanford.edu/~rnusse/pathways/targets.html>; ref. 50). Several studies suggested that mesenchymal stem cells could differentiate into Schwann cell–like cells in physiological conditions (32). In consequence, activation of Wnt signaling in NF1 tumorigenesis could promote the dedifferentiation of the tumoral

Schwann cells into tumoral mesenchyme cell-like. During the process of Schwann cell–mesenchyme transition, cell–cell adhesion may be downregulated and a mesenchymal phenotype acquired, associated with increased interaction with the extracellular matrix and an enhanced migratory capacity. These mesenchyme cell-like could be characterized by a higher ability to self-renew and to induce tumorigenesis, both characteristics of cancer stem cells. In this regard, we previously showed a downexpression of several key genes in the Schwann cell lineage (*ERBB3*, *ITGB4*, and *SOX1*) as well as that the deregulation of the Hedgehog pathway (19). Wnt, Hedgehog, and Notch pathways are the 3 major signaling pathways that regulate the proliferation of both endogenous normal stem cells and cancer stem cells (22). For example, Clement and colleagues suggest the Hedgehog pathway is involved in the regulation of the glioma cancer stem cells (51).

Finally, we assume that activation of the Wnt signaling pathway in NF1 tumorigenesis could explain the numerous skeletal manifestations in NF1 patients. Indeed, Wnt signaling is suggested to be the major common pathway leading to bone formation, with bone morphogenetic proteins (BMP) as only factors capable of initiating osteoblastogenesis from mesenchymal progenitors. Double inactivation of the *NF1* gene was observed in bone dysplasia found in NF1 (52). In this study, we showed upregulation of *BMP2* in MPNST samples. We can hypothesize that activation of Wnt pathway impaired *NF1*^{-/-} osteoblasts differentiation, and has a major role in osseous abnormalities observed in the patients with NF1.

In conclusion, our study reveals that activation of the Wnt signaling pathway is consistently seen in NF1 tumorigenesis. Full confirmation of the role of this pathway in NF1 needs further *in vivo* (animal model) studies. Our results

also suggest that Wnt inhibitors may represent a new therapeutic strategy for NF1.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Authors' Contributions

Conception and design: M. Hivelin, M. Vidaud, I. Bièche, C. Massaad, E. Pasmant

Development of methodology: A. Luscan, B. Parfait, I. Bièche

Acquisition of data (provided animals, acquired and managed patients, provided facilities, etc.): A. Luscan, G. Shackelford, N. Ortonne, F. Lallemand, K. Leroy, V. Dumaine, M. Hivelin, D. Borderie, L. Valeyrie-Allanore, F. Larousserie, B. Terris, L. Lantieri, P. Wolkenstein, I. Bièche

Analysis and interpretation of data (e.g., statistical analysis, biostatistics, computational analysis): A. Luscan, G. Shackelford, J. Masliah-Planchon, N. Ortonne, F. Lallemand, B. Parfait, I. Bièche, C. Massaad

Writing, review, and/or revision of the manuscript: A. Luscan, N. Ortonne, M. Hivelin, L. Valeyrie-Allanore, P. Wolkenstein, B. Parfait, I. Bièche, C. Massaad, E. Pasmant

Administrative, technical, or material support (i.e., reporting or organizing data, constructing databases): A. Luscan, I. Laurendeau, J. Varin, T. De Raedt, D. Vidaud, I. Bièche, E. Pasmant

Study supervision: M. Vidaud, I. Bièche, E. Pasmant

Acknowledgments

Sporadic MPNST samples were provided by CRB-PATHOLOGIE-COCHIN from service d'anatomie et cytologie pathologiques de l'hôpital Cochin.

Grant Support

This work was supported by Association pour la Recherche sur le Cancer, Association Neurofibromatoses et Recklinghausen, Ligue Française Contre les Neurofibromatoses, and Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Received March 22, 2013; revised September 27, 2013; accepted October 20, 2013; published OnlineFirst November 11, 2013.

References

- Friedman JM. Epidemiology of neurofibromatosis type 1. *Am J Med Genet* 1999;89:1–6.
- Sabbagh A, Pasmant E, Laurendeau I, Parfait B, Barbarot S, Guillot B, et al. Unravelling the genetic basis of variable clinical expression in neurofibromatosis 1. *Hum Mol Genet* 2009;18:2768–78.
- Zhu Y, Ghosh P, Charnay P, Burns DK, Parada LF. Neurofibromas in NF1: Schwann cell origin and role of tumor environment. *Science* 2002;296:920–2.
- Zheng H, Chang L, Patel N, Yang J, Lowe L, Burns DK, et al. Induction of abnormal proliferation by nonmyelinating schwann cells triggers neurofibroma formation. *Cancer Cell* 2008;13:117–28.
- Le LQ, Shipman T, Burns DK, Parada LF. Cell of origin and microenvironment contribution for NF1-associated dermal neurofibromas. *Cell Stem Cell* 2009;4:453–63.
- Leroy K, Dumas V, Martin-Garcia N, Falzone MC, Voisin MC, Wechsler J, et al. Malignant peripheral nerve sheath tumors associated with neurofibromatosis type 1: a clinicopathologic and molecular study of 17 patients. *Arch Dermatol* 2001;137:908–13.
- Tucker T, Wolkenstein P, Revuz J, Zeller J, Friedman JM. Association between benign and malignant peripheral nerve sheath tumors in NF1. *Neurology* 2005;65:205–11.
- Menon AG, Anderson KM, Riccardi VM, Chung RY, Whaley JM, Yandell DW, et al. Chromosome 17p deletions and p53 gene mutations associated with the formation of malignant neurofibrosarcomas in von Recklinghausen neurofibromatosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:5435–9.
- Kourea HP, Cordon-Cardo C, Dudas M, Leung D, Woodruff JM. Expression of p27(kip) and other cell cycle regulators in malignant peripheral nerve sheath tumors and neurofibromas: the emerging role of p27(kip) in malignant transformation of neurofibromas. *Am J Pathol* 1999;155:1885–91.
- Nielsen GP, Stemmer-Rachamimov AO, Ino Y, Moller MB, Rosenberg AE, Louis DN. Malignant transformation of neurofibromas in neurofibromatosis 1 is associated with CDKN2A/p16 inactivation. *Am J Pathol* 1999;155:1879–84.
- DeClue JE, Heffelfinger S, Benvenuto G, Ling B, Li S, Rui W, et al. Epidermal growth factor receptor expression in neurofibromatosis type 1-related tumors and NF1 animal models. *J Clin Invest* 2000;105:1233–41.
- Perrone F, Tabano S, Colombo F, Dagrada G, Biringelli S, Gronchi A, et al. p15INK4b, p14ARF, and p16INK4a inactivation in sporadic and neurofibromatosis type 1-related malignant peripheral nerve sheath tumors. *Clin Cancer Res* 2003;9:4132–8.
- Polyak K, Hahn WC. Roots and stems: stem cells in cancer. *Nat Med* 2006;12:296–300.
- Reya T, Clevers H. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* 2005;434:843–50.
- Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 2009;139:871–90.

16. Joseph NM, Mosher JT, Buchstaller J, Snider P, McKeever PE, Lim M, et al. The loss of Nf1 transiently promotes self-renewal but not tumorigenesis by neural crest stem cells. *Cancer Cell* 2008;13:129–40.
17. Williams JP, Wu J, Johansson G, Rizvi TA, Miller SC, Geiger H, et al. Nf1 mutation expands an EGFR-dependent peripheral nerve progenitor that confers neurofibroma tumorigenic potential. *Cell Stem Cell* 2008;3:658–69.
18. Lévy P, Vidaud D, Leroy K, Laurendeau I, Wechsler J, Bolasco G, et al. Molecular profiling of malignant peripheral nerve sheath tumors associated with neurofibromatosis type 1, based on large-scale real-time RT-PCR. *Mol Cancer* 2004;3:20.
19. Miller SJ, Rangwala F, Williams J, Ackerman P, Kong S, Jegga AG, et al. Large-scale molecular comparison of human schwann cells to malignant peripheral nerve sheath tumor cell lines and tissues. *Cancer Res* 2006;66:2584–91.
20. Angers S, Moon RT. Proximal events in Wnt signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009;10:468–77.
21. Klaus A, Birchmeier W. Wnt signalling and its impact on development and cancer. *Nat Rev Cancer* 2008;8:387–98.
22. Takebe N, Harris PJ, Warren RQ, Ivy SP. Targeting cancer stem cells by inhibiting Wnt, Notch, and Hedgehog pathways. *Nat Rev Clin Oncol* 2011;8:97–106.
23. Avellana-Adalid V, Bachelin C, Lachapelle F, Escricu C, Ratzkin B, Baron-Van Evercooren A. *In vitro* and *in vivo* behaviour of NDF-expanded monkey Schwann cells. *Eur J Neurosci* 1998;10:291–300.
24. Bachelin C, Lachapelle F, Girard C, Moissonnier P, Serguera-Lagache C, Mallet J, et al. Efficient myelin repair in the macaque spinal cord by autologous grafts of Schwann cells. *Brain* 2005;128:540–9.
25. Rosenbaum T, Rosenbaum C, Winner U, Müller HW, Lenard HG, Hanemann CO. Long-term culture and characterization of human neurofibroma-derived Schwann cells. *J Neurosci Res* 2000;61:524–32.
26. Royer B, Varadaradjalou S, Saas P, Gabiot AC, Kantelip B, Féger F, et al. Autocrine regulation of cord blood-derived human mast cell activation by IL-10. *J Allergy Clin Immunol* 2001;108:80–6.
27. Boutry JM, Hauw JJ, Gansmuller A, Di-Bert N, Pouchelet M, Baron-Van Evercooren A. Establishment and characterization of a mouse Schwann cell line which produces myelin *in vivo*. *J Neurosci Res* 1992;32:15–26.
28. Pasmant E, Masliah-Planchon J, Lévy P, Laurendeau I, Ortonne N, Parfait B, et al. Identification of genes potentially involved in the increased risk of malignancy in NF1-microdeleted patients. *Mol Med* 2011;17:79–87.
29. Pasmant E, Ortonne N, Rittié L, Laurendeau I, Lévy P, Lazar V, et al. Differential expression of CCN1/CYR61, CCN3/NOV, CCN4/WISP1, and CCN5/WISP2 in neurofibromatosis type 1 tumorigenesis. *J Neuropathol Exp Neurol* 2010;69:60–9.
30. Massaad C, Garlatti M, Wilson EM, Cadepond F, Barouki R. A natural sequence consisting of overlapping glucocorticoid-responsive elements mediates glucocorticoid, but not androgen, regulation of gene expression. *Biochem J* 2000;1:123–9.
31. Behrens J, Lustig B. The Wnt connection to tumorigenesis. *Int J Dev Biol* 2004;48:477–87.
32. Matushansky I, Hernandez E, Socci ND, Mills JE, Matos TA, Edgar MA, et al. Derivation of sarcomas from mesenchymal stem cells via inactivation of the Wnt pathway. *J Clin Invest* 2007;117:3248–57.
33. Brohlin M, Mahay D, Novikov LN, Terenghi G, Wiberg M, Shawcross SG, et al. Characterisation of human mesenchymal stem cells following differentiation into Schwann cell-like cells. *Neurosci Res* 2009;64:41–9.
34. Tawk M, Makoukji J, Belle M, Fonte C, Trousson A, Hawkins T, et al. Wnt/ β -catenin signaling is an essential and direct driver of myelin gene expression and myelination. *J Neurosci* 2011;31:3729–42.
35. Makoukji J, Belle M, Meffre D, Stassart R, Grenier J, Shackelford G, et al. Lithium enhances remyelination of peripheral nerves. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109:3973–8.
36. Flahaut M, Meier R, Coulon A, Nardou KA, Niggli FK, Martinet D, et al. The Wnt receptor FZD1 mediates chemoresistance in neuroblastoma through activation of the Wnt/ β -catenin pathway. *Oncogene* 2009;28:2245–56.
37. Tang D, Liu J, Wang DR, Yu HF, Li YK, Zhang JQ. Diagnostic and prognostic value of the methylation status of secreted frizzled-related protein 2 in colorectal cancer. *Clin Invest Med* 2011;34:E88–95.
38. Cowling VH, D'Cruz CM, Chodosh LA, Cole MD. c-Myc transforms human mammary epithelial cells through repression of the Wnt inhibitors DKK1 and SFRP1. *Mol Cell Biol* 2007;27:5135–46.
39. Rorive S, Maris C, Debeir O, Sandras F, Vidaud M, Bièche I, et al. Exploring the distinctive biological characteristics of pilocytic and low-grade diffuse astrocytomas using microarray gene expression profiles. *J Neuropathol Exp Neurol* 2006;65:794–807.
40. Kuphal S, Lodermeier S, Bataille F, Schuierer M, Hoang BH, Bosserhoff AK. Expression of Dickkopf genes is strongly reduced in malignant melanoma. *Oncogene* 2006;25:5027–36.
41. Miller SJ, Jessen WJ, Mehta T, Hardiman A, Sites E, Kaiser S, et al. Integrative genomic analyses of neurofibromatosis tumours identify SOX9 as a biomarker and survival gene. *EMBO Mol Med* 2009;1:236–48.
42. Endo M, Yamamoto H, Setsu N, Kohashi K, Takahashi Y, Ishii T, et al. Prognostic significance of AKT/mTOR and MAPK pathways and antitumor effect of mTOR inhibitor in NF1-related and sporadic malignant peripheral nerve sheath tumors. *Clin Cancer Res* 2013;19:450–61.
43. Dissanayake SK, Olkhanud PB, O'Connell MP, Carter A, French AD, Camilli TC, et al. Wnt5A regulates expression of tumor-associated antigens in melanoma via changes in signal transducers and activators of transcription 3 phosphorylation. *Cancer Res* 2008;68:10205–14.
44. Danilkovitch-Miagkova A, Miagkov A, Skeel A, Nakaigawa N, Zbar B, Leonard EJ. Oncogenic mutants of RON and MET receptor tyrosine kinases cause activation of the β -catenin pathway. *Mol Cell Biol* 2001;21:5857–68.
45. Bonvini P, An WG, Rosolen A, Nguyen P, Trepel J, Garcia de Herreros A, et al. Geldanamycin abrogates ErbB2 association with proteasome-resistant β -catenin in melanoma cells, increases β -catenin-E-cadherin association, and decreases β -catenin-sensitive transcription. *Cancer Res* 2001;61:1671–7.
46. Zhou L, An N, Haydon RC, Zhou Q, Cheng H, Peng Y, et al. Tyrosine kinase inhibitor STI-571/Gleevec down-regulates the β -catenin signaling activity. *Cancer Lett* 2003;193:161–70.
47. Phelps RA, Chidester S, Dehghanizadeh S, Phelps J, Sandoval IT, Rai K, et al. A two-step model for colon adenoma initiation and progression caused by APC loss. *Cell* 2009;137:623–34.
48. Pearson HB, Pesses TJ, Clarke AR. K-ras and Wnt signaling synergize to accelerate prostate tumorigenesis in the mouse. *Cancer Res* 2009;69:94–101.
49. Nteliopoulos G, Marley SB, Gordon MY. Influence of PI-3K/Akt pathway on Wnt signaling in regulating myeloid progenitor cell proliferation. Evidence for a role of autocrine/paracrine Wnt regulation. *Br J Haematol* 2009;146:637–51.
50. Howe LR, Watanabe O, Leonard J, Brown AM. Twist is up-regulated in response to Wnt1 and inhibits mouse mammary cell differentiation. *Cancer Res* 2003;63:1906–13.
51. Clement V, Sanchez P, de Tribolet N, Radovanovic I, Ruiz i Altaba A. HEDGEHOG-GLI1 signaling regulates human glioma growth, cancer stem cell self-renewal, and tumorigenicity. *Curr Biol* 2007;17:165–72.
52. Stevenson DA, Zhou H, Ashrafi S, Messiaen LM, Carey JC, D'Astous JL, et al. Double inactivation of NF1 in tibial pseudarthrosis. *Am J Hum Genet* 2006;79:143–8.

BIBLIOGRAPHIE

- Aarnio, V., Storvik, M., Lehtonen, M., Asikainen, S., Reisner, K., Callaway, J., Rudgalvyte, M., Lakso, M., and Wong, G. (2010). Fatty acid composition and gene expression profiles are altered in aryl hydrocarbon receptor-1 mutant *Caenorhabditis elegans*. *Comp. Biochem. Physiol. Toxicol. Pharmacol. CBP* *151*, 318–324.
- Abbott, B.D., and Probst, M.R. (1995). Developmental expression of two members of a new class of transcription factors: II. Expression of aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator in the C57BL/6N mouse embryo. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* *204*, 144–155.
- Abildayeva, K., Jansen, P.J., Hirsch-Reinshagen, V., Bloks, V.W., Bakker, A.H.F., Ramaekers, F.C.S., de Vente, J., Groen, A.K., Wellington, C.L., Kuipers, F., et al. (2006). 24(S)-hydroxycholesterol participates in a liver X receptor-controlled pathway in astrocytes that regulates apolipoprotein E-mediated cholesterol efflux. *J. Biol. Chem.* *281*, 12799–12808.
- Ábrahám, H., Vincze, A., Veszprémi, B., Kravják, A., Gömöri, É., Kovács, G.G., and Seress, L. (2012). Impaired myelination of the human hippocampal formation in Down syndrome. *Int. J. Dev. Neurosci. Off. J. Int. Soc. Dev. Neurosci.* *30*, 147–158.
- Adlkofer, K., Martini, R., Aguzzi, A., Zielasek, J., Toyka, K.V., and Suter, U. (1995). Hypermyelination and demyelinating peripheral neuropathy in *Pmp22*-deficient mice. *Nat. Genet.* *11*, 274–280.
- Ahima, R.S., and Flier, J.S. (2000). Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* *11*, 327–332.
- Akahoshi, E., Yoshimura, S., and Ishihara-Sugano, M. (2006). Over-expression of AhR (aryl hydrocarbon receptor) induces neural differentiation of Neuro2a cells: neurotoxicology study. *Environ. Health Glob. Access Sci. Source* *5*, 24.
- Alexandrov, P., Cui, J.-G., Zhao, Y., and Lukiw, W.J. (2005). 24S-hydroxycholesterol induces inflammatory gene expression in primary human neural cells. *Neuroreport* *16*, 909–913.
- Almeida, R.G., Czopka, T., French-Constant, C., and Lyons, D.A. (2011). Individual axons regulate the myelinating potential of single oligodendrocytes in vivo. *Dev. Camb. Engl.* *138*, 4443–4450.
- Andersson, S., Gustafsson, N., Warner, M., and Gustafsson, J.-A. (2005). Inactivation of liver X receptor beta leads to adult-onset motor neuron degeneration in male mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 3857–3862.
- Andreasen, E.A., Hahn, M.E., Heideman, W., Peterson, R.E., and Tanguay, R.L. (2002). The zebrafish (*Danio rerio*) aryl hydrocarbon receptor type 1 is a novel vertebrate receptor. *Mol. Pharmacol.* *62*, 234–249.
- Assennato, G., Cervino, D., Emmett, E.A., Longo, G., and Merlo, F. (1989). Follow-up of subjects who developed chloracne following TCDD exposure at Seveso. *Am. J. Ind. Med.* *16*, 119–125.
- Atanososki, S., Notterpek, L., Lee, H.-Y., Castagner, F., Young, P., Ehrengruber, M.U., Meijer, D., Sommer, L., Stavnezer, E., Colmenares, C., et al. (2004). The protooncogene *Ski* controls Schwann cell proliferation and myelination. *Neuron* *43*, 499–511.
- Augereau, P., Badia, E., Fuentes, M., Rabenoelina, F., Corniou, M., Derocq, D., Balaguer, P., and Cavailles, V. (2006a). Transcriptional regulation of the human NR1P1/RIP140 gene by estrogen is modulated by dioxin signalling. *Mol. Pharmacol.* *69*, 1338–1346.
- Augereau, P., Badia, E., Carascossa, S., Castet, A., Fritsch, S., Harmand, P.-O., Jalaguier, S., and Cavailles, V. (2006b). The nuclear receptor transcriptional coregulator RIP140. *Nucl. Recept. Signal.* *4*, e024.

- Azim, K., and Butt, A.M. (2011). GSK3 β negatively regulates oligodendrocyte differentiation and myelination in vivo. *Glia* 59, 540–553.
- Baba, T., Mimura, J., Gradin, K., Kuroiwa, A., Watanabe, T., Matsuda, Y., Inazawa, J., Sogawa, K., and Fujii-Kuriyama, Y. (2001). Structure and expression of the Ah receptor repressor gene. *J. Biol. Chem.* 276, 33101–33110.
- Backlund, M., and Ingelman-Sundberg, M. (2005). Regulation of aryl hydrocarbon receptor signal transduction by protein tyrosine kinases. *Cell. Signal.* 17, 39–48.
- Bacsi, S.G., Reisz-Porszasz, S., and Hankinson, O. (1995). Orientation of the heterodimeric aryl hydrocarbon (dioxin) receptor complex on its asymmetric DNA recognition sequence. *Mol. Pharmacol.* 47, 432–438.
- Barbieri, S., Pirovano, C., Scarlato, G., Tarchini, P., Zappa, A., and Maranzana, M. (1988). Long-term effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on the peripheral nervous system. Clinical and neurophysiological controlled study on subjects with chloracne from the Seveso area. *Neuroepidemiology* 7, 29–37.
- Baumann, N., and Pham-Dinh, D. (2001). Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol. Rev.* 81, 871–927.
- Le Beau, M.M., Carver, L.A., Espinosa, R., 3rd, Schmidt, J.V., and Bradfield, C.A. (1994). Chromosomal localization of the human AHR locus encoding the structural gene for the Ah receptor to 7p21-->p15. *Cytogenet. Cell Genet.* 66, 172–176.
- Bell, D.R., and Poland, A. (2000). Binding of aryl hydrocarbon receptor (AhR) to AhR-interacting protein. The role of hsp90. *J. Biol. Chem.* 275, 36407–36414.
- Berger, P., Young, P., and Suter, U. (2002). Molecular cell biology of Charcot-Marie-Tooth disease. *Neurogenetics* 4, 1–15.
- Bernshausen, T., Jux, B., Esser, C., Abel, J., and Fritsche, E. (2006). Tissue distribution and function of the Aryl hydrocarbon receptor repressor (AhRR) in C57BL/6 and Aryl hydrocarbon receptor deficient mice. *Arch. Toxicol.* 80, 206–211.
- Berriel Diaz, M., Kronen-Herzig, A., Metzger, D., Ziegler, A., Vegiopoulos, A., Klingenspor, M., Müller-Decker, K., and Herzig, S. (2008). Nuclear receptor cofactor receptor interacting protein 140 controls hepatic triglyceride metabolism during wasting in mice. *Hepatology*. Baltim. Md 48, 782–791.
- Bhatheja, K., and Field, J. (2006). Schwann cells: origins and role in axonal maintenance and regeneration. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 38, 1995–1999.
- Birnbaum, L.S., and Tuomisto, J. (2000). Non-carcinogenic effects of TCDD in animals. *Food Addit. Contam.* 17, 275–288.
- Bizzozero, O.A., McGarry, J.F., and Lees, M.B. (1987). Autoacylation of myelin proteolipid protein with acyl coenzyme A. *J. Biol. Chem.* 262, 13550–13557.
- Blaschke, F., Takata, Y., Caglayan, E., Collins, A., Tontonoz, P., Hsueh, W.A., and Tangirala, R.K. (2006). A nuclear receptor corepressor-dependent pathway mediates suppression of cytokine-induced C-reactive protein gene expression by liver X receptor. *Circ. Res.* 99, e88–99.
- Boison, D., Büsow, H., D’Urso, D., Müller, H.W., and Stoffel, W. (1995). Adhesive properties of proteolipid protein are responsible for the compaction of CNS myelin sheaths. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 15, 5502–5513.
- Boulanger, J.J., and Messier, C. (2014). From precursors to myelinating oligodendrocytes: Contribution of intrinsic and extrinsic factors to white matter plasticity in the adult brain. *Neuroscience* 269C, 343–366.

- Brennan, A., Dean, C.H., Zhang, A.L., Cass, D.T., Mirsky, R., and Jessen, K.R. (2000). Endothelins control the timing of Schwann cell generation in vitro and in vivo. *Dev. Biol.* 227, 545–557.
- Bretillon, L., Sidén, A., Wahlund, L.O., Lütjohann, D., Minthon, L., Crisby, M., Hillert, J., Groth, C.G., Diczfalusy, U., and Björkhem, I. (2000). Plasma levels of 24S-hydroxycholesterol in patients with neurological diseases. *Neurosci. Lett.* 293, 87–90.
- Britsch, S., Goerich, D.E., Riethmacher, D., Peirano, R.I., Rossner, M., Nave, K.A., Birchmeier, C., and Wegner, M. (2001). The transcription factor Sox10 is a key regulator of peripheral glial development. *Genes Dev.* 15, 66–78.
- Brösamle, C., and Halpern, M.E. (2002). Characterization of myelination in the developing zebrafish. *Glia* 39, 47–57.
- Brown, A.J., Leong, S.L., Dean, R.T., and Jessup, W. (1997). 7-Hydroperoxycholesterol and its products in oxidized low density lipoprotein and human atherosclerotic plaque. *J. Lipid Res.* 38, 1730–1745.
- Brown, J., 3rd, Theisler, C., Silberman, S., Magnuson, D., Gottardi-Littell, N., Lee, J.M., Yager, D., Crowley, J., Sambamurti, K., Rahman, M.M., et al. (2004). Differential expression of cholesterol hydroxylases in Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* 279, 34674–34681.
- Buckley, C.E., Goldsmith, P., and Franklin, R.J.M. (2008). Zebrafish myelination: a transparent model for remyelination? *Dis. Model. Mech.* 1, 221–228.
- Burns, J., Ouvrier, R.A., Yiu, E.M., Joseph, P.D., Kornberg, A.J., Fahey, M.C., and Ryan, M.M. (2009). Ascorbic acid for Charcot-Marie-Tooth disease type 1A in children: a randomised, double-blind, placebo-controlled, safety and efficacy trial. *Lancet Neurol.* 8, 537–544.
- Butler, R.A., Kelley, M.L., Powell, W.H., Hahn, M.E., and Van Beneden, R.J. (2001). An aryl hydrocarbon receptor (AHR) homologue from the soft-shell clam, *Mya arenaria*: evidence that invertebrate AHR homologues lack 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and beta-naphthoflavone binding. *Gene* 278, 223–234.
- Cannon, B., and Nedergaard, J. (2004). Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol. Rev.* 84, 277–359.
- Carascossa, S., Gobinet, J., Georget, V., Lucas, A., Badia, E., Castet, A., White, R., Nicolas, J.-C., Cavallès, V., and Jalaguier, S. (2006). Receptor-interacting protein 140 is a repressor of the androgen receptor activity. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 20, 1506–1518.
- Carré, J.-L., Goetz, B.D., O'Connor, L.T., Bremer, Q., and Duncan, I.D. (2002). Mutations in the rat myelin basic protein gene are associated with specific alterations in other myelin gene expression. *Neurosci. Lett.* 330, 17–20.
- Caruso, D., Scurati, S., Maschi, O., De Angelis, L., Roglio, I., Giatti, S., Garcia-Segura, L.M., and Melcangi, R.C. (2008). Evaluation of neuroactive steroid levels by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in central and peripheral nervous system: effect of diabetes. *Neurochem. Int.* 52, 560–568.
- Castet, A., Boulahtouf, A., Versini, G., Bonnet, S., Augereau, P., Vignon, F., Khochbin, S., Jalaguier, S., and Cavallès, V. (2004). Multiple domains of the Receptor-Interacting Protein 140 contribute to transcription inhibition. *Nucleic Acids Res.* 32, 1957–1966.
- Castet, A., Herledan, A., Bonnet, S., Jalaguier, S., Vanacker, J.-M., and Cavallès, V. (2006). Receptor-interacting protein 140 differentially regulates estrogen receptor-related receptor transactivation depending on target genes. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 20, 1035–1047.
- Cavallès, V., Dauvois, S., Danielian, P.S., and Parker, M.G. (1994). Interaction of proteins with transcriptionally active estrogen receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 10009–10013.

- Cavaillès, V., Dauvois, S., L'Horset, F., Lopez, G., Hoare, S., Kushner, P.J., and Parker, M.G. (1995). Nuclear factor RIP140 modulates transcriptional activation by the estrogen receptor. *EMBO J.* *14*, 3741–3751.
- Cermenati, G., Giatti, S., Cavaletti, G., Bianchi, R., Maschi, O., Pesaresi, M., Abbiati, F., Volonterio, A., Saez, E., Caruso, D., et al. (2010). Activation of the liver X receptor increases neuroactive steroid levels and protects from diabetes-induced peripheral neuropathy. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *30*, 11896–11901.
- Céspedes, M.A., Galindo, M.I., and Couso, J.P. (2010). Dioxin toxicity in vivo results from an increase in the dioxin-independent transcriptional activity of the aryl hydrocarbon receptor. *PLoS One* *5*, e15382.
- Chan, J.R., Cosgaya, J.M., Wu, Y.J., and Shooter, E.M. (2001). Neurotrophins are key mediators of the myelination program in the peripheral nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 14661–14668.
- Chance, P.F. (2006). Inherited focal, episodic neuropathies: hereditary neuropathy with liability to pressure palsies and hereditary neuralgic amyotrophy. *Neuromolecular Med.* *8*, 159–174.
- Chance, P.F., Alderson, M.K., Leppig, K.A., Lensch, M.W., Matsunami, N., Smith, B., Swanson, P.D., Odelberg, S.J., Distèche, C.M., and Bird, T.D. (1993). DNA deletion associated with hereditary neuropathy with liability to pressure palsies. *Cell* *72*, 143–151.
- Chang, J.Y., and Liu, L.Z. (1997). 25-Hydroxycholesterol causes death but does not prevent nerve growth factor-induced neurite outgrowth in PC12 cells. *Neurochem. Int.* *31*, 517–523.
- Chang, J.Y., and Liu, L.Z. (1998). Neurotoxicity of cholesterol oxides on cultured cerebellar granule cells. *Neurochem. Int.* *32*, 317–323.
- Chen, J., Zacharek, A., Cui, X., Shehadah, A., Jiang, H., Roberts, C., Lu, M., and Chopp, M. (2010). Treatment of stroke with a synthetic liver X receptor agonist, TO901317, promotes synaptic plasticity and axonal regeneration in mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* *30*, 102–109.
- Chen, Y., Hu, X., and Wei, L.-N. (2004). Molecular interaction of retinoic acid receptors with coregulators PCAF and RIP140. *Mol. Cell. Endocrinol.* *226*, 43–50.
- Cheshire, D.R., Dunn, T.A., Ewing, C.M., Luo, J., and Isaacs, W.B. (2004). Identification of aryl hydrocarbon receptor as a putative Wnt/beta-catenin pathway target gene in prostate cancer cells. *Cancer Res.* *64*, 2523–2533.
- Chevallier, A., Mialot, A., Petit, J.-M., Fernandez-Salguero, P., Barouki, R., Coumoul, X., and Beraneck, M. (2013). Oculomotor deficits in aryl hydrocarbon receptor null mouse. *PLoS One* *8*, e53520.
- Chew, L.-J., Shen, W., Ming, X., Senatorov, V.V., Jr, Chen, H.-L., Cheng, Y., Hong, E., Knobloch, S., and Gallo, V. (2011). SRY-box containing gene 17 regulates the Wnt/ β -catenin signaling pathway in oligodendrocyte progenitor cells. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *31*, 13921–13935.
- Christian, M., Tullet, J.M.A., and Parker, M.G. (2004). Characterization of four autonomous repression domains in the corepressor receptor interacting protein 140. *J. Biol. Chem.* *279*, 15645–15651.
- Christian, M., Kiskinis, E., Debevec, D., Leonardsson, G., White, R., and Parker, M.G. (2005). RIP140-targeted repression of gene expression in adipocytes. *Mol. Cell. Biol.* *25*, 9383–9391.
- Cinti, S. (2005). The adipose organ. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* *73*, 9–15.
- Ciolino, H.P., Daschner, P.J., and Yeh, G.C. (1998). Resveratrol inhibits transcription of CYP1A1 in vitro by preventing activation of the aryl hydrocarbon receptor. *Cancer Res.* *58*, 5707–5712.
- Citri, Y., Colot, H.V., Jacquier, A.C., Yu, Q., Hall, J.C., Baltimore, D., and Rosbash, M. (1987). A family of unusually spliced biologically active transcripts encoded by a *Drosophila* clock gene. *Nature* *326*, 42–47.

- Cui, G., Qin, X., Wu, L., Zhang, Y., Sheng, X., Yu, Q., Sheng, H., Xi, B., Zhang, J.Z., and Zang, Y.Q. (2011). Liver X receptor (LXR) mediates negative regulation of mouse and human Th17 differentiation. *J. Clin. Invest.* *121*, 658–670.
- Cui, W., Sun, Y., Wang, Z., Xu, C., Peng, Y., and Li, R. (2012). Liver X receptor activation attenuates inflammatory response and protects cholinergic neurons in APP/PS1 transgenic mice. *Neuroscience* *210*, 200–210.
- D'Antonio, M., Droggiti, A., Feltri, M.L., Roes, J., Wrabetz, L., Mirsky, R., and Jessen, K.R. (2006). TGFbeta type II receptor signaling controls Schwann cell death and proliferation in developing nerves. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *26*, 8417–8427.
- Darling, D.L., Yingling, J., and Wynshaw-Boris, A. (2005). Role of 14-3-3 proteins in eukaryotic signaling and development. *Curr. Top. Dev. Biol.* *68*, 281–315.
- Davarinos, N.A., and Pollenz, R.S. (1999). Aryl hydrocarbon receptor imported into the nucleus following ligand binding is rapidly degraded via the cytoplasmic proteasome following nuclear export. *J. Biol. Chem.* *274*, 28708–28715.
- Decker, L., Desmarquet-Trin-Dinh, C., Taillebourg, E., Ghislain, J., Vallat, J.-M., and Charnay, P. (2006). Peripheral myelin maintenance is a dynamic process requiring constant Krox20 expression. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *26*, 9771–9779.
- Dehal, P., Satou, Y., Campbell, R.K., Chapman, J., Degnan, B., De Tomaso, A., Davidson, B., Di Gregorio, A., Gelpke, M., Goodstein, D.M., et al. (2002). The draft genome of *Ciona intestinalis*: insights into chordate and vertebrate origins. *Science* *298*, 2157–2167.
- Denison, M.S., and Nagy, S.R. (2003). Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* *43*, 309–334.
- Désarnaud, F., Bidichandani, S., Patel, P.I., Baulieu, E.E., and Schumacher, M. (2000). Glucocorticosteroids stimulate the activity of the promoters of peripheral myelin protein-22 and protein zero genes in Schwann cells. *Brain Res.* *865*, 12–16.
- Döhr, O., Sinning, R., Vogel, C., Münzel, P., and Abel, J. (1997). Effect of transforming growth factor-beta1 on expression of aryl hydrocarbon receptor and genes of Ah gene battery: clues for independent down-regulation in A549 cells. *Mol. Pharmacol.* *51*, 703–710.
- Dolwick, K.M., Swanson, H.I., and Bradfield, C.A. (1993). In vitro analysis of Ah receptor domains involved in ligand-activated DNA recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *90*, 8566–8570.
- Dougherty, E.J., and Pollenz, R.S. (2008). Analysis of Ah receptor-ARNT and Ah receptor-ARNT2 complexes in vitro and in cell culture. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* *103*, 191–206.
- Dowsing, B.J., Morrison, W.A., Nicola, N.A., Starkey, G.P., Bucci, T., and Kilpatrick, T.J. (1999). Leukemia inhibitory factor is an autocrine survival factor for Schwann cells. *J. Neurochem.* *73*, 96–104.
- Duclot, F., Lapiere, M., Fritsch, S., White, R., Parker, M.G., Maurice, T., and Cavallès, V. (2012). Cognitive impairments in adult mice with constitutive inactivation of RIP140 gene expression. *Genes Brain Behav.* *11*, 69–78.
- Duncan, D.M., Burgess, E.A., and Duncan, I. (1998). Control of distal antennal identity and tarsal development in *Drosophila* by spineless-aristopedia, a homolog of the mammalian dioxin receptor. *Genes Dev.* *12*, 1290–1303.
- Durand, B., Fero, M.L., Roberts, J.M., and Raff, M.C. (1998). p27Kip1 alters the response of cells to mitogen and is part of a cell-intrinsic timer that arrests the cell cycle and initiates differentiation. *Curr. Biol.* *8*, 431–440.

- Dzeletovic, N., McGuire, J., Daujat, M., Tholander, J., Ema, M., Fujii-Kuriyama, Y., Bergman, J., Maurel, P., and Poellinger, L. (1997). Regulation of dioxin receptor function by omeprazole. *J. Biol. Chem.* 272, 12705–12713.
- Eguchi, H., Hayashi, S., Watanabe, J., Gotoh, O., and Kawajiri, K. (1994). Molecular cloning of the human AH receptor gene promoter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 203, 615–622.
- Einheber, S., Hannocks, M.J., Metz, C.N., Rifkin, D.B., and Salzer, J.L. (1995). Transforming growth factor-beta 1 regulates axon/Schwann cell interactions. *J. Cell Biol.* 129, 443–458.
- Emmons, R.B., Duncan, D., Estes, P.A., Kiefel, P., Mosher, J.T., Sonnenfeld, M., Ward, M.P., Duncan, I., and Crews, S.T. (1999). The spineless-aristapedia and tango bHLH-PAS proteins interact to control antennal and tarsal development in *Drosophila*. *Dev. Camb. Engl.* 126, 3937–3945.
- Erickson, S.K., Cooper, A.D., Matsui, S.M., and Gould, R.G. (1977). 7-Ketocholesterol. Its effects on hepatic cholesterogenesis and its hepatic metabolism in vivo and in vitro. *J. Biol. Chem.* 252, 5186–5193.
- Evans, B.R., Karchner, S.I., Allan, L.L., Pollenz, R.S., Tanguay, R.L., Jenny, M.J., Sherr, D.H., and Hahn, M.E. (2008). Repression of aryl hydrocarbon receptor (AHR) signaling by AHR repressor: role of DNA binding and competition for AHR nuclear translocator. *Mol. Pharmacol.* 73, 387–398.
- Fallone, F., Villard, P.-H., Séréé, E., Rimet, O., Nguyen, Q.B., Bourgarel-Rey, V., Fouchier, F., Barra, Y., Durand, A., and Lacarelle, B. (2004). Retinoids repress Ah receptor CYP1A1 induction pathway through the SMRT corepressor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 322, 551–556.
- Fallone, F., Villard, P.-H., Decome, L., Séréé, E., Méo, M. de, Chacon, C., Durand, A., Barra, Y., and Lacarelle, B. (2005). PPARalpha activation potentiates AhR-induced CYP1A1 expression. *Toxicology* 216, 122–128.
- Fan, X., Kim, H.-J., Bouton, D., Warner, M., and Gustafsson, J.-A. (2008). Expression of liver X receptor beta is essential for formation of superficial cortical layers and migration of later-born neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 13445–13450.
- Fancy, S.P.J., Baranzini, S.E., Zhao, C., Yuk, D.-I., Irvine, K.-A., Kaing, S., Sanai, N., Franklin, R.J.M., and Rowitch, D.H. (2009). Dysregulation of the Wnt pathway inhibits timely myelination and remyelination in the mammalian CNS. *Genes Dev.* 23, 1571–1585.
- Fancy, S.P.J., Harrington, E.P., Yuen, T.J., Silbereis, J.C., Zhao, C., Baranzini, S.E., Bruce, C.C., Otero, J.J., Huang, E.J., Nusse, R., et al. (2011). Axin2 as regulatory and therapeutic target in newborn brain injury and remyelination. *Nat. Neurosci.* 14, 1009–1016.
- Fancy, S.P.J., Harrington, E.P., Baranzini, S.E., Silbereis, J.C., Shiow, L.R., Yuen, T.J., Huang, E.J., Lomvardas, S., and Rowitch, D.H. (2014). Parallel states of pathological Wnt signaling in neonatal brain injury and colon cancer. *Nat. Neurosci.* 17, 506–512.
- Feigenson, K., Reid, M., See, J., Crenshaw, E.B., 3rd, and Grinspan, J.B. (2009). Wnt signaling is sufficient to perturb oligodendrocyte maturation. *Mol. Cell. Neurosci.* 42, 255–265.
- Feng, S., Cao, Z., and Wang, X. (2013). Role of aryl hydrocarbon receptor in cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 1836, 197–210.
- Fernandes, I., Bastien, Y., Wai, T., Nygard, K., Lin, R., Cormier, O., Lee, H.S., Eng, F., Bertos, N.R., Pelletier, N., et al. (2003). Ligand-dependent nuclear receptor corepressor LCoR functions by histone deacetylase-dependent and -independent mechanisms. *Mol. Cell* 11, 139–150.
- Fernández, M., Paradisi, M., D’Intino, G., Del Vecchio, G., Sivilia, S., Giardino, L., and Calzà, L. (2010). A single prenatal exposure to the endocrine disruptor 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin alters developmental myelination and remyelination potential in the rat brain. *J. Neurochem.* 115, 897–909.

- Fernandez-Salguero, P., Pineau, T., Hilbert, D.M., McPhail, T., Lee, S.S., Kimura, S., Nebert, D.W., Rudikoff, S., Ward, J.M., and Gonzalez, F.J. (1995). Immune system impairment and hepatic fibrosis in mice lacking the dioxin-binding Ah receptor. *Science* 268, 722–726.
- Feutz, A.C., Pham-Dinh, D., Allinquant, B., Mieke, M., and Ghandour, M.S. (2001). An immortalized jimpy oligodendrocyte cell line: defects in cell cycle and cAMP pathway. *Glia* 34, 241–252.
- Fields, R.D., and Stevens, B. (2000). ATP: an extracellular signaling molecule between neurons and glia. *Trends Neurosci.* 23, 625–633.
- Filbin, M.T., Zhang, K., Li, W., and Gao, Y. (1999). Characterization of the effect on adhesion of different mutations in myelin P0 protein. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 883, 160–167.
- Filippini, G., Bordo, B., Crenna, P., Masetto, N., Musicco, M., and Boeri, R. (1981). Relationship between clinical and electrophysiological findings and indicators of heavy exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-dioxin. *Scand. J. Work. Environ. Health* 7, 257–262.
- Fitzgerald, C.T., Nebert, D.W., and Puga, A. (1998). Regulation of mouse Ah receptor (Ahr) gene basal expression by members of the Sp family of transcription factors. *DNA Cell Biol.* 17, 811–822.
- FitzPatrick, D.R., Ramsay, J., McGill, N.I., Shade, M., Carothers, A.D., and Hastie, N.D. (2002). Transcriptome analysis of human autosomal trisomy. *Hum. Mol. Genet.* 11, 3249–3256.
- Flores, A.I., Narayanan, S.P., Morse, E.N., Shick, H.E., Yin, X., Kidd, G., Avila, R.L., Kirschner, D.A., and Macklin, W.B. (2008). Constitutively active Akt induces enhanced myelination in the CNS. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 7174–7183.
- Fonte, C., Grenier, J., Trousson, A., Chauchereau, A., Lahuna, O., Baulieu, E.-E., Schumacher, M., and Massaad, C. (2005). Involvement of {beta}-catenin and unusual behavior of CBP and p300 in glucocorticosteroid signaling in Schwann cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 14260–14265.
- Fricker, F.R., Lago, N., Balarajah, S., Tsantoulas, C., Tanna, S., Zhu, N., Fageiry, S.K., Jenkins, M., Garratt, A.N., Birchmeier, C., et al. (2011). Axonally derived neuregulin-1 is required for remyelination and regeneration after nerve injury in adulthood. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 31, 3225–3233.
- Fritah, A., Christian, M., and Parker, M.G. (2010). The metabolic coregulator RIP140: an update. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 299, E335–340.
- Fu, S.Y., and Gordon, T. (1997). The cellular and molecular basis of peripheral nerve regeneration. *Mol. Neurobiol.* 14, 67–116.
- Fu, H., Cai, J., Clevers, H., Fast, E., Gray, S., Greenberg, R., Jain, M.K., Ma, Q., Qiu, M., Rowitch, D.H., et al. (2009). A genome-wide screen for spatially restricted expression patterns identifies transcription factors that regulate glial development. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 11399–11408.
- Fukumoto, H., Deng, A., Irizarry, M.C., Fitzgerald, M.L., and Rebeck, G.W. (2002). Induction of the cholesterol transporter ABCA1 in central nervous system cells by liver X receptor agonists increases secreted Abeta levels. *J. Biol. Chem.* 277, 48508–48513.
- Gabreëls-Festen, A.A., Bolhuis, P.A., Hoogendijk, J.E., Valentijn, L.J., Eshuis, E.J., and Gabreëls, F.J. (1995). Charcot-Marie-Tooth disease type 1A: morphological phenotype of the 17p duplication versus PMP22 point mutations. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 90, 645–649.
- Garay, L., Deniselle, M.C.G., Lima, A., Roig, P., and De Nicola, A.F. (2007). Effects of progesterone in the spinal cord of a mouse model of multiple sclerosis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 107, 228–237.

- Garbay, B., Heape, A.M., Sargueil, F., and Cassagne, C. (2000). Myelin synthesis in the peripheral nervous system. *Prog. Neurobiol.* *61*, 267–304.
- Garbern, J.Y. (2007). Pelizaeus-Merzbacher disease: Genetic and cellular pathogenesis. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *64*, 50–65.
- Gardiner, K. (2006). Transcriptional dysregulation in Down syndrome: predictions for altered protein complex stoichiometries and post-translational modifications, and consequences for learning/behavior genes ELK, CREB, and the estrogen and glucocorticoid receptors. *Behav. Genet.* *36*, 439–453.
- Garrison, P.M., and Denison, M.S. (2000). Analysis of the murine AhR gene promoter. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* *14*, 1–10.
- Garrison, P.M., Rogers, J.M., Brackney, W.R., and Denison, M.S. (2000). Effects of histone deacetylase inhibitors on the Ah receptor gene promoter. *Arch. Biochem. Biophys.* *374*, 161–171.
- Ghosh, S., and Thakur, M.K. (2008). Tissue-specific expression of receptor-interacting protein in aging mouse. *Age Dordr. Neth.* *30*, 237–243.
- Ghoumari, A.M., Ibanez, C., El-Etr, M., Leclerc, P., Eychenne, B., O'Malley, B.W., Baulieu, E.E., and Schumacher, M. (2003). Progesterone and its metabolites increase myelin basic protein expression in organotypic slice cultures of rat cerebellum. *J. Neurochem.* *86*, 848–859.
- Giese, K.P., Martini, R., Lemke, G., Soriano, P., and Schachner, M. (1992). Mouse P0 gene disruption leads to hypomyelination, abnormal expression of recognition molecules, and degeneration of myelin and axons. *Cell* *71*, 565–576.
- Gilmour, D.T., Maischein, H.-M., and Nüsslein-Volhard, C. (2002). Migration and function of a glial subtype in the vertebrate peripheral nervous system. *Neuron* *34*, 577–588.
- Giménez y Ribotta, M., Rajaofetra, N., Morin-Richaud, C., Alonso, G., Bochelen, D., Sandillon, F., Legrand, A., Mersel, M., and Privat, A. (1995). Oxysterol (7 beta-hydroxycholesteryl-3-oleate) promotes serotonergic reinnervation in the lesioned rat spinal cord by reducing glial reaction. *J. Neurosci. Res.* *41*, 79–95.
- Girotti, S., Ferri, E., Maccagnani, L., Budini, R., and Bianchi, G. (2002). Plasma antioxidant capacity determination: comparative evaluation of chemiluminescent and spectrophotometric assays. *Talanta* *56*, 407–414.
- Gokhan, S., Marin-Husstege, M., Yung, S.Y., Fontanez, D., Casaccia-Bonnel, P., and Mehler, M.F. (2005). Combinatorial profiles of oligodendrocyte-selective classes of transcriptional regulators differentially modulate myelin basic protein gene expression. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *25*, 8311–8321.
- Goldstone, J.V., Hamdoun, A., Cole, B.J., Howard-Ashby, M., Nebert, D.W., Scally, M., Dean, M., Epel, D., Hahn, M.E., and Stegeman, J.J. (2006). The chemical defensome: environmental sensing and response genes in the *Strongylocentrotus purpuratus* genome. *Dev. Biol.* *300*, 366–384.
- Gouédard, C., Barouki, R., and Morel, Y. (2004). Induction of the paraoxonase-1 gene expression by resveratrol. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *24*, 2378–2383.
- Grahmann, F., Claus, D., Grehl, H., and Neundörfer, B. (1993). Electrophysiologic evidence for a toxic polyneuropathy in rats after exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). *J. Neurol. Sci.* *115*, 71–75.
- Grandis, M., Leandri, M., Vigo, T., Cilli, M., Sereda, M.W., Gherardi, G., Benedetti, L., Mancardi, G., Abbruzzese, M., Nave, K.-A., et al. (2004). Early abnormalities in sciatic nerve function and structure in a rat model of Charcot-Marie-Tooth type 1A disease. *Exp. Neurol.* *190*, 213–223.
- Grehl, H., Grahmann, F., Claus, D., and Neundörfer, B. (1993). Histologic evidence for a toxic polyneuropathy due to exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in rats. *Acta Neurol. Scand.* *88*, 354–357.

- Grigoryan, T., Stein, S., Qi, J., Wende, H., Garratt, A.N., Nave, K.-A., Birchmeier, C., and Birchmeier, W. (2013). Wnt/Rspondin/ β -catenin signals control axonal sorting and lineage progression in Schwann cell development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 18174–18179.
- Grove, M., Komiyama, N.H., Nave, K.-A., Grant, S.G., Sherman, D.L., and Brophy, P.J. (2007). FAK is required for axonal sorting by Schwann cells. *J. Cell Biol.* *176*, 277–282.
- Gu, Y.Z., Hogenesch, J.B., and Bradfield, C.A. (2000). The PAS superfamily: sensors of environmental and developmental signals. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* *40*, 519–561.
- Gupta, P., Huq, M.D.M., Khan, S.A., Tsai, N.-P., and Wei, L.-N. (2005). Regulation of co-repressive activity of and HDAC recruitment to RIP140 by site-specific phosphorylation. *Mol. Cell. Proteomics MCP* *4*, 1776–1784.
- Gupta, P., Ho, P.-C., Huq, M.D.M., Khan, A.A., Tsai, N.-P., and Wei, L.-N. (2008). PKCepsilon stimulated arginine methylation of RIP140 for its nuclear-cytoplasmic export in adipocyte differentiation. *PLoS One* *3*, e2658.
- Guyot, E., Chevallier, A., Barouki, R., and Coumoul, X. (2013). The AhR twist: ligand-dependent AhR signaling and pharmaco-toxicological implications. *Drug Discov. Today* *18*, 479–486.
- Hahn, M.E. (2002). Aryl hydrocarbon receptors: diversity and evolution. *Chem. Biol. Interact.* *141*, 131–160.
- Hahn, M.E., Karchner, S.I., Evans, B.R., Franks, D.G., Merson, R.R., and Lapsertis, J.M. (2006). Unexpected diversity of aryl hydrocarbon receptors in non-mammalian vertebrates: insights from comparative genomics. *J. Exp. Zool. A Comp. Exp. Biol.* *305*, 693–706.
- Hahn, M.E., Allan, L.L., and Sherr, D.H. (2009). Regulation of constitutive and inducible AHR signaling: complex interactions involving the AHR repressor. *Biochem. Pharmacol.* *77*, 485–497.
- Hankinson, O. (2008). Why does ARNT2 behave differently from ARNT? *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* *103*, 1–3.
- Hardy, J., and Selkoe, D.J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* *297*, 353–356.
- Hayasaka, K., Himoro, M., Wang, Y., Takata, M., Minoshima, S., Shimizu, N., Miura, M., Uyemura, K., and Takada, G. (1993). Structure and chromosomal localization of the gene encoding the human myelin protein zero (MPZ). *Genomics* *17*, 755–758.
- He, Y., Dupree, J., Wang, J., Sandoval, J., Li, J., Liu, H., Shi, Y., Nave, K.A., and Casaccia-Bonnel, P. (2007). The transcription factor Yin Yang 1 is essential for oligodendrocyte progenitor differentiation. *Neuron* *55*, 217–230.
- Heery, D.M., Kalkhoven, E., Hoare, S., and Parker, M.G. (1997). A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature* *387*, 733–736.
- Hengstler, J.G., Van der Burg, B., Steinberg, P., and Oesch, F. (1999). Interspecies differences in cancer susceptibility and toxicity. *Drug Metab. Rev.* *31*, 917–970.
- Henry, J.T., and Crosson, S. (2011). Ligand-binding PAS domains in a genomic, cellular, and structural context. *Annu. Rev. Microbiol.* *65*, 261–286.
- Herzog, B., Hallberg, M., Seth, A., Woods, A., White, R., and Parker, M.G. (2007). The nuclear receptor cofactor, receptor-interacting protein 140, is required for the regulation of hepatic lipid and glucose metabolism by liver X receptor. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* *21*, 2687–2697.
- Hill, R.A., Patel, K.D., Medved, J., Reiss, A.M., and Nishiyama, A. (2013). NG2 cells in white matter but not gray matter proliferate in response to PDGF. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *33*, 14558–14566.

- Ho, P.-C., Lin, Y.-W., Tsui, Y.-C., Gupta, P., and Wei, L.-N. (2009). A negative regulatory pathway of GLUT4 trafficking in adipocyte: new function of RIP140 in the cytoplasm via AS160. *Cell Metab.* *10*, 516–523.
- Hoffman, E.C., Reyes, H., Chu, F.F., Sander, F., Conley, L.H., Brooks, B.A., and Hankinson, O. (1991). Cloning of a factor required for activity of the Ah (dioxin) receptor. *Science* *252*, 954–958.
- Höke, A., Ho, T., Crawford, T.O., LeBel, C., Hilt, D., and Griffin, J.W. (2003). Glial cell line-derived neurotrophic factor alters axon schwann cell units and promotes myelination in unmyelinated nerve fibers. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *23*, 561–567.
- Hörlein, A.J., Näär, A.M., Heinzl, T., Torchia, J., Gloss, B., Kurokawa, R., Ryan, A., Kamei, Y., Söderström, M., and Glass, C.K. (1995). Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature* *377*, 397–404.
- Hovanes, K., Li, T.W., Munguia, J.E., Truong, T., Milovanovic, T., Lawrence Marsh, J., Holcombe, R.F., and Waterman, M.L. (2001). Beta-catenin-sensitive isoforms of lymphoid enhancer factor-1 are selectively expressed in colon cancer. *Nat. Genet.* *28*, 53–57.
- 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.
- Huang, J.K., Jarjour, A.A., Nait Oumesmar, B., Kerninon, C., Williams, A., Krezel, W., Kagechika, H., Bauer, J., Zhao, C., Baron-Van Evercooren, A., et al. (2011). Retinoid X receptor gamma signaling accelerates CNS remyelination. *Nat. Neurosci.* *14*, 45–53.
- Huang, X., Powell-Coffman, J.A., and Jin, Y. (2004). The AHR-1 aryl hydrocarbon receptor and its co-factor the AHA-1 aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator specify GABAergic neuron cell fate in *C. elegans*. *Dev. Camb. Engl.* *131*, 819–828.
- Hudry, E., Van Dam, D., Kulik, W., De Deyn, P.P., Stet, F.S., Ahouansou, O., Benraiss, A., Delacourte, A., Bougnères, P., Aubourg, P., et al. (2010). Adeno-associated virus gene therapy with cholesterol 24-hydroxylase reduces the amyloid pathology before or after the onset of amyloid plaques in mouse models of Alzheimer's disease. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* *18*, 44–53.
- Huq, M.D.M., and Wei, L.-N. (2005). Post-translational modification of nuclear co-repressor receptor-interacting protein 140 by acetylation. *Mol. Cell. Proteomics MCP* *4*, 975–983.
- Huq, M.D.M., Khan, S.A., Park, S.W., and Wei, L.-N. (2005). Mapping of phosphorylation sites of nuclear corepressor receptor interacting protein 140 by liquid chromatography-tandem mass spectroscopy. *Proteomics* *5*, 2157–2166.
- Huq, M.D.M., Tsai, N.-P., Lin, Y.-P., Higgins, L., and Wei, L.-N. (2007). Vitamin B6 conjugation to nuclear corepressor RIP140 and its role in gene regulation. *Nat. Chem. Biol.* *3*, 161–165.
- Hussain, R., El-Etr, M., Gaci, O., Rakotomamonjy, J., Macklin, W.B., Kumar, N., Sitruk-Ware, R., Schumacher, M., and Ghomari, A.M. (2011). Progesterone and Nestorone facilitate axon remyelination: a role for progesterone receptors. *Endocrinology* *152*, 3820–3831.
- Huuskonen, J., Fielding, P.E., and Fielding, C.J. (2004). Role of p160 coactivator complex in the activation of liver X receptor. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *24*, 703–708.
- Ikonen, T., Palvimo, J.J., and Jänne, O.A. (1997). Interaction between the amino- and carboxyl-terminal regions of the rat androgen receptor modulates transcriptional activity and is influenced by nuclear receptor coactivators. *J. Biol. Chem.* *272*, 29821–29828.
- Ikuta, T., Kobayashi, Y., and Kawajiri, K. (2004). Phosphorylation of nuclear localization signal inhibits the ligand-dependent nuclear import of aryl hydrocarbon receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *317*, 545–550.

- Jackson, F.R., Bargiello, T.A., Yun, S.H., and Young, M.W. (1986). Product of per locus of *Drosophila* shares homology with proteoglycans. *Nature* 320, 185–188.
- Jacob, C., Christen, C.N., Pereira, J.A., Somandin, C., Baggiolini, A., Lötscher, P., Ozçelik, M., Tricaud, N., Meijer, D., Yamaguchi, T., et al. (2011). HDAC1 and HDAC2 control the transcriptional program of myelination and the survival of Schwann cells. *Nat. Neurosci.* 14, 429–436.
- Jaegle, M., Ghazvini, M., Mandemakers, W., Piirsoo, M., Driegen, S., Levavasseur, F., Raghoenath, S., Grosveld, F., and Meijer, D. (2003). The POU proteins Brn-2 and Oct-6 share important functions in Schwann cell development. *Genes Dev.* 17, 1380–1391.
- Janowski, B.A. (2002). The hypocholesterolemic agent LY295427 up-regulates INSIG-1, identifying the INSIG-1 protein as a mediator of cholesterol homeostasis through SREBP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 12675–12680.
- Janowski, B.A., Willy, P.J., Devi, T.R., Falck, J.R., and Mangelsdorf, D.J. (1996). An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha. *Nature* 383, 728–731.
- Jessen, K.R., and Mirsky, R. (1999). Schwann cells and their precursors emerge as major regulators of nerve development. *Trends Neurosci.* 22, 402–410.
- Jessen, K.R., and Mirsky, R. (2005a). The origin and development of glial cells in peripheral nerves. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 671–682.
- Jessen, K.R., and Mirsky, R. (2005b). The origin and development of glial cells in peripheral nerves. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 671–682.
- Jessen, K.R., and Mirsky, R. (2008). Negative regulation of myelination: relevance for development, injury, and demyelinating disease. *Glia* 56, 1552–1565.
- Jetten, A.M., and Suter, U. (2000). The peripheral myelin protein 22 and epithelial membrane protein family. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 64, 97–129.
- Joyeux, A., Cavailles, V., Balaguer, P., and Nicolas, J.C. (1997). RIP 140 enhances nuclear receptor-dependent transcription in vivo in yeast. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 11, 193–202.
- Kekeyama, M., and Tohyama, C. (2003). Developmental neurotoxicity of dioxin and its related compounds. *Ind. Health* 41, 215–230.
- Kannisto, K., Gåfvels, M., Jiang, Z.-Y., Slätis, K., Hu, X., Jorns, C., Steffensen, K.R., and Eggertsen, G. (2014). LXR driven induction of HDL-cholesterol is independent of intestinal cholesterol absorption and ABCA1 protein expression. *Lipids* 49, 71–83.
- Kao, S.-C., Wu, H., Xie, J., Chang, C.-P., Ranish, J.A., Graef, I.A., and Crabtree, G.R. (2009). Calcineurin/NFAT signaling is required for neuregulin-regulated Schwann cell differentiation. *Science* 323, 651–654.
- Karchner, S.I., Franks, D.G., Powell, W.H., and Hahn, M.E. (2002). Regulatory interactions among three members of the vertebrate aryl hydrocarbon receptor family: AHR repressor, AHR1, and AHR2. *J. Biol. Chem.* 277, 6949–6959.
- Karchner, S.I., Franks, D.G., and Hahn, M.E. (2005). AHR1B, a new functional aryl hydrocarbon receptor in zebrafish: tandem arrangement of *ahr1b* and *ahr2* genes. *Biochem. J.* 392, 153–161.
- Kasai, M., Satoh, K., and Akiyama, T. (2005). Wnt signaling regulates the sequential onset of neurogenesis and gliogenesis via induction of BMPs. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* 10, 777–783.

- Katsanis, N., Ives, J.H., Groet, J., Nizetic, D., and Fisher, E.M. (1998). Localisation of receptor interacting protein 140 (RIP140) within 100 kb of D21S13 on 21q11, a gene-poor region of the human genome. *Hum. Genet.* *102*, 221–223.
- Kawajiri, K., Kobayashi, Y., Ohtake, F., Ikuta, T., Matsushima, Y., Mimura, J., Pettersson, S., Pollenz, R.S., Sakaki, T., Hirokawa, T., et al. (2009). Aryl hydrocarbon receptor suppresses intestinal carcinogenesis in *ApcMin/+* mice with natural ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 13481–13486.
- Kazakova, N., Li, H., Mora, A., Jessen, K.R., Mirsky, R., Richardson, W.D., and Smith, H.K. (2006). A screen for mutations in zebrafish that affect myelin gene expression in Schwann cells and oligodendrocytes. *Dev. Biol.* *297*, 1–13.
- Kazlauskas, A., Poellinger, L., and Pongratz, I. (1999). Evidence that the co-chaperone p23 regulates ligand responsiveness of the dioxin (Aryl hydrocarbon) receptor. *J. Biol. Chem.* *274*, 13519–13524.
- Keith, B., Adelman, D.M., and Simon, M.C. (2001). Targeted mutation of the murine arylhydrocarbon receptor nuclear translocator 2 (*Arnt2*) gene reveals partial redundancy with *Arnt*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 6692–6697.
- Kerley, J.S., Olsen, S.L., Freemantle, S.J., and Spinella, M.J. (2001). Transcriptional activation of the nuclear receptor corepressor RIP140 by retinoic acid: a potential negative-feedback regulatory mechanism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *285*, 969–975.
- Kim, M.D., Jan, L.Y., and Jan, Y.N. (2006). The bHLH-PAS protein Spineless is necessary for the diversification of dendrite morphology of *Drosophila* dendritic arborization neurons. *Genes Dev.* *20*, 2806–2819.
- Kim, S., Kim, S.-H., Kim, H., Chung, A.-Y., Cha, Y.I., Kim, C.-H., Huh, T.-L., and Park, H.-C. (2008). Frizzled 8a function is required for oligodendrocyte development in the zebrafish spinal cord. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* *237*, 3324–3331.
- Kioussi, C., Gross, M.K., and Gruss, P. (1995). *Pax3*: a paired domain gene as a regulator in PNS myelination. *Neuron* *15*, 553–562.
- Kirby, B.B., Takada, N., Latimer, A.J., Shin, J., Carney, T.J., Kelsh, R.N., and Appel, B. (2006). In vivo time-lapse imaging shows dynamic oligodendrocyte progenitor behavior during zebrafish development. *Nat. Neurosci.* *9*, 1506–1511.
- Klawans, H.L. (1987). Dystonia and tremor following exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* *2*, 255–261.
- Klugmann, M., Schwab, M.H., Pühlhofer, A., Schneider, A., Zimmermann, F., Griffiths, I.R., and Nave, K.A. (1997). Assembly of CNS myelin in the absence of proteolipid protein. *Neuron* *18*, 59–70.
- Kobayashi, A., Numayama-Tsuruta, K., Sogawa, K., and Fujii-Kuriyama, Y. (1997). CBP/p300 functions as a possible transcriptional coactivator of Ah receptor nuclear translocator (*Arnt*). *J. Biochem. (Tokyo)* *122*, 703–710.
- Koenig, H.L., Schumacher, M., Ferzaz, B., Thi, A.N., Ressouches, A., Guennoun, R., Jung-Testas, I., Robel, P., Akwa, Y., and Baulieu, E.E. (1995). Progesterone synthesis and myelin formation by Schwann cells. *Science* *268*, 1500–1503.
- Köhle, C., Gschaidmeier, H., Lauth, D., Topell, S., Zitzer, H., and Bock, K.W. (1999). 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-mediated membrane translocation of c-Src protein kinase in liver WB-F344 cells. *Arch. Toxicol.* *73*, 152–158.
- Koldamova, R.P., Lefterov, I.M., Staufienbiel, M., Wolfe, D., Huang, S., Glorioso, J.C., Walter, M., Roth, M.G., and Lazo, J.S. (2005). The liver X receptor ligand T0901317 decreases amyloid beta production in vitro and in a mouse model of Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* *280*, 4079–4088.

- Kölsch, H., Lütjohann, D., Tulke, A., Björkhem, I., and Rao, M.L. (1999). The neurotoxic effect of 24-hydroxycholesterol on SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Brain Res.* *818*, 171–175.
- Kudo, K., Takeuchi, T., Murakami, Y., Ebina, M., and Kikuchi, H. (2009). Characterization of the region of the aryl hydrocarbon receptor required for ligand dependency of transactivation using chimeric receptor between *Drosophila* and *Mus musculus*. *Biochim. Biophys. Acta* *1789*, 477–486.
- Kumar, M.B., and Perdew, G.H. (1999). Nuclear receptor coactivator SRC-1 interacts with the Q-rich subdomain of the AhR and modulates its transactivation potential. *Gene Expr.* *8*, 273–286.
- Kumar, M.B., Tarpey, R.W., and Perdew, G.H. (1999). Differential recruitment of coactivator RIP140 by Ah and estrogen receptors. Absence of a role for LXXLL motifs. *J. Biol. Chem.* *274*, 22155–22164.
- L'Horset, F., Dauvois, S., Heery, D.M., Cavailles, V., and Parker, M.G. (1996). RIP-140 interacts with multiple nuclear receptors by means of two distinct sites. *Mol. Cell. Biol.* *16*, 6029–6036.
- Latasa, M.-J., Ituero, M., Moran-Gonzalez, A., Aranda, A., and Cosgaya, J.M. (2010). Retinoic acid regulates myelin formation in the peripheral nervous system. *Glia* *58*, 1451–1464.
- Lawson, L.J., Perry, V.H., Dri, P., and Gordon, S. (1990). Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* *39*, 151–170.
- Le, N., Nagarajan, R., Wang, J.Y.T., Araki, T., Schmidt, R.E., and Milbrandt, J. (2005). Analysis of congenital hypomyelinating *Egr2*Lo/Lo nerves identifies Sox2 as an inhibitor of Schwann cell differentiation and myelination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 2596–2601.
- Lee, C.H., Chinpaisal, C., and Wei, L.N. (1998). Cloning and characterization of mouse RIP140, a corepressor for nuclear orphan receptor TR2. *Mol. Cell. Biol.* *18*, 6745–6755.
- Leimeroth, R., Lobsiger, C., Lüssi, A., Taylor, V., Suter, U., and Sommer, L. (2002). Membrane-bound neuregulin1 type III actively promotes Schwann cell differentiation of multipotent Progenitor cells. *Dev. Biol.* *246*, 245–258.
- Lemke, G., and Axel, R. (1985). Isolation and sequence of a cDNA encoding the major structural protein of peripheral myelin. *Cell* *40*, 501–508.
- Leonardsson, G., Jacobs, M.A., White, R., Jeffery, R., Poulosom, R., Milligan, S., and Parker, M. (2002). Embryo transfer experiments and ovarian transplantation identify the ovary as the only site in which nuclear receptor interacting protein 1/RIP140 action is crucial for female fertility. *Endocrinology* *143*, 700–707.
- Leonardsson, G., Steel, J.H., Christian, M., Pocock, V., Milligan, S., Bell, J., So, P.-W., Medina-Gomez, G., Vidal-Puig, A., White, R., et al. (2004). Nuclear receptor corepressor RIP140 regulates fat accumulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 8437–8442.
- Leoni, V., Masterman, T., Diczfalusy, U., De Luca, G., Hillert, J., and Björkhem, I. (2002). Changes in human plasma levels of the brain specific oxysterol 24S-hydroxycholesterol during progression of multiple sclerosis. *Neurosci. Lett.* *331*, 163–166.
- Li, H., and Richardson, W.D. (2009). Genetics meets epigenetics: HDACs and Wnt signaling in myelin development and regeneration. *Nat. Neurosci.* *12*, 815–817.
- Liang, Y., Lin, S., Beyer, T.P., Zhang, Y., Wu, X., Bales, K.R., DeMattos, R.B., May, P.C., Li, S.D., Jiang, X.-C., et al. (2004). A liver X receptor and retinoid X receptor heterodimer mediates apolipoprotein E expression, secretion and cholesterol homeostasis in astrocytes. *J. Neurochem.* *88*, 623–634.
- Liberto, C.M., Albrecht, P.J., Herx, L.M., Yong, V.W., and Levison, S.W. (2004). Pro-regenerative properties of cytokine-activated astrocytes. *J. Neurochem.* *89*, 1092–1100.

- Lim, H.J., Moon, I., and Han, K. (2004). Transcriptional cofactors exhibit differential preference toward peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta in uterine cells. *Endocrinology* *145*, 2886–2895.
- Lu, Q.R., Yuk, D., Alberta, J.A., Zhu, Z., Pawlitzky, I., Chan, J., McMahon, A.P., Stiles, C.D., and Rowitch, D.H. (2000). Sonic hedgehog--regulated oligodendrocyte lineage genes encoding bHLH proteins in the mammalian central nervous system. *Neuron* *25*, 317–329.
- Lupski, J.R., de Oca-Luna, R.M., Slaugenhaupt, S., Pentao, L., Guzzetta, V., Trask, B.J., Saucedo-Cardenas, O., Barker, D.F., Killian, J.M., Garcia, C.A., et al. (1991). DNA duplication associated with Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Cell* *66*, 219–232.
- Lütjohann, D., Papassotiropoulos, A., Björkhem, I., Locatelli, S., Bagli, M., Oehring, R.D., Schlegel, U., Jessen, F., Rao, M.L., von Bergmann, K., et al. (2000). Plasma 24S-hydroxycholesterol (cerebrosterol) is increased in Alzheimer and vascular demented patients. *J. Lipid Res.* *41*, 195–198.
- Lyons, D.A., Pogoda, H.-M., Voas, M.G., Woods, I.G., Diamond, B., Nix, R., Arana, N., Jacobs, J., and Talbot, W.S. (2005). *erbb3* and *erbb2* are essential for schwann cell migration and myelination in zebrafish. *Curr. Biol. CB* *15*, 513–524.
- Lyons, D.A., Naylor, S.G., Scholze, A., and Talbot, W.S. (2009). *Kif1b* is essential for mRNA localization in oligodendrocytes and development of myelinated axons. *Nat. Genet.* *41*, 854–858.
- Ma, Q. (2007). Aryl hydrocarbon receptor degradation-promoting factor (ADPF) and the control of the xenobiotic response. *Mol. Interv.* *7*, 133–137.
- Ma, Q., and Baldwin, K.T. (2002). A cycloheximide-sensitive factor regulates TCDD-induced degradation of the aryl hydrocarbon receptor. *Chemosphere* *46*, 1491–1500.
- Madrid, R.E., Jaros, E., Cullen, M.J., and Bradley, W.G. (1975). Genetically determined defect of Schwann cell basement membrane in dystrophic mouse. *Nature* *257*, 319–321.
- Makoukji, J., Shackelford, G., Meffre, D., Grenier, J., Liere, P., Lobaccaro, J.-M.A., Schumacher, M., and Massaad, C. (2011). Interplay between LXR and Wnt/ β -catenin signaling in the negative regulation of peripheral myelin genes by oxysterols. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *31*, 9620–9629.
- Makoukji, J., Belle, M., Meffre, D., Stassart, R., Grenier, J., Shackelford, G., Fledrich, R., Fonte, C., Branchu, J., Goulard, M., et al. (2012). Lithium enhances remyelination of peripheral nerves. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 3973–3978.
- Maltepe, E., Schmidt, J.V., Baunoch, D., Bradfield, C.A., and Simon, M.C. (1997). Abnormal angiogenesis and responses to glucose and oxygen deprivation in mice lacking the protein ARNT. *Nature* *386*, 403–407.
- La Marca, R., Cerri, F., Horiuchi, K., Bachi, A., Feltri, M.L., Wrabetz, L., Blobel, C.P., Quattrini, A., Salzer, J.L., and Taveggia, C. (2011). TACE (ADAM17) inhibits Schwann cell myelination. *Nat. Neurosci.* *14*, 857–865.
- Martini, R., and Schachner, M. (1997). Molecular bases of myelin formation as revealed by investigations on mice deficient in glial cell surface molecules. *Glia* *19*, 298–310.
- Marza, E., and Lesa, G.M. (2006). Polyunsaturated fatty acids and neurotransmission in *Caenorhabditis elegans*. *Biochem. Soc. Trans.* *34*, 77–80.
- Masiello, D., Chen, S.-Y., Xu, Y., Verhoeven, M.C., Choi, E., Hollenberg, A.N., and Balk, S.P. (2004). Recruitment of beta-catenin by wild-type or mutant androgen receptors correlates with ligand-stimulated growth of prostate cancer cells. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* *18*, 2388–2401.

- Massaad, C., Garlatti, M., Wilson, E.M., Cadepond, F., and Barouki, R. (2000). A natural sequence consisting of overlapping glucocorticoid-responsive elements mediates glucocorticoid, but not androgen, regulation of gene expression. *Biochem. J.* *350 Pt 1*, 123–129.
- Masuyama, H., Brownfield, C.M., St-Arnaud, R., and MacDonald, P.N. (1997). Evidence for ligand-dependent intramolecular folding of the AF-2 domain in vitamin D receptor-activated transcription and coactivator interaction. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* *11*, 1507–1517.
- Masuyama, H., Hiramatsu, Y., Mizutani, Y., Inoshita, H., and Kudo, T. (2001). The expression of pregnane X receptor and its target gene, cytochrome P450 3A1, in perinatal mouse. *Mol. Cell. Endocrinol.* *172*, 47–56.
- Maurel, P., and Salzer, J.L. (2000). Axonal regulation of Schwann cell proliferation and survival and the initial events of myelination requires PI 3-kinase activity. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *20*, 4635–4645.
- McMillan, B.J., and Bradfield, C.A. (2007). The aryl hydrocarbon receptor sans xenobiotics: endogenous function in genetic model systems. *Mol. Pharmacol.* *72*, 487–498.
- Meier, C., Parmantier, E., Brennan, A., Mirsky, R., and Jessen, K.R. (1999). Developing Schwann cells acquire the ability to survive without axons by establishing an autocrine circuit involving insulin-like growth factor, neurotrophin-3, and platelet-derived growth factor-BB. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *19*, 3847–3859.
- Melcangi, R.C., and Garcia-Segura, L.M. (2006). Therapeutic approaches to peripheral neuropathy based on neuroactive steroids. *Expert Rev. Neurother.* *6*, 1121–1125.
- Melcangi, R.C., Giatti, S., Pesaresi, M., Calabrese, D., Mitro, N., Caruso, D., and Garcia-Segura, L.M. (2011). Role of neuroactive steroids in the peripheral nervous system. *Front. Endocrinol.* *2*, 104.
- Mellgren, G., Børud, B., Hoang, T., Yri, O.E., Fladeby, C., Lien, E.A., and Lund, J. (2003). Characterization of receptor-interacting protein RIP140 in the regulation of SF-1 responsive target genes. *Mol. Cell. Endocrinol.* *203*, 91–103.
- Mercier, G., Turque, N., and Schumacher, M. (2001). Rapid effects of triiodothyronine on immediate-early gene expression in Schwann cells. *Glia* *35*, 81–89.
- Meyer zu Horste, G., Prukop, T., Liebetanz, D., Mobius, W., Nave, K.-A., and Sereda, M.W. (2007). Antiprogestone therapy uncouples axonal loss from demyelination in a transgenic rat model of CMT1A neuropathy. *Ann. Neurol.* *61*, 61–72.
- Micallef, J., Attarian, S., Dubourg, O., Gonnaud, P.-M., Hogrel, J.-Y., Stojkovic, T., Bernard, R., Jouve, E., Pitel, S., Vacherot, F., et al. (2009). Effect of ascorbic acid in patients with Charcot-Marie-Tooth disease type 1A: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol.* *8*, 1103–1110.
- Michailov, G.V., Sereda, M.W., Brinkmann, B.G., Fischer, T.M., Haug, B., Birchmeier, C., Role, L., Lai, C., Schwab, M.H., and Nave, K.-A. (2004). Axonal neuregulin-1 regulates myelin sheath thickness. *Science* *304*, 700–703.
- Mimura, J., and Fujii-Kuriyama, Y. (2003). Functional role of AhR in the expression of toxic effects by TCDD. *Biochim. Biophys. Acta* *1619*, 263–268.
- Mimura, J., Ema, M., Sogawa, K., and Fujii-Kuriyama, Y. (1999). Identification of a novel mechanism of regulation of Ah (dioxin) receptor function. *Genes Dev.* *13*, 20–25.
- Mirsky, R., Parkinson, D.B., Dong, Z., Meier, C., Calle, E., Brennan, A., Topilko, P., Harris, B.S., Stewart, H.J., and Jessen, K.R. (2001). Regulation of genes involved in Schwann cell development and differentiation. *Prog. Brain Res.* *132*, 3–11.

- Mirsky, R., Woodhoo, A., Parkinson, D.B., Arthur-Farraj, P., Bhaskaran, A., and Jessen, K.R. (2008). Novel signals controlling embryonic Schwann cell development, myelination and dedifferentiation. *J. Peripher. Nerv. Syst. JPNS* 13, 122–135.
- Miyata, K.S., McCaw, S.E., Meertens, L.M., Patel, H.V., Rachubinski, R.A., and Capone, J.P. (1998). Receptor-interacting protein 140 interacts with and inhibits transactivation by, peroxisome proliferator-activated receptor alpha and liver-X-receptor alpha. *Mol. Cell. Endocrinol.* 146, 69–76.
- Monk, K.R., and Talbot, W.S. (2009). Genetic dissection of myelinated axons in zebrafish. *Curr. Opin. Neurobiol.* 19, 486–490.
- Monk, K.R., Naylor, S.G., Glenn, T.D., Mercurio, S., Perlin, J.R., Dominguez, C., Moens, C.B., and Talbot, W.S. (2009). A G protein-coupled receptor is essential for Schwann cells to initiate myelination. *Science* 325, 1402–1405.
- Mostaqul Huq, M.D., Gupta, P., and Wei, L.-N. (2008). Post-translational modifications of nuclear co-repressor RIP140: a therapeutic target for metabolic diseases. *Curr. Med. Chem.* 15, 386–392.
- Nakagawa, M. (2011). [Therapeutic strategies for Charcot-Marie-Tooth disease]. *Rinshō Shinkeigaku Clin. Neurol.* 51, 1015–1018.
- Nambu, J.R., Lewis, J.O., Wharton, K.A., Jr, and Crews, S.T. (1991). The *Drosophila* single-minded gene encodes a helix-loop-helix protein that acts as a master regulator of CNS midline development. *Cell* 67, 1157–1167.
- Nathan, D., Ingvarsdottir, K., Sterner, D.E., Bylebyl, G.R., Dokmanovic, M., Dorsey, J.A., Whelan, K.A., Krsmanovic, M., Lane, W.S., Meluh, P.B., et al. (2006). Histone sumoylation is a negative regulator in *Saccharomyces cerevisiae* and shows dynamic interplay with positive-acting histone modifications. *Genes Dev.* 20, 966–976.
- Nave, K.-A. (2010). Myelination and the trophic support of long axons. *Nat. Rev. Neurosci.* 11, 275–283.
- Nebert, D.W., Robinson, J.R., Niwa, A., Kumaki, K., and Poland, A.P. (1975). Genetic expression of aryl hydrocarbon hydroxylase activity in the mouse. *J. Cell. Physiol.* 85, 393–414.
- Nelissen, K., Mulder, M., Smets, I., Timmermans, S., Smeets, K., Ameloot, M., and Hendriks, J.J.A. (2012). Liver X receptors regulate cholesterol homeostasis in oligodendrocytes. *J. Neurosci. Res.* 90, 60–71.
- Nelson, T.J., and Alkon, D.L. (2005). Oxidation of cholesterol by amyloid precursor protein and beta-amyloid peptide. *J. Biol. Chem.* 280, 7377–7387.
- Nephew, K.P., Sheeler, C.Q., Dudley, M.D., Gordon, S., Nayfield, S.G., and Khan, S.A. (1998). Studies of dehydroepiandrosterone (DHEA) with the human estrogen receptor in yeast. *Mol. Cell. Endocrinol.* 143, 133–142.
- Nery, S., Wichterle, H., and Fishell, G. (2001). Sonic hedgehog contributes to oligodendrocyte specification in the mammalian forebrain. *Dev. Camb. Engl.* 128, 527–540.
- Nichol, D., Christian, M., Steel, J.H., White, R., and Parker, M.G. (2006). RIP140 expression is stimulated by estrogen-related receptor alpha during adipogenesis. *J. Biol. Chem.* 281, 32140–32147.
- Nielsen, J.H., Olsen, C.E., Duedahl, C., and Skibsted, L.H. (1995). Isolation and quantification of cholesterol oxides in dairy products by selected ion monitoring mass spectrometry. *J. Dairy Res.* 62, 101–113.
- Niemann, A., Berger, P., and Suter, U. (2006). Pathomechanisms of mutant proteins in Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuromolecular Med.* 8, 217–242.

- Nishijo, M., Kuriwaki, J.-I., Hori, E., Tawara, K., Nakagawa, H., and Nishijo, H. (2007). Effects of maternal exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on fetal brain growth and motor and behavioral development in offspring rats. *Toxicol. Lett.* *173*, 41–47.
- Nishijo, M., Tawara, K., Nakagawa, H., Honda, R., Kido, T., Nishijo, H., and Saito, S. (2008). 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin in maternal breast milk and newborn head circumference. *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.* *18*, 246–251.
- Nobel, S., Abrahmsen, L., and Oppermann, U. (2001). Metabolic conversion as a pre-receptor control mechanism for lipophilic hormones. *Eur. J. Biochem. FEBS* *268*, 4113–4125.
- Oberkofler, H., Schraml, E., Krempler, F., and Patsch, W. (2003). Potentiation of liver X receptor transcriptional activity by peroxisome-proliferator-activated receptor gamma co-activator 1 alpha. *Biochem. J.* *371*, 89–96.
- Oesch-Bartlomowicz, B., Huelster, A., Wiss, O., Antoniou-Lipfert, P., Dietrich, C., Arand, M., Weiss, C., Bockamp, E., and Oesch, F. (2005). Aryl hydrocarbon receptor activation by cAMP vs. dioxin: divergent signaling pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 9218–9223.
- Oguievetskaia, K., Cifuentes-Diaz, C., Girault, J.-A., and Goutebroze, L. (2005). [Cellular contacts in myelinated fibers of the peripheral nervous system]. *Médecine Sci. MS* *21*, 162–169.
- Okabe, A., Urano, Y., Itoh, S., Suda, N., Kotani, R., Nishimura, Y., Saito, Y., and Noguchi, N. (2013). Adaptive responses induced by 24S-hydroxycholesterol through liver X receptor pathway reduce 7-ketocholesterol-caused neuronal cell death. *Redox Biol.* *2*, 28–35.
- Opitz, C.A., Litzenburger, U.M., Sahm, F., Ott, M., Tritschler, I., Trump, S., Schumacher, T., Jestaedt, L., Schrenk, D., Weller, M., et al. (2011). An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor. *Nature* *478*, 197–203.
- Ordóñez-Morán, P., and Muñoz, A. (2009). Nuclear receptors: genomic and non-genomic effects converge. *Cell Cycle Georget. Tex* *8*, 1675–1680.
- Orentas, D.M., Hayes, J.E., Dyer, K.L., and Miller, R.H. (1999). Sonic hedgehog signaling is required during the appearance of spinal cord oligodendrocyte precursors. *Dev. Camb. Engl.* *126*, 2419–2429.
- Ortega, F., Gascón, S., Masserdotti, G., Deshpande, A., Simon, C., Fischer, J., Dimou, L., Chichung Lie, D., Schroeder, T., and Berninger, B. (2013). Oligodendroglial and neurogenic adult subependymal zone neural stem cells constitute distinct lineages and exhibit differential responsiveness to Wnt signalling. *Nat. Cell Biol.* *15*, 602–613.
- Oshima, M., Mimura, J., Yamamoto, M., and Fujii-Kuriyama, Y. (2007). Molecular mechanism of transcriptional repression of AhR repressor involving ANKRA2, HDAC4, and HDAC5. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *364*, 276–282.
- Papassotiropoulos, A., Lütjohann, D., Bagli, M., Locatelli, S., Jessen, F., Rao, M.L., Maier, W., Björkhem, I., von Bergmann, K., and Heun, R. (2000). Plasma 24S-hydroxycholesterol: a peripheral indicator of neuronal degeneration and potential state marker for Alzheimer's disease. *Neuroreport* *11*, 1959–1962.
- Papassotiropoulos, A., Lütjohann, D., Bagli, M., Locatelli, S., Jessen, F., Buschfort, R., Ptok, U., Björkhem, I., von Bergmann, K., and Heun, R. (2002). 24S-hydroxycholesterol in cerebrospinal fluid is elevated in early stages of dementia. *J. Psychiatr. Res.* *36*, 27–32.
- Paratore, C., Goerich, D.E., Suter, U., Wegner, M., and Sommer, L. (2001). Survival and glial fate acquisition of neural crest cells are regulated by an interplay between the transcription factor Sox10 and extrinsic combinatorial signaling. *Dev. Camb. Engl.* *128*, 3949–3961.

- Pareyson, D., and Marchesi, C. (2009). Diagnosis, natural history, and management of Charcot-Marie-Tooth disease. *Lancet Neurol.* *8*, 654–667.
- Parkinson, D.B., Bhaskaran, A., Droggiti, A., Dickinson, S., D’Antonio, M., Mirsky, R., and Jessen, K.R. (2004). Krox-20 inhibits Jun-NH2-terminal kinase/c-Jun to control Schwann cell proliferation and death. *J. Cell Biol.* *164*, 385–394.
- Parkinson, D.B., Bhaskaran, A., Arthur-Farraj, P., Noon, L.A., Woodhoo, A., Lloyd, A.C., Feltri, M.L., Wrabetz, L., Behrens, A., Mirsky, R., et al. (2008). c-Jun is a negative regulator of myelination. *J. Cell Biol.* *181*, 625–637.
- Passage, E., Norreel, J.C., Noack-Fraissignes, P., Sanguedolce, V., Pizant, J., Thirion, X., Robaglia-Schlupp, A., Pellissier, J.F., and Fontés, M. (2004). Ascorbic acid treatment corrects the phenotype of a mouse model of Charcot-Marie-Tooth disease. *Nat. Med.* *10*, 396–401.
- Pazderova-Vejlupková, J., Lukás, E., Němcova, M., Pícková, J., and Jirásek, L. (1981). The development and prognosis of chronic intoxication by tetrachlordibenzo-p-dioxin in men. *Arch. Environ. Health* *36*, 5–11.
- Pedram, A., Razandi, M., Lubahn, D., Liu, J., Vannan, M., and Levin, E.R. (2008). Estrogen inhibits cardiac hypertrophy: role of estrogen receptor-beta to inhibit calcineurin. *Endocrinology* *149*, 3361–3369.
- Peet, D.J., Turley, S.D., Ma, W., Janowski, B.A., Lobaccaro, J.M., Hammer, R.E., and Mangelsdorf, D.J. (1998). Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Cell* *93*, 693–704.
- Perea, J., Robertson, A., Tolmachova, T., Muddle, J., King, R.H., Ponsford, S., Thomas, P.K., and Huxley, C. (2001). Induced myelination and demyelination in a conditional mouse model of Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Hum. Mol. Genet.* *10*, 1007–1018.
- Petrulis, J.R., and Perdew, G.H. (2002). The role of chaperone proteins in the aryl hydrocarbon receptor core complex. *Chem. Biol. Interact.* *141*, 25–40.
- Poland, A., Clover, E., Kende, A.S., DeCamp, M., and Giandomenico, C.M. (1976). 3,4,3',4'-Tetrachloro azoxybenzene and azobenzene: potent inducers of aryl hydrocarbon hydroxylase. *Science* *194*, 627–630.
- Poliandri, A.H.B., Gamsby, J.J., Christian, M., Spinella, M.J., Loros, J.J., Dunlap, J.C., and Parker, M.G. (2011). Modulation of clock gene expression by the transcriptional coregulator receptor interacting protein 140 (RIP140). *J. Biol. Rhythms* *26*, 187–199.
- Pollenz, R.S., Santostefano, M.J., Klett, E., Richardson, V.M., Necela, B., and Birnbaum, L.S. (1998). Female Sprague-Dawley rats exposed to a single oral dose of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin exhibit sustained depletion of aryl hydrocarbon receptor protein in liver, spleen, thymus, and lung. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* *42*, 117–128.
- Pongratz, I., Mason, G.G., and Poellinger, L. (1992). Dual roles of the 90-kDa heat shock protein hsp90 in modulating functional activities of the dioxin receptor. Evidence that the dioxin receptor functionally belongs to a subclass of nuclear receptors which require hsp90 both for ligand binding activity and repression of intrinsic DNA binding activity. *J. Biol. Chem.* *267*, 13728–13734.
- Powell-Coffman, J.A., Bradfield, C.A., and Wood, W.B. (1998). *Caenorhabditis elegans* orthologs of the aryl hydrocarbon receptor and its heterodimerization partner the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 2844–2849.
- Puglielli, L., Tanzi, R.E., and Kovacs, D.M. (2003). Alzheimer’s disease: the cholesterol connection. *Nat. Neurosci.* *6*, 345–351.
- Qin, H., and Powell-Coffman, J.A. (2004). The *Caenorhabditis elegans* aryl hydrocarbon receptor, AHR-1, regulates neuronal development. *Dev. Biol.* *270*, 64–75.

- Ragot, K., Mackrill, J.J., Zarrouk, A., Nury, T., Aires, V., Jacquin, A., Athias, A., Pais de Barros, J.-P., Vélux, A., Riedinger, J.-M., et al. (2013). Absence of correlation between oxysterol accumulation in lipid raft microdomains, calcium increase, and apoptosis induction on 158N murine oligodendrocytes. *Biochem. Pharmacol.* *86*, 67–79.
- Rannug, A., Rannug, U., Rosenkranz, H.S., Winqvist, L., Westerholm, R., Agurell, E., and Grafström, A.K. (1987). Certain photooxidized derivatives of tryptophan bind with very high affinity to the Ah receptor and are likely to be endogenous signal substances. *J. Biol. Chem.* *262*, 15422–15427.
- Readhead, C., Takasashi, N., Shine, H.D., Saavedra, R., Sidman, R., and Hood, L. (1990). Role of myelin basic protein in the formation of central nervous system myelin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *605*, 280–285.
- Reddy, P., Jacquier, A.C., Abovich, N., Petersen, G., and Rosbash, M. (1986). The period clock locus of *D. melanogaster* codes for a proteoglycan. *Cell* *46*, 53–61.
- Reilly, M.M., Murphy, S.M., and Laurá, M. (2011). Charcot-Marie-Tooth disease. *J. Peripher. Nerv. Syst. JPNS* *16*, 1–14.
- Reitzel, A.M., Passamaneck, Y.J., Karchner, S.I., Franks, D.G., Martindale, M.Q., Tarrant, A.M., and Hahn, M.E. (2014). Aryl hydrocarbon receptor (AHR) in the cnidarian *Nematostella vectensis*: comparative expression, protein interactions, and ligand binding. *Dev. Genes Evol.* *224*, 13–24.
- Repa, J.J., Liang, G., Ou, J., Bashmakov, Y., Lobaccaro, J.M., Shimomura, I., Shan, B., Brown, M.S., Goldstein, J.L., and Mangelsdorf, D.J. (2000a). Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta. *Genes Dev.* *14*, 2819–2830.
- Repa, J.J., Turley, S.D., Lobaccaro, J.A., Medina, J., Li, L., Lustig, K., Shan, B., Heyman, R.A., Dietschy, J.M., and Mangelsdorf, D.J. (2000b). Regulation of absorption and ABC1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers. *Science* *289*, 1524–1529.
- Riethmacher, D., Sonnenberg-Riethmacher, E., Brinkmann, V., Yamaai, T., Lewin, G.R., and Birchmeier, C. (1997). Severe neuropathies in mice with targeted mutations in the ErbB3 receptor. *Nature* *389*, 725–730.
- Roa, B.B., Warner, L.E., Garcia, C.A., Russo, D., Lovelace, R., Chance, P.F., and Lupski, J.R. (1996a). Myelin protein zero (MPZ) gene mutations in nonduplication type 1 Charcot-Marie-Tooth disease. *Hum. Mutat.* *7*, 36–45.
- Roa, B.B., Greenberg, F., Gunaratne, P., Sauer, C.M., Lubinsky, M.S., Kozma, C., Meck, J.M., Magenis, R.E., Shaffer, L.G., and Lupski, J.R. (1996b). Duplication of the PMP22 gene in 17p partial trisomy patients with Charcot-Marie-Tooth type-1 neuropathy. *Hum. Genet.* *97*, 642–649.
- Robertson, C.L., Puskar, A., Hoffman, G.E., Murphy, A.Z., Saraswati, M., and Fiskum, G. (2006). Physiologic progesterone reduces mitochondrial dysfunction and hippocampal cell loss after traumatic brain injury in female rats. *Exp. Neurol.* *197*, 235–243.
- Rodriguez, I.R., and Fliesler, S.J. (2009). Photodamage generates 7-keto- and 7-hydroxycholesterol in the rat retina via a free radical-mediated mechanism. *Photochem. Photobiol.* *85*, 1116–1125.
- Rogan, W.J., and Gladen, B.C. (1992). Neurotoxicology of PCBs and related compounds. *Neurotoxicology* *13*, 27–35.
- Russell, D.W. (2000). Oxysterol biosynthetic enzymes. *Biochim. Biophys. Acta* *1529*, 126–135.
- Rytinki, M.M., and Palvimo, J.J. (2008). SUMOylation modulates the transcription repressor function of RIP140. *J. Biol. Chem.* *283*, 11586–11595.
- Sahenk, Z., Nagaraja, H.N., McCracken, B.S., King, W.M., Freimer, M.L., Cedarbaum, J.M., and Mendell, J.R. (2005). NT-3 promotes nerve regeneration and sensory improvement in CMT1A mouse models and in patients. *Neurology* *65*, 681–689.

- Sahenk, Z., Galloway, G., Edwards, C., Malik, V., Kaspar, B.K., Eagle, A., Yetter, B., Forgie, A., Tsao, D., and Lin, J.C. (2010). TrkB and TrkC agonist antibodies improve function, electrophysiologic and pathologic features in Trembler J mice. *Exp. Neurol.* 224, 495–506.
- Saher, G., Brügger, B., Lappe-Siefke, C., Möbius, W., Tozawa, R., Wehr, M.C., Wieland, F., Ishibashi, S., and Nave, K.-A. (2005). High cholesterol level is essential for myelin membrane growth. *Nat. Neurosci.* 8, 468–475.
- Sandvig, A., Berry, M., Barrett, L.B., Butt, A., and Logan, A. (2004). Myelin-, reactive glia-, and scar-derived CNS axon growth inhibitors: expression, receptor signaling, and correlation with axon regeneration. *Glia* 46, 225–251.
- Savouret, J.F., Antenos, M., Quesne, M., Xu, J., Milgrom, E., and Casper, R.F. (2001). 7-ketocholesterol is an endogenous modulator for the arylhydrocarbon receptor. *J. Biol. Chem.* 276, 3054–3059.
- Sayat, R., Leber, B., Grubac, V., Wiltshire, L., and Persad, S. (2008). O-GlcNAc-glycosylation of beta-catenin regulates its nuclear localization and transcriptional activity. *Exp. Cell Res.* 314, 2774–2787.
- Schmidt, J.V., and Bradfield, C.A. (1996). Ah receptor signaling pathways. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 12, 55–89.
- Schmidt, J.V., Carver, L.A., and Bradfield, C.A. (1993). Molecular characterization of the murine Ahr gene. Organization, promoter analysis, and chromosomal assignment. *J. Biol. Chem.* 268, 22203–22209.
- Schultz, J.R., Tu, H., Luk, A., Repa, J.J., Medina, J.C., Li, L., Schwendner, S., Wang, S., Thoolen, M., Mangelsdorf, D.J., et al. (2000). Role of LXRs in control of lipogenesis. *Genes Dev.* 14, 2831–2838.
- Schumacher, M., Guennoun, R., Robert, F., Carelli, C., Gago, N., Ghoumari, A., Gonzalez Deniselle, M.C., Gonzalez, S.L., Ibanez, C., Labombarda, F., et al. (2004). Local synthesis and dual actions of progesterone in the nervous system: neuroprotection and myelination. *Growth Horm. IGF Res. Off. J. Growth Horm. Res. Soc. Int. IGF Res. Soc.* 14 Suppl A, S18–33.
- Schuske, K., Beg, A.A., and Jorgensen, E.M. (2004). The GABA nervous system in *C. elegans*. *Trends Neurosci.* 27, 407–414.
- Schweizer, R.A.S., Zürcher, M., Balazs, Z., Dick, B., and Odermatt, A. (2004). Rapid hepatic metabolism of 7-ketocholesterol by 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1: species-specific differences between the rat, human, and hamster enzyme. *J. Biol. Chem.* 279, 18415–18424.
- Seo, B.W., Sparks, A.J., Medora, K., Amin, S., and Schantz, S.L. (1999). Learning and memory in rats gestationally and lactationally exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). *Neurotoxicol. Teratol.* 21, 231–239.
- Sereda, M., Griffiths, I., Pühlhofer, A., Stewart, H., Rossner, M.J., Zimmerman, F., Magyar, J.P., Schneider, A., Hund, E., Meinck, H.M., et al. (1996). A transgenic rat model of Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuron* 16, 1049–1060.
- Sereda, M.W., Meyer zu Hörste, G., Suter, U., Uzma, N., and Nave, K.-A. (2003). Therapeutic administration of progesterone antagonist in a model of Charcot-Marie-Tooth disease (CMT-1A). *Nat. Med.* 9, 1533–1537.
- Seth, A., Steel, J.H., Nichol, D., Pocock, V., Kumaran, M.K., Fritah, A., Mobberley, M., Ryder, T.A., Rowlerson, A., Scott, J., et al. (2007). The transcriptional corepressor RIP140 regulates oxidative metabolism in skeletal muscle. *Cell Metab.* 6, 236–245.
- Shackelford, G., Makoukji, J., Grenier, J., Liere, P., Meffre, D., and Massaad, C. (2013). Differential regulation of Wnt/beta-catenin signaling by Liver X Receptors in Schwann cells and oligodendrocytes. *Biochem. Pharmacol.* 86, 106–114.
- Shah, N.M., Groves, A.K., and Anderson, D.J. (1996). Alternative neural crest cell fates are instructively promoted by TGFbeta superfamily members. *Cell* 85, 331–343.

- Shah, S., Hecht, A., Pestell, R., and Byers, S.W. (2003). Trans-repression of beta-catenin activity by nuclear receptors. *J. Biol. Chem.* *278*, 48137–48145.
- Sheeler, C.Q., Dudley, M.W., and Khan, S.A. (2000). Environmental estrogens induce transcriptionally active estrogen receptor dimers in yeast: activity potentiated by the coactivator RIP140. *Environ. Health Perspect.* *108*, 97–103.
- Shen, S., Li, J., and Casaccia-Bonnel, P. (2005). Histone modifications affect timing of oligodendrocyte progenitor differentiation in the developing rat brain. *J. Cell Biol.* *169*, 577–589.
- Sherman, D.L., and Brophy, P.J. (2005). Mechanisms of axon ensheathment and myelin growth. *Nat. Rev. Neurosci.* *6*, 683–690.
- Shimizu, T., Kagawa, T., Wada, T., Muroyama, Y., Takada, S., and Ikenaka, K. (2005). Wnt signaling controls the timing of oligodendrocyte development in the spinal cord. *Dev. Biol.* *282*, 397–410.
- Shinar, D.M., Endo, N., Rutledge, S.J., Vogel, R., Rodan, G.A., and Schmidt, A. (1994). NER, a new member of the gene family encoding the human steroid hormone nuclear receptor. *Gene* *147*, 273–276.
- Shinkyo, R., Xu, L., Tallman, K.A., Cheng, Q., Porter, N.A., and Guengerich, F.P. (2011). Conversion of 7-dehydrocholesterol to 7-ketocholesterol is catalyzed by human cytochrome P450 7A1 and occurs by direct oxidation without an epoxide intermediate. *J. Biol. Chem.* *286*, 33021–33028.
- Singh, J., Khan, M., and Singh, I. (2009). Silencing of *Abcd1* and *Abcd2* genes sensitizes astrocytes for inflammation: implication for X-adrenoleukodystrophy. *J. Lipid Res.* *50*, 135–147.
- Smith, C.J., O'Brien, T., Chatzigeorgiou, M., Spencer, W.C., Feingold-Link, E., Husson, S.J., Hori, S., Mitani, S., Gottschalk, A., Schafer, W.R., et al. (2013). Sensory neuron fates are distinguished by a transcriptional switch that regulates dendrite branch stabilization. *Neuron* *79*, 266–280.
- Sohn, J., Natale, J., Chew, L.-J., Belachew, S., Cheng, Y., Aguirre, A., Lytle, J., Nait-Oumesmar, B., Kerninon, C., Kanai-Azuma, M., et al. (2006). Identification of *Sox17* as a transcription factor that regulates oligodendrocyte development. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *26*, 9722–9735.
- Song, W., Pierce, W.M., Jr, Prough, R.A., and Redinger, R.N. (1991). Characteristics of cholesterol 7 alpha-hydroxylase and 7 alpha-hydroxycholesterol hydroxylase activities of rodent liver. *Biochem. Pharmacol.* *41*, 1439–1447.
- Song, W., Pierce, W.M., Jr, Saeki, Y., Redinger, R.N., and Prough, R.A. (1996). Endogenous 7-oxocholesterol is an enzymatic product: characterization of 7 alpha-hydroxycholesterol dehydrogenase activity of hamster liver microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.* *328*, 272–282.
- Song, W., Chen, J., Dean, W.L., Redinger, R.N., and Prough, R.A. (1998). Purification and characterization of hamster liver microsomal 7alpha-hydroxycholesterol dehydrogenase. Similarity to type I 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* *273*, 16223–16228.
- Speese, S.D., and Budnik, V. (2007). Wnts: up-and-coming at the synapse. *Trends Neurosci.* *30*, 268–275.
- Spink, B.C., Fasco, M.J., Gierthy, J.F., and Spink, D.C. (1998). 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate upregulates the Ah receptor and differentially alters CYP1B1 and CYP1A1 expression in MCF-7 breast cancer cells. *J. Cell. Biochem.* *70*, 289–296.
- Spörkel, O., Uschkureit, T., Büssow, H., and Stoffel, W. (2002). Oligodendrocytes expressing exclusively the DM20 isoform of the proteolipid protein gene: myelination and development. *Glia* *37*, 19–30.

- Stecca, B., Southwood, C.M., Gragerov, A., Kelley, K.A., Friedrich, V.L., Jr, and Gow, A. (2000). The evolution of lipophilin genes from invertebrates to tetrapods: DM-20 cannot replace proteolipid protein in CNS myelin. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 20, 4002–4010.
- Stein, D.G. (2008). Progesterone exerts neuroprotective effects after brain injury. *Brain Res. Rev.* 57, 386–397.
- Stewart, H.J., Bradke, F., Taberner, A., Morrell, D., Jessen, K.R., and Mirsky, R. (1996). Regulation of rat Schwann cell Po expression and DNA synthesis by insulin-like growth factors in vitro. *Eur. J. Neurosci.* 8, 553–564.
- Subramaniam, N., Treuter, E., and Okret, S. (1999). Receptor interacting protein RIP140 inhibits both positive and negative gene regulation by glucocorticoids. *J. Biol. Chem.* 274, 18121–18127.
- Suter, U., Welcher, A.A., Ozcelik, T., Snipes, G.J., Kosaras, B., Francke, U., Billings-Gagliardi, S., Sidman, R.L., and Shooter, E.M. (1992a). Trembler mouse carries a point mutation in a myelin gene. *Nature* 356, 241–244.
- Suter, U., Moskow, J.J., Welcher, A.A., Snipes, G.J., Kosaras, B., Sidman, R.L., Buchberg, A.M., and Shooter, E.M. (1992b). A leucine-to-proline mutation in the putative first transmembrane domain of the 22-kDa peripheral myelin protein in the trembler-J mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 4382–4386.
- Syroid, D.E., Maycox, P.J., Soilu-Hänninen, M., Petratos, S., Bucci, T., Burrola, P., Murray, S., Cheema, S., Lee, K.F., Lemke, G., et al. (2000). Induction of postnatal schwann cell death by the low-affinity neurotrophin receptor in vitro and after axotomy. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 20, 5741–5747.
- Talbott, J.F., Loy, D.N., Liu, Y., Qiu, M.S., Bunge, M.B., Rao, M.S., and Whittemore, S.R. (2005). Endogenous Nkx2.2+/Olig2+ oligodendrocyte precursor cells fail to remyelinate the demyelinated adult rat spinal cord in the absence of astrocytes. *Exp. Neurol.* 192, 11–24.
- Tamai, K., Semenov, M., Kato, Y., Spokony, R., Liu, C., Katsuyama, Y., Hess, F., Saint-Jeannet, J.P., and He, X. (2000). LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. *Nature* 407, 530–535.
- Tawara, K., Nishijo, M., Honda, R., Maruzeni, S., Seto, T., Kido, T., Saito, S., and Nakagawa, H. (2009). Effects of maternal dioxin exposure on newborn size at birth among Japanese mother-infant pairs. *Environ. Health Prev. Med.* 14, 88–95.
- Tawk, M., Makoukji, J., Belle, M., Fonte, C., Trousson, A., Hawkins, T., Li, H., Ghandour, S., Schumacher, M., and Massaad, C. (2011). Wnt/beta-catenin signaling is an essential and direct driver of myelin gene expression and myelinogenesis. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 31, 3729–3742.
- Tazawa, H., Osman, W., Shoji, Y., Treuter, E., Gustafsson, J.-A., and Zilliacus, J. (2003). Regulation of subnuclear localization is associated with a mechanism for nuclear receptor corepression by RIP140. *Mol. Cell. Biol.* 23, 4187–4198.
- Teunissen, C.E., Dijkstra, C.D., Polman, C.H., Hoogervorst, E.L.J., von Bergmann, K., and Lütjohann, D. (2003). Decreased levels of the brain specific 24S-hydroxycholesterol and cholesterol precursors in serum of multiple sclerosis patients. *Neurosci. Lett.* 347, 159–162.
- Teyssier, C., Belguise, K., Galtier, F., Cavailles, V., and Chabos, D. (2003). Receptor-interacting protein 140 binds c-Jun and inhibits estradiol-induced activator protein-1 activity by reversing glucocorticoid receptor-interacting protein 1 effect. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 17, 287–299.
- Thenot, S., Charpin, M., Bonnet, S., and Cavailles, V. (1999). Estrogen receptor cofactors expression in breast and endometrial human cancer cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 156, 85–93.
- Thiel, R., Koch, E., Ulbrich, B., and Chahoud, I. (1994). Peri- and postnatal exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin: effects on physiological development, reflexes, locomotor activity and learning behaviour in Wistar rats. *Arch. Toxicol.* 69, 79–86.

- Thinakaran, G., and Koo, E.H. (2008). Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. *J. Biol. Chem.* *283*, 29615–29619.
- Tomkiewicz, C., Herry, L., Bui, L.-C., Métayer, C., Bourdeloux, M., Barouki, R., and Coumoul, X. (2013). The aryl hydrocarbon receptor regulates focal adhesion sites through a non-genomic FAK/Src pathway. *Oncogene* *32*, 1811–1820.
- Topilko, P., Schneider-Maunoury, S., Levi, G., Baron-Van Evercooren, A., Chennoufi, A.B., Seitanidou, T., Babinet, C., and Charnay, P. (1994). Krox-20 controls myelination in the peripheral nervous system. *Nature* *371*, 796–799.
- Treuter, E., Albrechtsen, T., Johansson, L., Leers, J., and Gustafsson, J.A. (1998). A regulatory role for RIP140 in nuclear receptor activation. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* *12*, 864–881.
- Trousseau, A., Bernard, S., Petit, P.X., Liere, P., Pianos, A., El Hadri, K., Lobaccaro, J.-M.A., Ghandour, M.S., Raymondjean, M., Schumacher, M., et al. (2009). 25-hydroxycholesterol provokes oligodendrocyte cell line apoptosis and stimulates the secreted phospholipase A2 type IIA via LXR beta and PXR. *J. Neurochem.* *109*, 945–958.
- Tsai, N.-P., Lin, Y.-L., and Wei, L.-N. (2009). MicroRNA mir-346 targets the 5'-untranslated region of receptor-interacting protein 140 (RIP140) mRNA and up-regulates its protein expression. *Biochem. J.* *424*, 411–418.
- Tyson, J., Malcolm, S., Thomas, P.K., and Harding, A.E. (1996). Deletions of chromosome 17p11.2 in multifocal neuropathies. *Ann. Neurol.* *39*, 180–186.
- Ulven, S.M., Dalen, K.T., Gustafsson, J.-A., and Nebb, H.I. (2004). Tissue-specific autoregulation of the LXRalpha gene facilitates induction of apoE in mouse adipose tissue. *J. Lipid Res.* *45*, 2052–2062.
- Urano, Y., Ochiai, S., and Noguchi, N. (2013). Suppression of amyloid- β production by 24S-hydroxycholesterol via inhibition of intracellular amyloid precursor protein trafficking. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *27*, 4305–4315.
- Uyemura, K., Asou, H., and Takeda, Y. (1995). Structure and function of peripheral nerve myelin proteins. *Prog. Brain Res.* *105*, 311–318.
- Verhamme, C., de Haan, R.J., Vermeulen, M., Baas, F., de Visser, M., and van Schaik, I.N. (2009). Oral high dose ascorbic acid treatment for one year in young CMT1A patients: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase II trial. *BMC Med.* *7*, 70.
- Verheijen, M.H.G., Camargo, N., Verdier, V., Nadra, K., de Preux Charles, A.-S., Médard, J.-J., Luoma, A., Crowther, M., Inouye, H., Shimano, H., et al. (2009). SCAP is required for timely and proper myelin membrane synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 21383–21388.
- Vine, D.F., Croft, K.D., Beilin, L.J., and Mamo, J.C. (1997). Absorption of dietary cholesterol oxidation products and incorporation into rat lymph chylomicrons. *Lipids* *32*, 887–893.
- Vo, N., Fjeld, C., and Goodman, R.H. (2001). Acetylation of nuclear hormone receptor-interacting protein RIP140 regulates binding of the transcriptional corepressor CtBP. *Mol. Cell. Biol.* *21*, 6181–6188.
- Wagner, B.L., Valledor, A.F., Shao, G., Daige, C.L., Bischoff, E.D., Petrowski, M., Jepsen, K., Baek, S.H., Heyman, R.A., Rosenfeld, M.G., et al. (2003). Promoter-specific roles for liver X receptor/corepressor complexes in the regulation of ABCA1 and SREBP1 gene expression. *Mol. Cell. Biol.* *23*, 5780–5789.
- Wakamatsu, Y., Maynard, T.M., and Weston, J.A. (2000). Fate determination of neural crest cells by NOTCH-mediated lateral inhibition and asymmetrical cell division during gangliogenesis. *Dev. Camb. Engl.* *127*, 2811–2821.

- Wang, L., Schuster, G.U., Hultenby, K., Zhang, Q., Andersson, S., and Gustafsson, J.-A. (2002). Liver X receptors in the central nervous system: from lipid homeostasis to neuronal degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 13878–13883.
- Wei, L.N., Hu, X., Chandra, D., Seto, E., and Farooqui, M. (2000). Receptor-interacting protein 140 directly recruits histone deacetylases for gene silencing. *J. Biol. Chem.* *275*, 40782–40787.
- Wei, Y.D., Helleberg, H., Rannug, U., and Rannug, A. (1998). Rapid and transient induction of CYP1A1 gene expression in human cells by the tryptophan photoproduct 6-formylindolo[3,2-b]carbazole. *Chem. Biol. Interact.* *110*, 39–55.
- Weiner, J.A., and Chun, J. (1999). Schwann cell survival mediated by the signaling phospholipid lysophosphatidic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 5233–5238.
- Whitney, K.D., Watson, M.A., Collins, J.L., Benson, W.G., Stone, T.M., Numerick, M.J., Tippin, T.K., Wilson, J.G., Winegar, D.A., and Kliewer, S.A. (2002). Regulation of cholesterol homeostasis by the liver X receptors in the central nervous system. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* *16*, 1378–1385.
- Williamson, M.A., Gasiewicz, T.A., and Opanashuk, L.A. (2005). Aryl hydrocarbon receptor expression and activity in cerebellar granule neuroblasts: implications for development and dioxin neurotoxicity. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* *83*, 340–348.
- Willy, P.J., Umesono, K., Ong, E.S., Evans, R.M., Heyman, R.A., and Mangelsdorf, D.J. (1995). LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway. *Genes Dev.* *9*, 1033–1045.
- Wincent, E., Amini, N., Luecke, S., Glatt, H., Bergman, J., Crescenzi, C., Rannug, A., and Rannug, U. (2009). The suggested physiologic aryl hydrocarbon receptor activator and cytochrome P4501 substrate 6-formylindolo[3,2-b]carbazole is present in humans. *J. Biol. Chem.* *284*, 2690–2696.
- Windahl, S.H., Treuter, E., Ford, J., Zilliacus, J., Gustafsson, J.A., and McEwan, I.J. (1999). The nuclear-receptor interacting protein (RIP) 140 binds to the human glucocorticoid receptor and modulates hormone-dependent transactivation. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* *71*, 93–102.
- Wolff, S., Harper, P.A., Wong, J.M., Mostert, V., Wang, Y., and Abel, J. (2001). Cell-specific regulation of human aryl hydrocarbon receptor expression by transforming growth factor-beta(1). *Mol. Pharmacol.* *59*, 716–724.
- Wolozin, B., Kellman, W., Ruosseau, P., Celesia, G.G., and Siegel, G. (2000). Decreased prevalence of Alzheimer disease associated with 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Arch. Neurol.* *57*, 1439–1443.
- Wolpowitz, D., Mason, T.B., Dietrich, P., Mendelsohn, M., Talmage, D.A., and Role, L.W. (2000). Cysteine-rich domain isoforms of the neuregulin-1 gene are required for maintenance of peripheral synapses. *Neuron* *25*, 79–91.
- Woodhoo, A., Dean, C.H., Droggiti, A., Mirsky, R., and Jessen, K.R. (2004). The trunk neural crest and its early glial derivatives: a study of survival responses, developmental schedules and autocrine mechanisms. *Mol. Cell. Neurosci.* *25*, 30–41.
- Woodhoo, A., Alonso, M.B.D., Droggiti, A., Turmaine, M., D'Antonio, M., Parkinson, D.B., Wilton, D.K., Al-Shawi, R., Simons, P., Shen, J., et al. (2009). Notch controls embryonic Schwann cell differentiation, postnatal myelination and adult plasticity. *Nat. Neurosci.* *12*, 839–847.
- Xiao, J.-H., Ghosn, C., Hinchman, C., Forbes, C., Wang, J., Snider, N., Cordrey, A., Zhao, Y., and Chandraratna, R.A.S. (2003). Adenomatous polyposis coli (APC)-independent regulation of beta-catenin degradation via a retinoid X receptor-mediated pathway. *J. Biol. Chem.* *278*, 29954–29962.

- Xu, W., Shy, M., Kamholz, J., Elferink, L., Xu, G., Lilien, J., and Balsamo, J. (2001). Mutations in the cytoplasmic domain of P0 reveal a role for PKC-mediated phosphorylation in adhesion and myelination. *J. Cell Biol.* *155*, 439–446.
- Yan, Z.H., Karam, W.G., Staudinger, J.L., Medvedev, A., Ghanayem, B.I., and Jetten, A.M. (1998). Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha-induced transactivation by the nuclear orphan receptor TAK1/TR4. *J. Biol. Chem.* *273*, 10948–10957.
- Ye, F., Chen, Y., Hoang, T., Montgomery, R.L., Zhao, X., Bu, H., Hu, T., Taketo, M.M., van Es, J.H., Clevers, H., et al. (2009). HDAC1 and HDAC2 regulate oligodendrocyte differentiation by disrupting the beta-catenin-TCF interaction. *Nat. Neurosci.* *12*, 829–838.
- Young, K.M., Psachoulia, K., Tripathi, R.B., Dunn, S.-J., Cossell, L., Attwell, D., Tohyama, K., and Richardson, W.D. (2013). Oligodendrocyte dynamics in the healthy adult CNS: evidence for myelin remodeling. *Neuron* *77*, 873–885.
- Yu, W.-M., Feltri, M.L., Wrabetz, L., Strickland, S., and Chen, Z.-L. (2005). Schwann cell-specific ablation of laminin gamma1 causes apoptosis and prevents proliferation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *25*, 4463–4472.
- Zalc, B., Goujet, D., and Colman, D. (2008). The origin of the myelination program in vertebrates. *Curr. Biol. CB* *18*, R511–512.
- Zelcer, N., and Tontonoz, P. (2006). Liver X receptors as integrators of metabolic and inflammatory signaling. *J. Clin. Invest.* *116*, 607–614.
- Zelcer, N., Khanlou, N., Clare, R., Jiang, Q., Reed-Geaghan, E.G., Landreth, G.E., Vinters, H.V., and Tontonoz, P. (2007). Attenuation of neuroinflammation and Alzheimer's disease pathology by liver x receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 10601–10606.
- Zelcer, N., Hong, C., Boyadjian, R., and Tontonoz, P. (2009). LXR regulates cholesterol uptake through Idol-dependent ubiquitination of the LDL receptor. *Science* *325*, 100–104.
- Zhou, Q., Wang, S., and Anderson, D.J. (2000). Identification of a novel family of oligodendrocyte lineage-specific basic helix-loop-helix transcription factors. *Neuron* *25*, 331–343.
- Zhu, W., Leber, B., and Andrews, D.W. (2001). Cytoplasmic O-glycosylation prevents cell surface transport of E-cadherin during apoptosis. *EMBO J.* *20*, 5999–6007.
- Zilliacus, J., Holter, E., Wakui, H., Tazawa, H., Treuter, E., and Gustafsson, J.A. (2001). Regulation of glucocorticoid receptor activity by 14-3-3-dependent intracellular relocalization of the corepressor RIP140. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* *15*, 501–511.
- Zschiedrich, I., Hardeland, U., Krones-Herzig, A., Berriel Diaz, M., Vegiopoulos, A., Muggenburg, J., Sombroek, D., Hofmann, T.G., Zawatzky, R., Yu, X., et al. (2008). Coactivator function of RIP140 for NFkappaB/RelA-dependent cytokine gene expression. *Blood* *112*, 264–276.