



HAL
open science

Caractérisation des rôles du co-récepteur de Shh, Boc, dans le développement et la réparation de la myéline du système nerveux central.

Mary Zakaria

► **To cite this version:**

Mary Zakaria. Caractérisation des rôles du co-récepteur de Shh, Boc, dans le développement et la réparation de la myéline du système nerveux central.. Neurobiologie. Université Paris Saclay (COmUE), 2017. Français. NNT: 2017SACLS062 . tel-02501812

HAL Id: tel-02501812

<https://theses.hal.science/tel-02501812>

Submitted on 8 Mar 2020

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.

NNT : 2017SACLS062

THESE DE DOCTORAT
DE
L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY
PREPAREE A
L'UNIVERSITE PARIS-SUD

ECOLE DOCTORALE N° 568 BIOSIGNE
Signalisations et réseaux intégratifs en biologie

Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Par

Mme Mary Zakaria

Caractérisation des rôles du co-récepteur de Sonic Hedgehog, Boc, dans le développement et la réparation de la myéline du système nerveux central

Thèse présentée et soutenue au Kremlin Bicêtre, le 22 mars 2017:

Composition du Jury :

Mr Daniel Hervé	PU – Neuro PSI, Orsay	Président
Mme Durbec Pascale	DR – IBDM, Marseille	Rapporteur
Mme Fombonne Joanna	MCU- HDR – CRCL, Lyon	Rapporteur
Mr Nait-Oumesmar Brahim	DR – ICM, Paris	Examineur
Mme Traiffort Elisabeth	DR – Inserm, Univ. Paris Saclay, Kremlin-Bicêtre	Directeur de thèse

**Tout obstacle renforce la détermination.
Celui qui s'est fixé un but n'en change pas.**

Léonard de Vinci

Remerciements

Par ces quelques lignes, je tiens à remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin au bon déroulement de cette thèse...

Je tiens à remercier en premier lieu les membres du Jury d'avoir accepté de juger ce travail. **M. Hervé Daniel**, je vous remercie d'avoir accepté de présider le jury de ma thèse. **M. Brahim Nait Oumesmar**, votre parcours et votre travail reflètent d'excellentes avancées dans le domaine de la réparation de la myéline, je suis ravie que vous soyez dans mon jury de thèse et j'espère que cette soutenance nous donnera l'opportunité d'échanges fructueux. Je remercie en particulier **Mme Joanna Fombonne**, d'avoir accepté d'évaluer ce travail. Vous m'avez accompagnée au cours de ce travail de thèse, notamment au moment de l'évaluation de mi-parcours par visioconférence, la soutenance sera alors l'occasion d'un échange face à face vif et amical. **Mme Pascale Durbec**, je vous remercie vivement pour le temps que vous avez accordé à ce projet que ce soit durant notre rencontre à Carry le Rouet ou pendant la correction de la thèse. J'ai toujours admiré vos présentations et votre travail.

Je tiens à remercier spécialement ma directrice de thèse **Elisabeth Traiffort**. Je te remercie d'avoir cru en mes capacités et pour le temps que tu as accordé à la réussite de cette thèse. Merci pour ta gentillesse, ta patience et tes conseils scientifiques. Démarrer avec toi une nouvelle équipe m'a permis d'apprendre beaucoup de tâches de gestion et d'autonomie, la patience, et surtout la persévérance pour continuer de creuser scientifiquement.

Je remercie également **Michael Schumacher**, directeur de l'unité U1195. Merci de m'avoir accueillie dans ton unité. Merci pour ta présence sécurisante (et aussi parfois effrayante! humour belge) les weekends au labo.

Je tiens à remercier ensuite l'ensemble des personnes qui m'ont aidée à la réalisation de ce travail. **NaTTy**, merci pour ton soutien non seulement au niveau des manips mais aussi moral. Je te remercie pour toute l'aide que tu m'as apportée surtout pendant les derniers mois de thèse. Tu m'as appris qu'il y a des jours avec et des jours sans...et les jours sans, il faut ~~faire~~ ~~avec~~ boire de l'alcool... Merci pour ton mode fofolle ! **Ghislaine**, je ne pourrais jamais oublier tous tes conseils et ton savoir scientifique qui m'ont permis de réussir mes manips. Merci pour tes protocoles super bien détaillés et pour tout le matériel que tu nous as cédé. **Olivier** et **Philippe**, je vous remercie pour l'aide et les conseils que vous m'avez transmis pour la réalisation et le traitement des images au microscope. **Marion**, je me rappelle toujours de la première fois quand tu m'as montré les coupes au cryostat, depuis je coupais comme dans du beurre ! **Abdel**, je te remercie de m'avoir appris à faire les cultures organotypiques, merci également pour nos petites discussions d'humour. **Cindy**, je te remercie également de m'avoir

aidée dans mes histoires de PCR. Merci pour l'aide que tu m'as apportée dans mes sujets divers. Avec toi tout semble plus facile !

Pour les personnes qui ont participé moins directement à cette thèse, je tiens à vous remercier.

Hiroko, Ce fut une période difficile et ton aide fut plus qu'appréciable. Tu m'as montré que les vrais amis sont ceux qui te soutiennent et t'encouragent quand tu passes des moments difficiles. Merci pour toutes ces années, je n'oublierai jamais toutes nos sorties sympa. **Yous**, merci pour ton riche fond intellectuel. Après tous nos beaux souvenirs ensemble j'ai réalisé que mieux vaut être giflée par la vérité qu'embrassée par un mensonge. **Martine**, que dois-je dire ? Pendant ces 3 années, tu étais pour moi, une mère, une sœur, une amie et un médecin... je t'écris un « Merci » qui vient vraiment du fond du cœur. **Kaja**, my lovely sweet friend, thank you for all the good memories we shared in Paris, hanging out with you was a pleasure! See you in Lebanon! **Aya**, merci pour ta bonne humeur au quotidien et ta sincérité, je te remercie de m'avoir remonté le moral avec ton beau sourire, et tes encouragements à chaque fois que tu me voyais down ! Je suis très ravie de ton amitié ya banadoura... **Marcel**, je te remercie pour ton soutien et pour toutes tes réflexions solides et fructueuses. Merci également pour nos petites plaisanteries diverses. **Jenny**, le génie du Word ! Grand merci pour ton aide !! **Geri**, grazie mille mia bella !! Enfin, **Laurent**, être là, présent et m'écouter...une petite chose pour toi mais crois-moi tu m'as énormément aidé et j'apprécie de tout mon cœur ton soutien. Merci !!

Pour tous ceux que j'ai oubliés dans ces quelques lignes, merci d'avoir d'une façon ou d'une autre contribué à ces trois années de thèse.

Enfin, j'ai une pensée très affectueuse pour l'ensemble des personnes de mon entourage.

Cynthia, colloc' et chère amie... merci pour tous les moments qu'on a partagés ensemble à l'école, à la fac, au foyer, à Jussieu, au Cantagrel, tu as rendu mes jours à Paris beaucoup plus agréables. Mes parents m'ont donné une sœur, mais la vie m'en a donné une autre qui est aussi chère à mon cœur. Mais juste une question : shou 3m na3mol hon ? Love you ciciiii. A mes amis libano-parisiens, **Mohsen, Steph, Sacha et Racha**, vous êtes adorables, merci pour tous ces moments agréables qu'on a partagés ensemble, je vous aime ☺ **Marsida**, mon amie depuis 4 ans déjà, je n'oublierai jamais nos sorties et nos discussions, merci à toi, je suis vraiment contente de t'avoir rencontrée. **Dandouna**, sache que tes passages à Paris m'ont vraiment donné un nouveau souffle à chaque fois, merci ma cousine préférée ☺

Walid mon bibi, sans que je te le demande, tu as su m'aider au moment où j'en avais le plus besoin. Ta présence, ton soutien et ton écoute m'ont permis de remonter la pente. Sans toi, je ne serais peut-être pas là aujourd'hui. Je te remercie de tout mon cœur et je te serai toujours reconnaissante. Je te soutiendrai jusqu'à la fin... comme tu as fait pour moi. Je t'aime.

Enfin, une dernière pensée à ma famille au Liban qui est derrière la personne que je suis devenue. Cette thèse vous est dédiée. **Maman, Papa**, merci de m'avoir toujours soutenue sans compter par vos pensées et vos prières et malgré la distance et les moments en famille qui sont devenus de plus en plus rares au fil des années. J'espère que vous êtes fiers de moi. Je vous serais à jamais reconnaissante. Ma sœur **Fabie**, mes deux frères **Bacho et Moni**, merci...c'est un mot trop simple. Ce que je souhaiterais exprimer est au-dessus de cela. Je suis à la fois touchée et reconnaissante pour l'aide que vous m'avez apportée...et je ne pourrai jamais vous remercier assez. Je vous aime infiniment. A **Joseph, Cynthia et Ghaina**, je vous remercie également, je vous aime tous. A mes neveux, **Sam et Christ**, à mes nièces, **Laura et Maria**, je vous remercie pour la joie que vous avez apportée à ma vie. Désolée pour le temps que j'ai passé loin de vous mais sachez que vous étiez toujours dans mon cœur et mes pensées.

Table des matières

INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1. LES OLIGODENDROCYTES ET LE PROCESSUS DE MYELINISATION DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL ...	2
1. <i>Les oligodendrocytes</i>	3
2. <i>L'oligodendrogenèse et la myélinisation du SNC.</i>	6
2.1. Génération des OLs durant le développement prénatal	6
2.2. Génération périnatale et postnatale précoce des OLs	9
2.3. Génération des OLs chez l'adulte	10
2.4. La myélinisation du système nerveux central.....	12
2.4.1. La myéline : composition et architecture	12
2.4.2. Processus de myélinisation	15
A. Communication axone – OL.....	16
B. Facteurs contrôlant la myélinisation	17
CHAPITRE 2. DEMYELINISATION ET REPARATION DE LA MYELINE	20
1. <i>La sclérose en plaques</i>	20
1.1. Signes cliniques et diagnostic	20
1.2. Epidémiologie et étiologie	21
1.3. Les formes évolutives de la SEP	23
1.4. Les approches thérapeutiques de la SEP	24
2. <i>Modèles expérimentaux de démyélinisation</i>	25
2.1. Démyélinisation induite par les toxines.....	25
2.2. Encéphalomyélite auto-immune expérimentale	27
3. <i>La remyélinisation</i> :	27
3.1. Caractéristiques de la myéline régénérée	28
3.2. Les populations de cellules mobilisées : les progéniteurs	29
3.3. Rôle de la microglie et de l'astroglie réactives	30
3.3.1. Implication de la microglie activée.....	30
3.3.2. Implication des astrocytes réactifs.....	31
3.4. Les différents régulateurs positifs et négatifs.....	34
CHAPITRE 3. LA VOIE SONIC HEDGEHOG ET SON IMPLICATION DANS LA REGULATION DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL	37
1. <i>Les protéines Hedgehog : identification, biogenèse, sécrétion et transport.</i>	37
1.1. Synthèse et maturation	38
1.2. Sécrétion et transport.....	39
2. <i>Transduction du signal Sonic Hedgehog</i>	42
2.1. La voie canonique	42
2.1.1. Les mécanismes d'interaction proposés entre Ptc et Smo	43
2.1.2. De l'activation de Smo vers l'induction des Glis : quel est le rôle du cil primaire ?	45
2.2. Les voies non-canoniques indépendantes de Gli	46
3. <i>Shh et le lignage oligodendrocytaire</i>	48
3.1. Au cours du développement embryonnaire	48
3.1.1. Dans la moelle épinière	48
3.1.2. Dans le cerveau postérieur et le mésencéphale.....	50
3.1.3. Dans le cerveau antérieur	51
3.2. Au cours du développement post-natal précoce.....	53
3.3. A l'âge adulte : Shh en physiologie et en pathologie	54
3.3.1. L'expression des composantes de la voie Shh dans le cerveau mature	54

3.3.2.	Rôles de Shh dans le lignage oligodendrocytaire chez l'adulte	56
3.3.3.	Pathologies associées à une dysrégulation de la voie Shh et son rôle dans les maladies démyélinisantes	58

CHAPITRE 4. BOC, UNE PROTEINE TRANSMEMBRANAIRE, IMPLIQUEE DANS LA TRANSMISSION DE LA SIGNALISATION HEDGEHOG	61
1. <i>Identification, structure et interactions.....</i>	61
2. <i>Expression, activation et renouvellement.....</i>	66
3. <i>Fonctions Biologiques de Boc.....</i>	71
3.1. Boc s'associe à Cdo pour réguler positivement la différenciation myogénique	72
3.2. Boc est impliqué dans la régulation du poids et de la masse adipeuse	72
3.3. Boc modifie le spectre de l'holoprosencéphalie chez des souris mutantes Gas1 et Cdo	73
3.4. Boc est impliqué dans la prolifération des progéniteurs des neurones granulaires du cervelet induite par Shh	74
3.5. Boc favorise la progression des médulloblastomes vers des formes de tumeurs avancées.....	76
3.6. Boc est le récepteur de Shh dans le guidage des axones commissuraux.....	77
3.7. Boc est indispensable à la ségrégation des axones ipsilatéraux des cellules ganglionnaires de la rétine	78
3.8. Shh via son récepteur Boc participe à la formation des microcircuits corticaux durant le développement postnatal précoce	80
OBJECTIFS	82
RESULTATS	84
<i>Article (p1-41)</i>	
<i>Revue (p1-20)</i>	
DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	87
1. <i>Boc et la complexité de la signalisation Sonic Hedgehog.....</i>	89
2. <i>L'influence de Boc sur la distribution des différentes populations oligodendrocytaires.....</i>	93
3. <i>Le rôle unique de Boc dans le contrôle de la myélinisation des petits axones du SNC.....</i>	95
4. <i>Boc et la théorie de la « récapitulation » du processus développemental au cours de la réparation de la myéline.....</i>	98
CONCLUSION.....	100
BIBLIOGRAPHIE	101

Table des illustrations

FIGURE 1: STADES DE DIFFERENCIATION ET DE MATURATION DES CELLULES DU LIGNAGE OLIGODENDROCYTAIRE CHEZ LA SOURIS	4
FIGURE 2: L'OLIGODENDROGENESE DANS LA MOELLE EPINIERE ET LE CERVEAU EN DEVELOPPEMENT.....	8
FIGURE 3: PROLIFERATION ET DIFFERENCIATION DES NSCs DANS LE CERVEAU EMBRYONNAIRE.	9
FIGURE 4: STRUCTURE ET COMPOSITION DE LA MYELINE CENTRALE.	14
FIGURE 5: REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES DIFFERENTES ETAPES CONDUISANT A LA COMPACTION DE LA MYELINE.....	16
FIGURE 6: COUPE DU CERVEAU ANTERIEUR D'UN PATIENT DECEDE DE SCLEROSE EN PLAQUES.	21
FIGURE 7: PREVALENCE DE LA SEP DANS LE MONDE ET EN PARTICULIER EN FRANCE.	23
FIGURE 8: ARCHITECTURE DE LA MYELINE APRES DEMYELINISATION.	28
FIGURE 9: LES DIFFERENTES MORPHOLOGIES DE LA MICROGLIE.....	31
FIGURE 10: LES DIFFERENTES MORPHOLOGIES DES ASTROCYTES MARQUES PAR LA GFAP.	32
FIGURE 11: LES ETAPES ET LES POPULATIONS CELLULAIRES DE LA REMYELINISATION.....	33
FIGURE 12: LA FAMILLE HEDGEHOG.	38
FIGURE 13: BIOGENESE ET SECRETION DE LA PROTEINE HEDGEHOG.....	41
FIGURE 14: LA VOIE CANONIQUE DE SHH.....	43
FIGURE 15: LES DIFFERENTS TYPES DE VOIES NON CANONIQUES DE SHH.....	47
FIGURE 16: LA GENERATION DES OLIGODENDROCYTES DEPEND DE SHH DANS LA MOELLE EPINIERE ET LE CERVEAU EN DEVELOPPEMENT....	52
FIGURE 17: EXPRESSION DES COMPOSANTS DE LA VOIE SHH DANS LE CERVEAU ET LE CERVELET ADULTE DU RONGEUR.	56
FIGURE 18: REPRESENTATION DE LA STRUCTURE TRIDIMENSIONNELLE ET DES INTERACTIONS DE LA PROTEINE BOC.	63
FIGURE 19: SCHEMA RESUMANT LES DOMAINES DE CDO ET BOC REQUIS OU NON POUR LA TRANSDUCTION DU SIGNAL HH.	65
FIGURE 20: PROFILS D'EXPRESSION DE CDO ET BOC.	67
FIGURE 21: EXPRESSION DE BOC DANS LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL EMBRYONNAIRE.	70
FIGURE 22: LE PHENOTYPE DES SOURIS BOC KO DANS LE CERVELET EN DEVELOPPEMENT.	75
FIGURE 23: LE RECEPTEUR DE SHH BOC EST IMPLIQUE DANS LE GUIDAGE AXONAL DANS LE TUBE NEURAL ET LE CHIASSA OPTIQUE.	79
FIGURE 24: SHH ET SON RECEPTEUR BOC REGULENT LA FORMATION SPECIFIQUE DES SYNAPSES PENDANT LE DEVELOPPEMENT CORTICAL. .	81
TABLEAU 1: PRINCIPAUX FACTEURS IMPLIQUES DANS LE PROCESSUS DE REMYELINISATION.....	35

Liste des abréviations

AEP	Anterior Entopeduncular area
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
AMPc	Adénosine Mono-Phosphate cyclique
APC	Adenomatous Polyposis Coli
ATP	Adenosine triphosphate
BDNF	Brain-Derived Neurotrophic Factor
BHE	Barrière Hémato-Encéphalique
bHLH	basic Helix-Loop-Helix
BOC	Brother of CDO
Boi	Brother of ihog
Brg1	Brahma-related gene 1
CAII	Carbonic Anhydrase II
CD4/8	Cluster of differentiation 4/8
CDO	Cell adhesion molecule-related, down-regulated by oncogenes
CGNPs	Cerebellum Granular Neuron Progenitors
CNP	Cyclique nucléotide phosphodiesterase
CNTF	Ciliary Neurotrophic Factor
CRD	Cysteine Rich Domain
Cxcr4	Chemokine receptor 4
DCC	Deleted in Colorectal Cancer
Dhh	Desert Hedgehog
Disp	Dispatched
DRG	Dorsal Root Ganglion
DTI	Diffusion Tensor Imaging
EAE	Experimental Autoimmune Encephalomyelitis
EBV	Epstein-Barr Virus
EEG	Electroencéphalographie
EGL	External Granule Layer
ERK1/2	Extracellular Related Kinases1/2
FGF	Fibroblast Growth Factor
Fn	Fibronectin
Gal3	Galectine-3
GalC	Galactosylceramidase
Gas6	Growth arrest specific 6
GPCR	G Protein-Coupled Receptor
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GRKs	G Protein-Coupled Receptor Kinases
HDAC	Histones deacetylases
Hip	Hedgehog interacting protein
HSPG	Heparin Sulfate proteoglycans
IGF-1	Insulin like-growth factor 1
IGL	Internal Granule Layer

Ihh	Indien Hedgehog
Ihog	Interference hedgehog
IL	Interleukin
iNOS	Inducible nitric oxide synthase
IRM	Imagerie par résonance magnétique
KO	KnockOut
LGE	Lateral Ganglionic Eminence
LIF	Leukemia Inhibitory Factor
LINGO1	Leucine-rich repeat and Immunoglobulin Domain-Containing-1
LPC	Lysophosphatidilcholine
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MBP	Myelin Basic Protein
MGE	Medial Ganglionic Eminence
MOG	Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein
mTor	mammalian Target of rapamycin
Myrf	Myelin Regulatory Factor
NG2	Neural Glial Antigen 2
NRG-1	Neureguline-1
NSCs	Neural Stem Cells
NT-3	Neurotrophine 3
O4	Oligodendrocyte Marker
OL	Oligodendrocyte
OPC	Oligodendrocyte Progenitor Cell
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGF-A	Platelet-Derived Growth Factor A
PDGFR α	Platelet-Derived Growth Factor Receptor alpha
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PIP4	Phosphatidyl-Inositol-4 Phosphate
PLP	Proteolipid Protein
PSA-NCAM	Polysialylated Neuronal Cell Adhesion Molecule
Ptc	Patched
PTX	Pertussis Toxin
RND	Resistance Nodulation Division
Robo	Roundabout
ROS	Reactive oxygene species
SEP	Sclérose En Plaques
Shh	Sonic Hedgehog
Smo	Smoothened
SN	Système Nerveux
SNC	Système Nerveux Central
SNP	Système Nerveux Périphérique
Sox10	SRY (sex determining region Y)-box 10
Sufu	Suppressor of fused
Sulf	Sulfatase

TAPs	Transitory-Amplifying Progenitors
Tcf4	Transcription factor 4
TEP	Tomographie par Emission de Positron
TNF α	Tumor Necrotic Factor alpha
VEGF-A	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire A
V-SVZ	Ventriculaire- Subventriculaire Zone
YY1	Ying Yang 1

Introduction

Chapitre 1. Les oligodendrocytes et le processus de myélinisation du système nerveux central

Avant-propos : Généralités concernant le système nerveux chez les vertébrés

Le système nerveux (SN) est le système biologique de l'organisme responsable de la réception, du transport et de l'intégration des informations venant de l'environnement extérieur ou des différentes parties du corps. En permettant une réponse précise et rapide, il confère à l'organisme une grande capacité d'adaptation et participe au maintien de l'homéostasie des différents tissus.

Le système nerveux des vertébrés se compose du système nerveux central (SNC), constitué de l'encéphale (cerveau, tronc cérébral, cervelet), et de la moelle épinière, et du système nerveux périphérique (SNP) qui comporte les nerfs et ganglions à l'extérieur du cerveau et de la moelle épinière.

Cette distinction repose sur des considérations d'ordre embryologique. Le SNC et le SNP dérivent l'un et l'autre du tube neural, mais le SNP n'est issu que de la partie la plus dorsale du tube neural appelée 'crêtes neurales'. Alors que le SNC constitue le centre de régulation et d'intégration des informations, le SNP a un rôle essentiel dans la transmission de l'information soit du SNC vers les différents organes ou tissus (voies motrices ou efférentes) soit des différents organes ou tissus vers le SNC (voies sensibles ou afférentes).

Cette thèse étant focalisée sur les processus conduisant à la production de la myéline en conditions physiologiques ou pathologiques, ce premier chapitre sera consacré à la description des oligodendrocytes (OLs), les cellules produisant la myéline dans le SNC, à leur genèse et à la génération de la myéline proprement dite.

1. Les oligodendrocytes

Les cellules gliales auxquelles appartiennent les OLs, représentent environ 90% des cellules du SNC. A l'heure actuelle, elles se voient attribuer des rôles beaucoup plus étendus que celui de « glue » qui leur avait été initialement attribué (Virshow, 1846) puisqu'elles participent notamment au développement et à la plasticité du système nerveux (Herculano-Houzel, 2014; Zuchero and Barres, 2015). Leur découverte par Rio Hortega et Ramon y Cajal (Raymond Y Cajal, 1913; Rio Hortega, 1921) a rapidement conduit à distinguer deux catégories : les cellules microgliales ou (microglie) représentant 5 à 10% des cellules gliales, d'origine mésodermique et appartenant au lignage monocyte/macrophage, et les cellules macrogliales dérivées du neuroectoderme et regroupant les astrocytes et les OLs (pour revue, (Rowitch and Kriegstein, 2010).

Présent de manière uniforme chez tous les vertébrés, l'OL permet la formation de la gaine myéline et des nœuds de Ranvier assurant par conséquent la conduction optimale de l'influx nerveux (Bradl and Lassmann, 2010). La myélinisation des axones assurée par les OLs constitue une avancée au cours de l'évolution des espèces (Hartline and Colman, 2007). Chaque OL émet plusieurs prolongements qui s'enroulent autour de différents axones adjacents. En effet, contrairement à la cellule de Schwann qui ne myélinise qu'un seul axone dans le SNP, l'OL est capable de myéliniser plusieurs axones. Il enroule sa membrane plasmique en couches successives qui forment une spirale sur un segment d'axone ou internœud. Les segments de myéline adjacents sur un axone peuvent donc provenir de différents OLs (Baumann and Pham-Dinh, 2001). L'OL présente un noyau dense, un corps cellulaire irrégulier et de petite taille, et de nombreux prolongements qui contrairement à ceux des astrocytes, ne sont pas riches en filaments intermédiaires mais en microtubules (Lunn et al., 1997).

De nombreux outils génétiques et biochimiques ont fait évoluer nos connaissances sur le développement des OLs ou oligodendrogenèse. En particulier, l'identification de marqueurs cellulaires spécifiques et l'utilisation des séquences promotrices des gènes codant pour ces marqueurs (Figure 1D) ont permis une caractérisation détaillée des progéniteurs d'OL (OPCs) et plus généralement des cellules de l'ensemble du lignage oligodendrocytaire (Emery, 2010; Hartline and Colman, 2007; Kessarlis et al., 2006; Richardson et al., 2006). Ces outils ont par la suite permis d'analyser le renouvellement physiologique (turn-over) des OLs et leur régénération consécutive à une destruction pathologique dans le cerveau adulte (Fancy et al., 2011a; Franklin and Ffrench-Constant, 2008; McTigue and Tripathi, 2008; Miller and Mi, 2007).

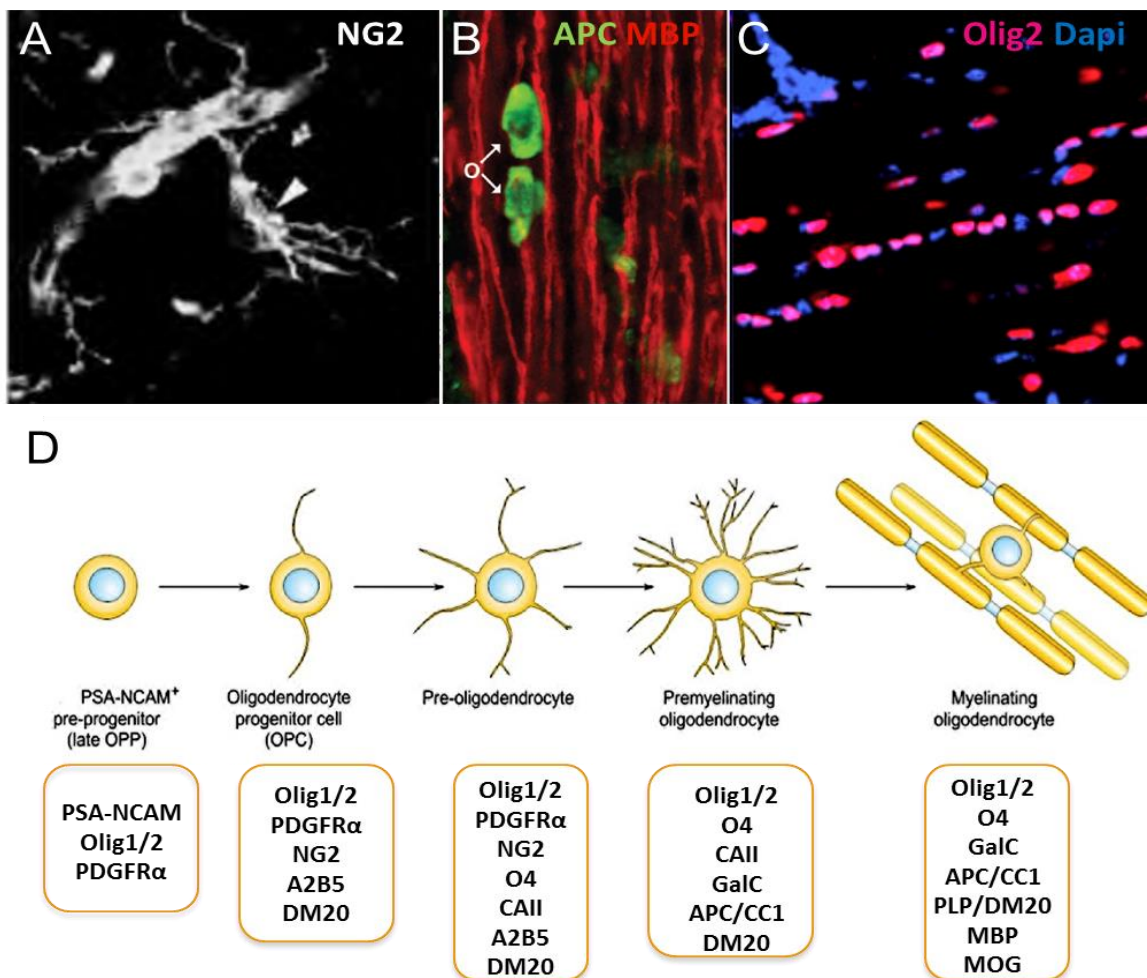


Figure 1: Stades de différenciation et de maturation des cellules du lignage oligodendrocytaire chez la souris

A-C, Immunomarquage fluorescent des OPCs NG2⁺ de la moelle épinière (A) (Kucharova and Stallcup, 2015), des OLs matures exprimant APC/CC1 et des gaines de myéline exprimant la MBP dans le nerf optique (B) (Emery, 2010), des chaînettes de cellules oligodendrocytaires exprimant le facteur de transcription Olig2 dans le corps calleux où les noyaux sont marqués par le Dapi (C) (Ming et al., 2013). (D) Représentation schématique des principaux stades de développement du lignage oligodendrocytaire ainsi que des différents marqueurs permettant de les identifier. Le marqueur Olig2 est exprimé tout du long du lignage. Les deux marqueurs NG2 et PDGFR α , sont exprimés par les OPCs. Lorsque les OPCs se différencient en OLs pré-myélinisants, ils perdent l'expression de ces deux marqueurs. Les OLs myélinisants acquièrent l'expression des protéines de myéline. Adaptée de (Ghoumari et al., 2005; Podbielska et al., 2013).

Parmi les marqueurs les plus précoces, on trouve les facteurs de transcription de la famille Olig. En absence d'Olig2, aucun OPC ne se développe (Lu et al., 2002; Zhou and Anderson, 2002). Olig1 quant à lui a été récemment montré jouer un rôle dans la différenciation des OPCs du cerveau mais pas de la moelle épinière (Dai et al., 2015). Localisé au niveau nucléaire, Olig2 est exprimé

par l'ensemble des cellules du lignage oligodendrocytaire (Figure 1C). La distribution subcellulaire d'Olig1 est intéressante puisqu'elle est nucléaire dans les OPCs et cytoplasmique dans les OLs matures (Arnett et al., 2004). Un autre marqueur précoce du lignage est le récepteur de surface « Platelet-Derived Growth Factor Receptor alpha » (PDGFR- α). Lorsqu'elle est co-exprimée avec Olig2 et la forme polysialylée de la molécule d'adhésion cellulaire neurale (PSA-NCAM) détermine un stade de précurseur du lignage oligodendrocytaire dont dérivent les OPCs. Ces derniers se caractérisent comme des cellules hautement prolifératives, mobiles et bipolaires exprimant Olig1/2, PDGFR α , l'épitope glycosylé A2B5, le chondroïtine sulfate protéoglycane « neural-glial antigen 2 » (NG2) (Figure 1A) et l'isoforme dm20 de la protéine protéolipidique (PLP) (Noble et al., 1988; Richardson et al., 2011).

Le stade de maturation suivant est celui des pré-OLs qui présentent une morphologie plus ramifiée et sont moins mobiles que les OPCs (Fok-Seang and Miller, 1994; Noble et al., 1988; Pfeiffer et al., 1993). A ce stade, deux anticorps supplémentaires sont utilisables. Le premier reconnaît le dérivé sulfaté O4 du galactocérébroside (GalC) et le second l'anhydrase carbonique II (CAII), la seule enzyme de cette famille présente dans le système nerveux et qui marque les multiples stades de transition entre les OLs immatures et les OLs matures (Baumann and Pham-Dinh, 2001). Contrairement aux OPCs, les pré-OPCs ne répondent plus au PDGF, mais au facteur de croissance des fibroblastes (FGF) qui favorise leur prolifération et maintient un état d'immaturité (Fok-Seang and Miller, 1994). Les OLs prémyélinisants qui leur succèdent perdent l'expression de PDGFR α , NG2, A2B5, mais expriment *Adenomatous polyposis coli* (APC) (Figure 1B). Au cours du développement chez la souris, APC localisé dans les corps cellulaires des OLs matures, est l'un des premiers marqueurs spécifiques indiquant le début de la différenciation d'un OPC (Fancy et al., 2014). La dernière étape de maturation aboutit à l'OL mature myélinisant. Ces cellules sortent du cycle cellulaire, deviennent post-mitotiques et sont capables d'établir des contacts avec les axones environnants et de synthétiser la gaine de myéline (Pfeiffer et al., 1993). Les marqueurs de myéline exprimés sont la protéine protéolipidique (PLP), la protéine basique de la myéline (MBP) ou la glycoprotéine oligodendrocytaire de la myéline (MOG) (Baumann and Pham-Dinh, 2001; Solly et al., 1996).

2. L'oligodendrogenèse et la myélinisation du SNC

2.1. Génération des OLs durant le développement prénatal

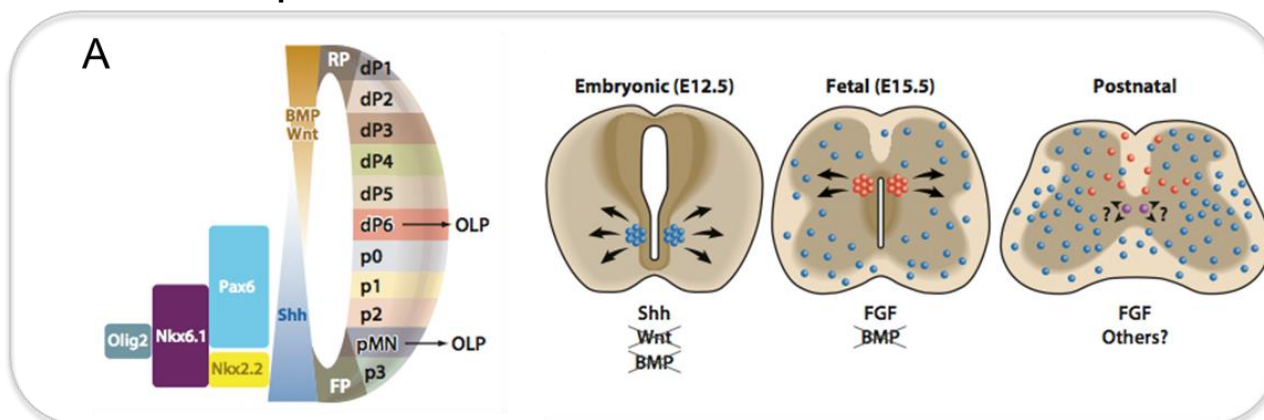
Durant le développement embryonnaire, les OPCs sont spécifiés à partir de pools de progéniteurs neuraux situés dans la zone ventriculaire du tube neural et du cerveau en développement. L'identité phénotypique des progéniteurs dépend de l'expression de combinaisons spécifiques de facteurs de transcription qui sont activés ou réprimés en fonction de leur position le long de l'axe dorso-ventral par des concentrations précises de morphogènes. Shh en position ventrale (notochorde et plaque du plancher) et BMP/Wnt en position dorsale (plaque du toit) sont les morphogènes présents le long de l'axe dorso-ventral sous forme de gradients de concentrations. Ces gradients subdivisent le tube neural en 5 domaines distincts dont le domaine pMN d'où émerge une première vague d'OPCs dépendant de la signalisation Shh à E12.5. Elle sera décrite en détail dans le chapitre 3. Une seconde vague plus dorsale émerge ensuite à E15.5 (Figure 2A). Exprimant le marqueur Pax7, elle se trouve suffisamment éloignée de la source de Shh pour suggérer qu'elle ne dépend pas de ce morphogène (Cai et al., 2005; Fogarty et al., 2005; Vallstedt et al., 2005). Dans la moelle épinière adulte, 80% des OLs dérivent de la première vague ventrale (Tripathi et al., 2011).

Dans le cerveau antérieur en développement, plusieurs vagues de production et de migration d'OPCs sont également à l'origine de l'ensemble de la population oligodendrocytaire. Chez la souris à E12.5, une première vague ventrale d'OPCs est produite dans l'éminence ganglionnaire médiane (MGE) à partir de précurseurs exprimant Nkx2.1 (Spassky et al., 2001; Tekki-Kessarlis et al., 2001). Une deuxième puis une troisième vagues d'OPCs émanent ensuite respectivement des éminences ganglionnaires latérales et caudales à E15.5, et du cortex cérébral au cours de la période périnatale. Ces deux dernières vagues dérivent respectivement de précurseurs exprimant respectivement Gsh2 et Emx1 (Figure 2B, C). De façon remarquable, la majorité des OLs générés au cours de la première vague se trouve progressivement remplacée par les OLs issus des deux dernières vagues (Kessarlis et al., 2006). La dépendance à la signalisation Shh des vagues 1 et 3 sera décrite en détail dans le chapitre 3. De façon intéressante, lorsque l'une de ces populations est détruite, les populations voisines réagissent rapidement afin de combler le manque et assurer un nombre d'OLs normal dans le cerveau mature (Kessarlis et al., 2006). Ainsi, au cours du développement, les OPCs des différentes vagues semblent être en compétition, mais fonctionnellement équivalents. A l'issue de ces trois vagues, seuls 20% des OLs localisés dans le corps calleux sont issus de la première vague alors que le reste dérive de la

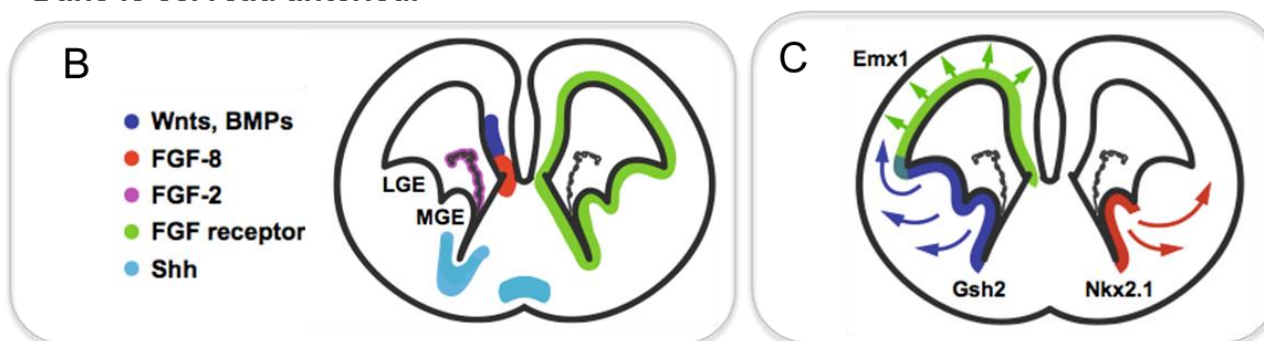
vague néo-natale. De façon intéressante, les propriétés électriques des OPCs/OLs d'origine ventrale et dorsale sont identiques (Tripathi et al., 2011).

Au cours du développement embryonnaire, les OPCs subissent une importante phase de prolifération et de migration afin de coloniser l'ensemble des régions du SNC. Ces cellules répondent aux effets prolifératifs du PDGF et FGF (Fok-Seang and Miller, 1994). Ces mêmes facteurs ainsi que le facteur de croissance des hépatocytes (HGF) sont impliqués dans le contrôle de la migration des OPCs (Armstrong et al., 1990; Milner et al., 1997; Yan and Rivkees, 2002). La sémaphorine 3A et la Nétrine-1 sont respectivement chémo-attractifs et –répulsifs sur les OPCs du nerf optique chez le rongeur (Spassky et al., 2001). Par ailleurs, l'expression du protéoglycane NG2 favorise la migration des OPCs (Niehaus et al., 1999). NG2 contrôlerait la polarité et la migration directionnelle de ces précurseurs en modulant les signalisations RhoA et Rac via des complexes de polarité (Biname et al., 2013). Une découverte récente indique que la migration des OPCs repose sur des interactions physiques entre les OPCs et les cellules de l'endothélium vasculaire. La signalisation Wnt et le récepteur Cxcr4 (chemokine receptor 4) réguleraient ces interactions qui permettent aux OPCs de se mouvoir le long des vaisseaux dans le cerveau antérieur en développement (Tsai et al., 2016).

Dans la moelle épinière



Dans le cerveau antérieur

**Figure 2: L'oligodendrogenèse dans la moelle épinière et le cerveau en développement**

(A) Dans le tube neural, les OPCs proviennent d'abord du domaine pMN ventral sous le contrôle de Shh, puis d'un domaine plus dorsal indépendamment de ce morphogène. A la naissance, les OPCs de la région ventrale se distribuent dans l'ensemble de la moelle épinière, alors que ceux issus de la région dorsale se confinent en position dorsale. Adapté de (Fancy et al., 2011a). (B) Schéma représentatif de la distribution des morphogènes et facteurs de croissance influençant l'oligodendrogenèse dans le cerveau antérieur embryonnaire d'une souris à E14.5. LGE, éminence ganglionnaire latérale ; MGE, éminence ganglionnaire médiane. (C) Modèle de l'oligodendrogenèse dans le cerveau antérieur montrant les trois vagues successives de production des OPCs qui dérivent des précurseurs neuraux Nkx2.1+ au niveau de la MGE à E12.5, Gsh2+ au niveau des éminences ganglionnaires latérale (LGE) et caudale (CGE) à E15.5, et Emx1+ dans la zone ventriculaire corticale à la naissance. Adapté de (Naruse et al., 2017).

2.2. Génération périnatale et postnatale précoce des OLs

A la période embryonnaire tardive et péri-natale, la zone ventriculaire / sous ventriculaire (V-SVZ) est une zone germinative importante qui longe les parois des ventricules latéraux, inclut des composantes dérivées de la MGE, de la LGE, du septum et du cortex et contient des cellules souches neurales (NSCs for Neural Stem Cells) (Alvarez-Buylla et al., 2008; Merkle et al., 2007). La V-SVZ représente la source majeure des OPCs nouvellement générés à ce stade du développement. Afin d'établir la période à laquelle les cellules du lignage oligodendrocytaires se séparent du pool de NSCs caractérisées par leur capacité à s'auto-renouveler, Naruse et collaborateurs utilisèrent le système Cre-Lox inducible afin de suivre les cellules appartenant respectivement au lignage des cellules souches (Nestin+) et à celui des cellules oligodendrocytaires (Olig2+). En accord avec les résultats précédents (Kessar et al., 2006), ces expériences révèlent que la ségrégation entre les OPCs corticaux et les NSCs débute juste avant E16.5 et jusqu'à P10. La limite dorso-ventrale de la V-SVZ semble être la source des OPCs corticaux (Naruse et al., 2016). Les conclusions de Tong et collaborateurs vont dans le même sens montrant qu'une région dorsale de la V-SVZ dépendant de la signalisation Shh produit un grand nombre de cellules oligodendrocytaires dans le cerveau post-natal (Tong et al., 2015). Cette dépendance à Shh sera décrite dans le chapitre 3.

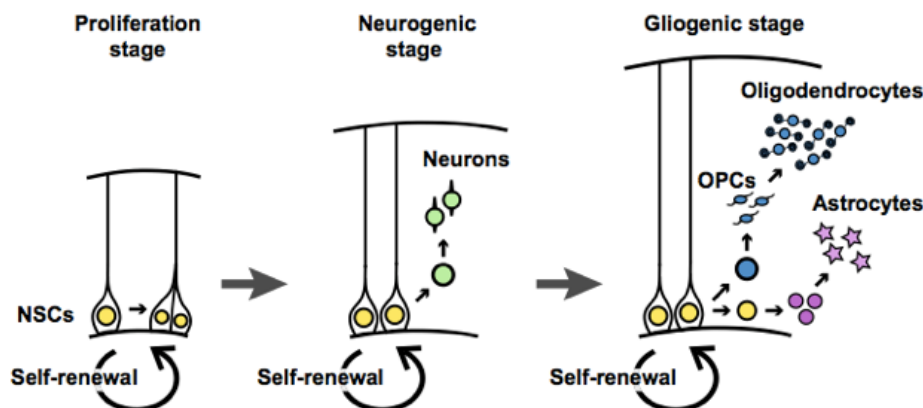


Figure 3: Prolifération et différenciation des NSCs dans le cerveau embryonnaire

Les cellules souches neurales aussi connues comme les cellules gliales radiales (jaune), produisent des neurones (vert) au milieu du stade embryonnaire, puis des oligodendrocytes (bleue) et des astrocytes (violet) durant le stade embryonnaire tardif (Naruse et al., 2017).

2.3. Génération des OLs chez l'adulte

Chez l'adulte, la SVZ continue à générer des progéniteurs neuraux qui donnent naissance en majorité à des neuroblastes migrant vers les bulbes olfactifs où ils se différencient en interneurones. Ces progéniteurs sont aussi la source d'une quantité plus restreinte d'OPCs qui migrent vers le corps calleux et le cortex (Doetsch and Alvarez-Buylla, 1996; Luskin et al., 1993; Menn et al., 2006). La SVZ se compose de divers types cellulaires identifiables par leurs caractéristiques morphologiques et les marqueurs qu'ils expriment. Les NSC adultes (NSCa) sont des cellules de type astrocytaire exprimant le marqueur GFAP (Mirzadeh et al., 2008). Multipotentes et capables de s'auto-renouveler lorsqu'elles passent de l'état quiescent à l'état activé, elles donnent naissance par un processus de division asymétrique notamment régulé par la signalisation Shh (Ferent et al., 2014) aux progéniteurs à amplification transitoire appelés TAPs. Les TAPs hautement prolifératifs expriment les marqueurs Mash1 et EGFR et forment de petits amas cellulaires. Ils sont à l'origine des neuroblastes migrants qui expriment les marqueurs PSA-NCAM et doublecortine et se dirigent vers les bulbes olfactifs, et à une petite proportion d'OPCs qui expriment Olig2 et se dirigent vers le corps calleux et le cortex (Aguirre and Gallo, 2004; Doetsch et al., 1997; Menn et al., 2006). Une analyse récente utilisant des techniques d'imagerie *in vivo* qui permet de suivre les cellules dérivées de la SVZ indique qu'une NSCa donnée génère exclusivement soit des OLs soit des neurones (Ortega et al., 2013).

La fraction des TAPs qui donne naissance à des OLs exprime le facteur de transcription Olig2 (Menn et al., 2006). Seulement 2% des cellules générées dans la SVZ adulte sont des OPCs. Ces OPCs expriment PDGFR α , prolifèrent et migrent dans les régions sous-corticales et corticales adjacentes où ils peuvent rester des progéniteurs ou se différencier en OLs myélinisants (Hack et al., 2005; Menn et al., 2006). La partie dorsale de la SVZ (bordant le corps calleux) produit une quantité plus importante d'OPCs que la partie ventrale (longeant le striatum). Par ailleurs, la SVZ rostrale produit moins d'OLs que de neurones contrairement à la SVZ caudale (Menn et al., 2006). La régionalisation de la SVZ est en particulier régulée par les signalisations Shh (Tong et al., 2015), BMP (Colak et al., 2008) et Wnt (Ortega et al., 2013).

En dehors de ces signaux contribuant à la régionalisation de la production des OPCs, d'autres facteurs interviennent pour réguler l'oligodendrogenèse à ce niveau. Ainsi, l'engagement des TAPs vers le lignage oligodendrocytaire est favorisé par l'expression des facteurs de transcription Olig2 (Maire et al., 2010), Sox10 (Pozniak et al., 2010), et Ascl1 (Nakatani et al., 2013). La surexpression du facteur de croissance épidermique (EGF) dans le ventricule latéral

induit une énorme production de cellules oligodendrocytaires capables d'envahir les aires cérébrales adjacentes (Gonzalez-Perez et al., 2009).

Comme nous l'avons précédemment mentionné, une partie des OPCs générés à la période péri- et post-natale ne se différencient pas après avoir migré dans le parenchyme où ils constituent la population des OPCs adultes représentant environ 5% de la population cellulaire totale du SNC (Dawson et al., 2003; Nishiyama et al., 2009). Ces cellules partagent un certain nombre de marqueurs avec les OPCs apparus durant le développement embryonnaire tels que NG2, PDGFR α , Olig1/2, Nkx2.1 (Dawson et al., 2003; Fancy et al., 2004; Nishiyama et al., 1996). Ils ont une morphologie très ramifiée (Berry et al., 2002), se divisent lentement, ont des capacités migratoires réduites et répondent différemment aux facteurs de croissance en comparaison de leurs homologues générés pendant le développement (Engel and Wolswijk, 1996). Une hétérogénéité caractérise cette population de cellules chez l'adulte. Leur capacité à proliférer et à se différencier est variable selon la région considérée, en particulier supérieure dans la substance blanche comparé à la substance grise (Dimou et al., 2008; Rivers et al., 2008). L'hétérogénéité porte aussi sur les réponses électrophysiologiques des OPCs. Dans le cervelet, seule la sous-population des OPCs exprimant des canaux sodiques et potassiques et capable de recevoir des afférences synaptiques peut déclencher des potentiels d'action (Karadottir et al., 2008).

Des études de traçage génétique inductible de ces cellules ont conduit à montrer que 20% des OPCs et 30% des OLs matures présents dans le corps calleux adulte sont générés après 7 semaines post-natales chez la souris, mais aussi que des événements de myélinisation existe dans le cerveau adulte et ne sont pas limités à la période de myélinisation post-natale précoce (Dawson et al., 2003; Dimou et al., 2008; Psachoulia et al., 2009; Rivers et al., 2008). Malgré un renouvellement continu associé à la différenciation des OPCs et à la mort cellulaire, ces progéniteurs demeurent uniformément distribués à travers le SNC adulte. Plusieurs mécanismes moléculaires contribuent à cette homéostasie. Ainsi, ces cellules très dynamiques surveillent leur environnement avec leurs filopodes très motiles, maintiennent un territoire autour d'elles par auto-évitement et déclenchent la prolifération et la migration des cellules voisines afin de restaurer leur densité en cas de diminution de celle-ci (Hughes and Appel, 2016). Une étude récente a mis en évidence la signalisation de la nétrine-1 dans la prolifération précoce et la restauration de la densité des OPCs qui disparaissent de la substance grise (Birey et al., 2015). Par ailleurs, des souris apprenant à courir sur une roue complexe génèrent de nouveaux OLs. Si leur production est bloquée, les animaux ne réussissent pas à surmonter la complexité de la roue, ce qui signifie que

la formation de nouveaux OLs et de nouvelles gaines de myéline facilitent l'apprentissage d'une nouvelle tâche motrice (McKenzie et al., 2014).

2.4. La myélinisation du système nerveux central

Durant l'évolution des espèces animales, la conduction rapide de l'influx nerveux a constitué un grand avantage adaptatif et a amélioré les chances de survie pour les prédateurs et les proies. La conduction de l'influx nerveux est classiquement modélisée sous la forme d'un flux d'ions à travers un cylindre creux. Dans ce modèle, deux paramètres physiques essentiels du cylindre affectent la vitesse du flux d'ions: la résistance et la capacitance. Par des modifications de l'un ou l'autre de ces paramètres, différentes stratégies d'évolution ont atteint le même objectif : augmenter la vitesse de conduction des signaux neuronaux. Chez certaines espèces, le diamètre des axones a été augmenté de façon à diminuer la résistance axonale interne, une adaptation qui a abouti aux «axones géants» chez de nombreux invertébrés. A l'inverse, chez les vertébrés, le développement de la gaine de myéline permet une conduction rapide dans les fibres de faible diamètre, la fidélité de transport du signal sur de longues distances et l'économie d'espace puisque le calibre des axones ne nécessite pas d'être augmenté (Castelfranco and Hartline, 2015). En augmentant la vitesse de conduction de l'influx, la myéline a sans doute contribué à l'expansion du cerveau des vertébrés et à l'émergence de comportements complexes. A l'inverse, la myélinisation n'est vraisemblablement pas apparue dans le but de réduire les besoins énergétiques de l'organisme puisque la synthèse de la myéline et le maintien des OLs nécessitent des quantités d'ATP supérieures à celles économisées par l'existence des axones myélinisés (Harris and Attwell, 2012). En effet, au cours du développement post-natal, la myéline synthétisée par un OL peut atteindre 5000 μm^2 par jour (Pfeiffer et al., 1993).

2.4.1. La myéline : composition et architecture

La myéline est une substance qui entoure et protège les axones en même temps qu'elle les isole électriquement. Elle est constituée d'une spirale à tours jointifs de membranes lipoprotéiques dérivées des extensions membranaires des OLs (pour revue, (Hughes and Appel, 2016; Nave and Werner, 2014; Tomassy et al., 2016). Elle accroît considérablement la vitesse de conduction de l'influx nerveux qui peut passer de moins de 1 m/s dans l'axone non myélinisé à 50-100 m/s pour un axone myélinisé d'un diamètre de 1 à 40 μm . La rapidité de conduction du signal est due à sa périodicité expliquée par l'accolement consécutif de segments membranaires ou internœuds, d'une longueur pouvant aller jusqu'à 1.7 mm dans le SNC. Chaque segment est séparé du suivant par un nœud de Ranvier, zone dépourvue de myéline et riche en canaux

sodiques voltage-dépendant (Waxman, 2006). Cette disposition particulière des segments est à l'origine de la transmission de l'influx nerveux dit « saltatoire » où le potentiel d'action saute d'un segment de myéline à l'autre plutôt que de progresser lentement le long de l'axone comme c'est le cas pour les axones non myélinisés (Roots, 2008; Zalc and Colman, 2000).

La structure et la composition moléculaire de la myéline sont uniques. Comme la plupart des membranes, la myéline est riche en lipides qui constituent 70 à 75% de son poids total sec. Cependant, elle diffère des autres membranes cellulaires par une composition lipidique rare avec un rapport molaire proche de 2: 2: 1: 1 respectivement pour le cholestérol, les phospholipides, les glycosphingolipides et les plasmalogènes (Norton and Poduslo, 1973). Tous ces lipides présentent une grande mobilité latérale et la teneur en cholestérol limite la fluidité de la membrane (Maxfield and van Meer, 2010; Rosetti et al., 2008; Yurlova et al., 2011). La myéline comporte environ 2 fois plus de cholestérol que les membranes plasmiques classiques. Le cholestérol est un composant limitant au cours du processus de myélinisation comme l'indique le phénotype des souris dont les OLs sont dépourvus de squalène synthase, une enzyme essentielle à la biosynthèse du cholestérol (Saher et al., 2011; Saher et al., 2009; Saher et al., 2005).

En dehors des lipides, la myéline du SNC contient certaines protéines spécifiques exprimées majoritairement par les OLs comme la Protéine ProtéoLipidique (PLP) et la Protéine Basique de la Myéline (MBP). L'abondance relative de ces protéines avait été initialement évaluée après séparation sur des gels de polyacrylamide et colorations classiques au bleu de Coomassie. Par cette approche, seul un nombre restreint de protéines étaient détectées ce qui a conduit à conclure que la PLP et la MBP constituaient à elles seules jusqu'à 80% des protéines totales de la myéline (pour revue (Bauman and Kasper, 2004)). Plus récemment, l'analyse de la composition en protéines de la myéline a été réalisée à l'aide de techniques plus sophistiquées faisant appel à la protéomique. Les données obtenues indiquent que la MBP, la PLP et la 2',3'-nucléotide cyclique 3'-phosphodiesterase (CNP) représentent respectivement 17, 8 et 4% de l'ensemble des protéines associées à la myéline soit un total de 35% alors que les 65% restants correspondent à des protéines nouvellement identifiées (Jahn et al., 2009).

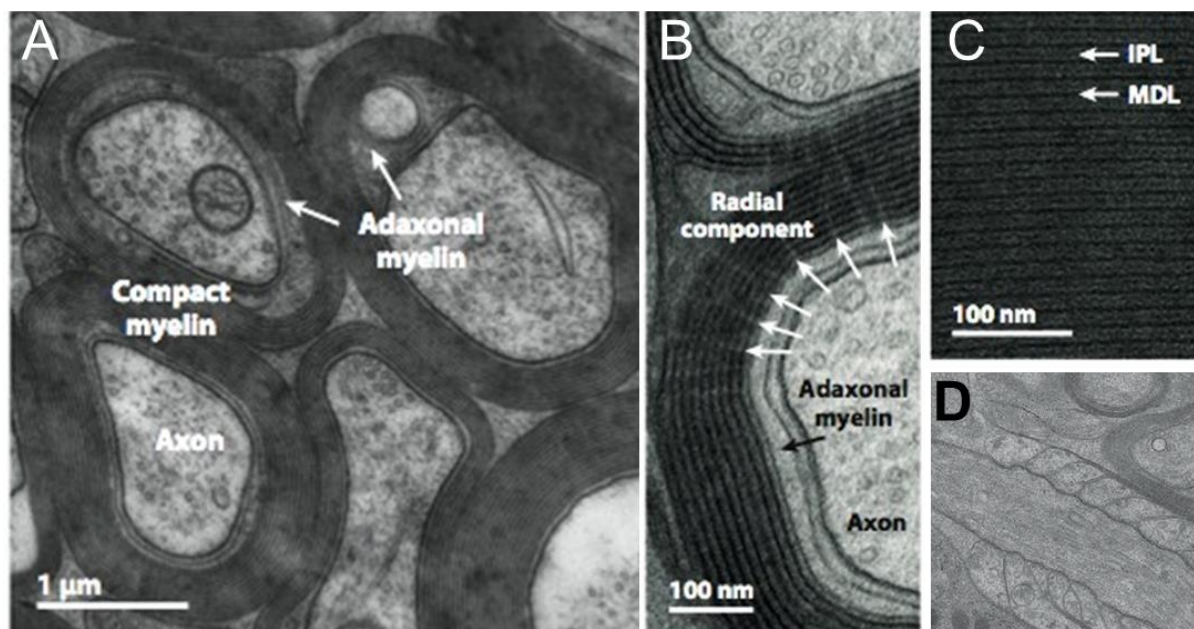


Figure 4: Structure et composition de la myéline centrale

Myéline du nerf optique visualisée en microscopie électronique. (A) Fibres axonales entourées de myéline compactée. La myéline adaxonale correspond à la zone de croissance de la myéline. (B) Les composantes radiales correspondent à des jonctions serrées qui stabilisent l'apposition des membranes dans l'internoed. (C) Dans la myéline compactée, le cytoplasme des OLs disparaît. Les feuillettes internes s'accolent et forment les lignes denses majeures (MDL : Major Dense Lines). Les feuillettes externes s'accolent aussi tout en laissant persister un espace extracellulaire constituant les lignes intrapériodiques claires (IPL : Intra Period Lines) Adaptée de (Nave and Werner, 2014). (D) Absence de myéline compacte et présence de boucles paranodales au niveau des nœuds de Ranvier. D'après (Aggarwal et al., 2011).

La PLP, une protéine transmembranaire associée au cholestérol, existe sous deux formes résultant d'un épissage alternatif. La forme la plus longue appelée PLP possède une masse molaire de 25 kDa. La forme courte appelée DM20 a une masse de 20kDa et représente 10-20% de la PLP chez l'adulte (Nave et al., 1986). Le gène codant pour la PLP localisé sur le chromosome X, possède 7 exons tandis que la partie 5' de l'exon 3 est épissée dans le cas de la DM20 ce qui conduit à une délétion de 35 acides aminés (Bizzozero et al., 1987). Tôt au cours du développement du SNC, l'ARN et la protéine DM20 précèdent ceux de la PLP qui devient l'isoforme prédominante lors de la myélinisation. Cependant d'autres données rapportent l'expression de la PLP avant celle de la DM20 ou même en l'absence de l'isoforme courte (pour revue, (Wight and Dobretsova, 2004)). La PLP est une protéine particulièrement conservée chez les mammifères. La PLP humaine et la PLP murine possèdent 100% d'homologie de séquence. La PLP est formée de

4 hélices α hydrophobes formant les domaines transmembranaires, de 2 domaines extracellulaires et de 3 domaines cytoplasmiques. Des délétions ou des mutations dans la séquence codante du gène de la PLP provoquent des anomalies de la myéline comme le syndrome de Pelizaeus-Merzbacher (Garbern, 2007).

Le gène codant pour la MBP correspond à une famille de protéines en raison de l'existence de plusieurs isoformes issues de différents épissages alternatifs. La masse moléculaire des principales isoformes est 14, 17, 18.5 et 21.5 kDa chez la souris. Le gène est localisé sur le chromosome 18 et fait partie d'une unité de transcription plus vaste, le Golli-MBP contenant 10 exons dont 7 constituent le gène de la MBP (Golli est pour 'Gene expressed in the OL lineage'). Les isoformes de 17 et 21.5 kDa qui contiennent l'exon 2, apparaissent très tôt au cours du développement chez la souris. L'isoforme 18.5 kDa prédomine dans le SNC adulte (Harauz and Boggs, 2013). Ces isoformes subissent différentes modifications post-traductionnelles incluant une acétylation N-terminale et une méthylation qui pourraient être importantes pour la compaction des membranes lors de la maturation de la myéline (Mendz et al., 1995). La MBP est la seule protéine structurale essentielle à la formation de la myéline. La souris possédant la mutation Shiverer, une mutation naturelle où une partie importante du gène de la MBP est délétée, ne possède pratiquement pas de myéline compactée dans le SNC (Readhead and Hood, 1990).

La myéline est une structure remarquablement stable et qui semble toujours très proche de son équilibre thermodynamique. De façon intéressante, lorsque les OLs sont détruits par l'expression de la toxine diphtérique via le système de recombinaison inductible Cre/LoxP, la myéline n'est pas immédiatement détruite, mais reste stable pendant plusieurs semaines (Pohl et al., 2011; Traka et al., 2010). Dans le SNC normal, la demi-vie de la myéline est de l'ordre de quelques semaines à quelques mois. De plus, la demi-vie du cholestérol que l'on retrouve dans la myéline a été évaluée à plus de huit mois (Saher and Simons, 2010).

2.4.2. Processus de myélinisation

Le mécanisme de production de la gaine de myéline a lieu de façon extrêmement stéréotypée au cours du développement. Elle progresse de façon caudo-rostrale dans le cerveau antérieur et rostro-caudale dans la moelle épinière. Chez la souris, ce processus débute à la naissance et est achevé dans la majorité des régions entre 45 et 60 jours de vie post-natale. Chez l'Homme, la myélinisation atteint un pic au cours de la première année post-natale et continue

jusqu'à l'âge de 20 ans dans quelques fibres corticales, notamment dans les aires associatives (pour revue, (Baumann and Pham-Dinh, 2001)).

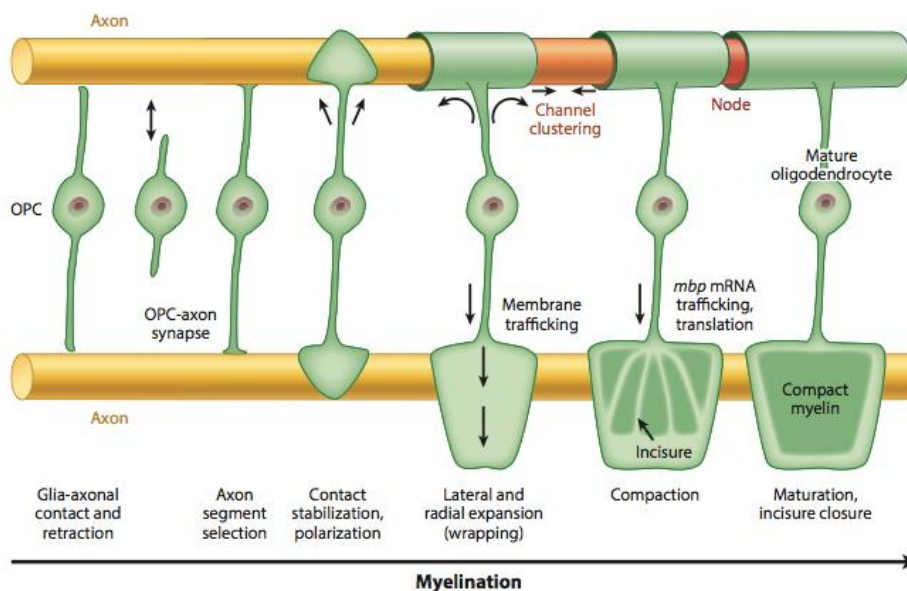


Figure 5: Représentation schématique des différentes étapes conduisant à la compaction de la myéline.

D'après (Nave and Werner, 2014)

A. Communication axone – OL

Dans des conditions normales, le processus de myélinisation est initié par un dialogue entre un OL et un ou plusieurs axones. Durant l'initiation de la myélinisation, les axones stimulés électriquement sécrètent du glutamate au niveau de leurs sites de contact avec les OPCs qui peuvent répondre via les récepteurs AMPA qu'ils n'expriment qu'au début de leur maturation (Kukley et al., 2007). Dès son premier contact avec une membrane axonale, l'extrémité du prolongement émis par l'OPC s'étend et se rétracte alternativement jusqu'à se stabiliser sur l'axone tant au cours du développement (Kirby et al., 2006) que chez l'adulte (Biname et al., 2013; Hughes et al., 2013; Young et al., 2013). L'identité des protéines d'adhésion permettant cette stabilisation reste à être déterminée. Le diamètre seuil des axones à myéliniser a été déterminé comme étant de 0.2 μm dans le SNC et 1 μm dans le SNP (Voyvodic, 1989; Waxman, 1972). Le contact OPC-axone entraîne des modifications importantes dans les OPCs. Localement, la membrane de l'OPC s'enrichit en phosphoinositides (Goebbels et al., 2012; Snaidero et al., 2014). La tyrosine kinase Fyn s'associe aux microdomaines membranaires riches en lipides (Czopka et al., 2013) et la cellule

se polarise en direction de l'axone à myéliniser (Baron and Hoekstra, 2010) par exemple via le transport de l'ARN de la MBP jusqu'au site où la protéine est requise (Muller et al., 2013). De plus, des protéines participant à la formation de lamellipodes telles que la protéine WAVE1 localisée au niveau du prolongement émis par la cellule, en particulier au niveau du site de polymérisation de l'actine, se révèlent nécessaires à la formation de la gaine de myéline dans le corps calleux et le nerf optique (Kim et al., 2006). Plus globalement, l'assemblage puis le désassemblage des filaments d'actine participent vraisemblablement à la croissance de la gaine de myéline. Celle-ci s'étend non pas en adhérant fortement à l'axone, mais en engainant l'axone à la façon d'un liquide suite au désassemblage des filaments d'actine (Nawaz et al., 2015). Le mécanisme moléculaire de ce désassemblage des filaments d'actine repose sur l'activité de la MBP qui favorise l'enroulement de l'axone en libérant des protéines appartenant à la famille de la cofiline et de la gelsoline connues pour induire le désassemblage des filaments d'actine. En effet, la MBP entre en compétition avec ces protéines sur les phosphoinositides membranaires (Zuchero et al., 2015).

B. Facteurs contrôlant la myélinisation

A côté des travaux permettant l'identification des facteurs contrôlant la spécification, la prolifération et la migration des OPCs, de multiples études ont été consacrées aux signaux exogènes affectant la dernière étape à savoir la différenciation des OPCs et la myélinisation. L'activité électrique est capable d'instruire sélectivement la myélinisation d'un circuit neural notamment dans les couches profondes du cortex pré-moteur et dans la matière blanche sous-corticale (Gibson et al., 2014). Par ailleurs, la densité spatiale des OPCs induit des contraintes biophysiques dans une niche axonale donnée qui influence la différenciation des OPCs (Rosenberg et al., 2008).

Parmi les signaux locaux qui induisent la myélinisation, on citera les facteurs de transcription Olig1 et Olig2. En dehors de son rôle majeur dans la spécification des cellules du lignage oligodendrocytaire, Olig2 contrôle également la différenciation des OPCs en recrutant le remodeleur de la chromatine Brg1 (*Brahma-related gene 1*) vers les éléments régulateurs des protéines associées à la myéline comme la MBP, et vers les gènes promoteurs de différenciation comme Sox10 [*SRY (sex determining region Y)-box 10*] et le facteur régulateur de la myéline (Myrf). La protéine Myrf est associée à la membrane exprimée par les OLs post-mitotiques. Son invalidation ne bloque pas la génération des OLs, mais leur capacité à produire les protéines constituant la myéline (Emery et al., 2009). Une étude récente montre que le facteur de transcription Olig1 est aussi nécessaire pour la production et la différenciation des OPCs dans le

cerveau mais pas dans la moelle épinière (Dai et al., 2015). Le facteur de transcription Zfp191 est requis pour induire les gènes liés à la myéline (Howng et al., 2010). Chez la souris, l'inactivation de Ying Yang 1 (YY1) se traduit par une hypomyélinisation consécutive à l'altération de la différenciation terminale des OLs. Le facteur YY1 recrute les histones déacétylases (HDAC), des enzymes responsables de la suppression de groupes acétyl sur les histones structurant l'ADN génomique. L'activité de ces enzymes détectée dans le corps calleux est importante pour la différenciation des OLs et la myélinisation (He et al., 2007). Le recrutement des HDAC1/2 aboutirait à la répression d'inhibiteurs de la maturation terminale des OLs tels que le complexe β -caténine / Tcf712. En se fixant sur le répresseur transcriptionnel Tcf712, les HDACs favorisent la différenciation des OLs (Ye et al., 2009).

D'autres voies ont aussi été impliquées dans la régulation de la myélinisation. On peut citer notamment les mécanismes dépendant de l'activité de la β - et de la γ -secrétase, qui constituent respectivement des régulateurs positifs et négatifs de la myélinisation (Hu et al., 2006; Watkins et al., 2008) ou encore la voie PI-3 Kinase/Akt/mTOR (Flores et al., 2008; Narayanan et al., 2009) et la voie des kinases régulées par des signaux extracellulaires (ERK1/2) (Jeffries et al., 2016) qui l'une et l'autre sont promyélinisantes.

Enfin, des études récentes ont mis en évidence le rôle des modifications post-transcriptionnelles régulées par des microARN, au cours du développement des OLs (Svaren, 2014). En particulier, trois microARNs (miR-219, miR-138 et miR-338) favorisent la différenciation des OLs en réprimant des facteurs positifs pour la prolifération tels que PDGFR- α et Sox6. Chez l'Homme, miR-219 et miR-338, sont enrichis dans la substance blanche et fortement exprimés dans les OLs (de Faria et al., 2012; Dugas et al., 2010).

En dehors de l'activité de la β -secrétase et de la signalisation Wnt en tant que régulateurs négatifs de la myélinisation, d'autres facteurs inhibiteurs ont été décrits bien que la plupart soient plutôt rapportés dans le cadre de la réparation de la myéline ((Harlow and Macklin, 2014) et chapitre 2). La molécule d'adhésion cellulaire PSA-NCAM présente sur les fibres nerveuses en développement doit absolument voir son expression diminuée pour que la gaine de myéline se développe (Charles et al., 2000). L'inhibition de la protéine LINGO1 (leucine-rich repeat and Ig-domain- containing 1) sur les neurones comme sur les OLs induit la différenciation des OPCs et la myélinisation quel que soit le diamètre des axones (Lee et al., 2007). Le facteur neurotrophique NGF est un puissant régulateur négatif des signaux axonaux contrôlant la myélinisation du SNC (Chan et al., 2004). Enfin, le récepteur couplé aux protéines G, GPR17, s'oppose à l'activité

positive d'Olig1 sur la maturation des OLs (Chen et al., 2009). Certains de ces facteurs interviennent également en cas de démyélinisation du SNC.

Chapitre 2. Démyélinisation et Réparation de la myéline

Les OLs et la gaine de myéline que ces cellules synthétisent jouent un rôle essentiel au fonctionnement correct des axones. En cas de démyélinisation, un processus endogène de réparation de la myéline ou remyélinisation se met en place. Cependant cette capacité de réparation a des limites et justifie la recherche de stratégies thérapeutiques destinées à favoriser la production ou la mobilisation de nouveaux OPCs et leur maturation en OLs myélinisants. Dans une première partie, je présenterai brièvement la Sclérose en plaques (SEP), la plus fréquente des pathologies inflammatoires démyélinisantes, puis les modèles animaux de démyélinisation couramment utilisés et enfin les principaux mécanismes moléculaires et cellulaires sur lesquels repose le processus de remyélinisation.

1. La sclérose en plaques

Plus de 140 ans après la description de la SEP par les neurologues français Jean-Martin Charcot et Alfred Vulpian en 1868, de nombreuses interrogations persistent. Le ou les processus responsable(s) du déclenchement et du développement de la maladie restent mystérieux. Cependant, la recherche actuelle est remarquablement dynamique dans de nombreux domaines et ouvre de réelles perspectives dans la compréhension de la maladie et le développement de nouveaux traitements.

1.1. Signes cliniques et diagnostic

La SEP tient son nom des plaques de démyélinisation observées en histologie dans le cerveau des patients (Figure 6). Les plaques peuvent s'étendre sur quelques millimètres ou quelques centimètres. Elles apparaissent par poussées. Les plaques nouvellement formées sont dites 'actives'. Les plaques où la démyélinisation est terminée sont dites chroniques ou non actives et les 'plaques fantômes' sont les plaques où une remyélinisation s'est produite. La SEP est une maladie neurologique auto-immune chronique du SNC qui se manifeste généralement entre 25 et 35 ans. Cependant, des formes juvéniles rares chez des patients de moins de 18 ans ainsi que des formes d'apparition plus tardive chez des patients de plus de 40 ans existent également. Le diagnostic est souvent long à établir car il nécessite la concordance de plusieurs

éléments : une destruction de la gaine de myéline dans différentes aires du SNC (voies optiques, moelle épinière, tronc cérébral, cervelet) et à différentes périodes de temps, des signes cliniques évalués à l'aide d'échelles précises (notamment celle des critères de McDonald, datant de 2010), des images caractéristiques obtenues par Résonance Magnétique (IRM) et l'existence de marqueurs biologiques (biomarqueurs) bien définis dans le liquide céphalo-rachidien, tels qu'un index IgG élevé et/ou la présence de 2 bandes oligoclonales non détectées dans le sérum (Brownlee et al., 2016; Derfuss, 2012; Miller et al., 2008).

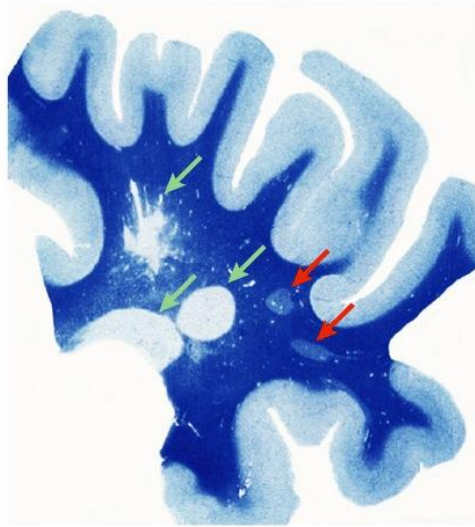


Figure 6: Coupe du cerveau antérieur d'un patient décédé de sclérose en plaques.

La coloration au bleu de Luxol (Luxol fast blue) est utilisée pour révéler les zones myélinisées dans la substance blanche. Les flèches vertes indiquent des plaques de démyélinisation. Les flèches rouges indiquent des plaques fantômes ou « shadow plaques », dans lesquelles les axones ont été remyélinisés. D'après (Franklin, 2002).

Selon la zone cérébrale touchée, le patient peut développer une multitude de symptômes très variés comportant des troubles neurologiques répétés en particulier des troubles sensitifs (fourmillements, sensations de brûlures), des troubles moteurs (fatigabilité à la marche, faiblesse des membres) ou des troubles de la vision (une perte partielle ou complète de la vision avec des douleurs oculaires).

1.2. Epidémiologie et étiologie

La SEP est la pathologie neurologique chronique la plus répandue chez les jeunes adultes. Comme pour la plupart des maladies auto-immunes, elle affecte plus souvent les

femmes que les hommes (Irizar et al., 2014). Parmi 100 000 sujets atteints en France, 75% sont des femmes qui développent la maladie classiquement 5 ans avant les hommes (Orton et al., 2006). L'espérance de vie des hommes atteints est par ailleurs réduite de 6 à 7 ans en moyenne (Leray et al., 2007). Les dernières estimations de la fondation ARSEP indiquent que 400 000 personnes sont atteintes en Europe et 2,3 millions dans le monde. L'incidence et la prévalence varient géographiquement. La prévalence est plus élevée en Europe et plus particulièrement en Europe du nord, au Canada, dans le nord des USA, la Nouvelle-Zélande et l'Australie. L'origine de ces variations pourrait être des différences ethniques. La répartition est aussi hétérogène en France où plus de cas sont répertoriés dans le Nord-est que dans le Sud-Ouest du pays. Enfin, la pathologie prédomine dans les pays les plus industrialisés (Compston and Coles, 2008).

La SEP est considérée comme une maladie multifactorielle dans laquelle des facteurs de risque génétiques et des facteurs environnementaux comme le tabac, une exposition au soleil insuffisante, l'obésité ou des facteurs infectieux interviennent (pour revue, (Ascherio and Munger, 2008)) . En faveur d'une origine génétique de la SEP, une association a été identifiée dans les années 1970 avec certains allèles du complexe majeur d'histocompatibilité HLA (Compston et al., 1976; Terasaki et al., 1977; Visscher et al., 1979). L'antigène HLA-DRB1*15 est porté par 60% des patients caucasiens atteints de SEP mais par seulement 25-30% des individus sains de la même origine ethnique (Greer, 2015). De plus, les études d'association pangénomiques ont montré l'implication d'une douzaine de gènes non-HLA parmi lesquels des gènes codant pour des récepteurs aux interleukines (Oksenberg and Baranzini, 2010).

Concernant les facteurs environnementaux, l'exposition au virus d'Epstein-Barr (EBV) est retrouvée chez une majorité des patients développant une SEP (Goodin, 2009). Par ailleurs, la carence en vitamine D également fréquente chez ces patients est cohérente avec la corrélation négative existant entre l'augmentation de la prévalence de la SEP et l'intensité des rayons UV (Fernandes de Abreu et al., 2009a; Fernandes de Abreu et al., 2009b; Handel et al., 2009)

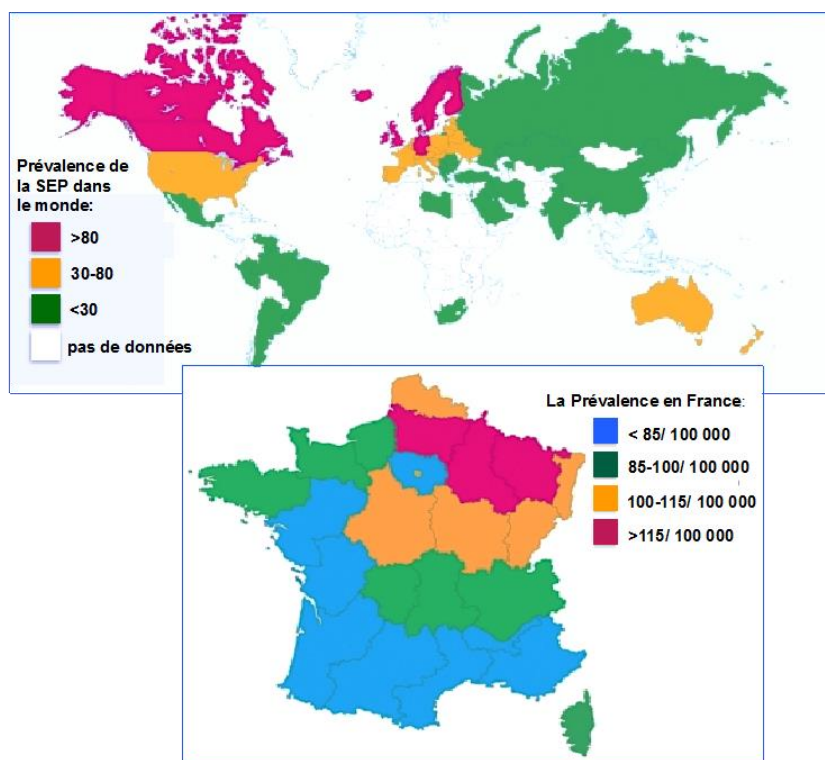


Figure 7: Prévalence de la SEP dans le monde et en particulier en France

Le nombre de sujets atteints augmente en s'éloignant de l'équateur : les populations de l'Europe du Nord sont plus atteintes que les populations asiatiques ou indiennes. En France, la SEP est plus représentée dans le Nord-Est que dans le Sud-Ouest (d'après les estimations actuelles de l'ARSEP).

1.3. Les formes évolutives de la SEP

Maladie inflammatoire et auto-immune, la SEP conduit à la destruction des OLs et de la gaine de myéline susceptible de détériorer la conduction nerveuse. La pathologie est complexe et évolutive atteignant la substance grise et la substance blanche (Calabrese et al., 2015a; Calabrese et al., 2015b; Haider et al., 2014; Prins et al., 2015; Vercellino et al., 2009a; Vercellino et al., 2009b). En général, 80% des patients diagnostiqués comme porteurs d'un «syndrome clinique isolé» avec des lésions détectables à l'IRM évoluent vers une sclérose en plaques (Brex et al., 2002). Cette maladie est caractérisée par deux phénomènes cliniques majeurs : les poussées ou réapparition de symptômes neurologiques aigus qui se terminent par une rémission partielle ou complète, et la progression qui correspond à une aggravation irréversible des symptômes d'une durée supérieure à 6 mois.

La forme dite « récurrente-rémittente » qui se développe chez environ 85% des patients se caractérise par des poussées qui durent de quelques jours à quelques mois suivies de rémissions avec disparition progressive des symptômes. Au bout de plusieurs années, les patients développent une forme dite « progressive secondaire », où les symptômes neurologiques progressent sur 3 à 6 mois sans retour à un état antérieur. La progression des handicaps est directement associée à une perte axonale précoce, diffuse, chronique et progressive. Cependant 15% des patients développent une forme « progressive primaire » qui se caractérise par une évolution lente et progressive de la maladie. Les poussées ont une amplitude modérée contrairement à la forme rémittente, bien que la maladie puisse s'aggraver par moments (Confavreux and Vukusic, 2006).

1.4. Les approches thérapeutiques de la SEP

Dans les années 1990, les immunomodulateurs tels que l'interféron- β (Avonex®, Bétaféron®, Rebif®) et l'acétate de glatiramer (Copaxone®) ont été introduits avec des résultats spectaculaires réduisant de 30% la fréquence des poussées dans les formes rémittentes de SEP. Cependant ces molécules ne montrent pas d'efficacité dans les formes progressives de la maladie. Les deux molécules atténuent l'activation des lymphocytes T, inhibent et stimulent respectivement la production des cytokines pro- et anti-inflammatoires et inhibent le passage des lymphocytes auto-réactifs du sang vers le SNC en modulant la réactivité de la barrière hémato-encéphalique.

D'autres molécules sont utilisées en seconde intention notamment un immunosuppresseur, la mitoxantrone (Eusep®) et un anticorps monoclonal, le Natalizumab (Tysabri®) dirigé contre l'intégrine $\alpha 4$ exprimée à la surface des lymphocytes activés et des monocytes. Les 2 molécules sont proposées dans les formes très actives et agressives. Leurs effets secondaires, leucémie et insuffisance cardiaque pour la première, leucoencéphalite multifocale progressive pour la seconde justifient leur utilisation en seconde intention.

Plus récemment, le fingolimod (Gylenia®) s'est révélé constituer une alternative thérapeutique en seconde intention. Cet immunosuppresseur actif par voie orale se lie aux récepteurs sphingosine 1-phosphate notamment présents sur les lymphocytes T et induit la séquestration de ces cellules dans les organes lymphoïdes (Kappos et al., 2010; Louapre et al., 2013).

Plusieurs anticorps monoclonaux permettant de réduire la prolifération des lymphocytes T et d'induire une déplétion des lymphocytes B sont aussi en cours d'études cliniques (pour revue, (Delbue et al., 2016; Dolati et al., 2016; Louapre et al., 2013)).

Tous ces traitements permettent de retarder l'évolution de la maladie, mais aucun traitement curatif n'existe pour favoriser la régénération de la myéline détruite (ou remyélinisation), un processus spontané qui pour des raisons encore mal comprises peut échouer (voir le paragraphe dédié à la remyélinisation). Seul un anticorps monoclonal dirigé contre le régulateur négatif de la myélinisation Lingo-1, développé par la société Biogen Idec (Pepinsky et al., 2011a; Pepinsky et al., 2011b) est en phase d'essai clinique. Cependant, l'amplification de la remyélinisation endogène et la greffe de cellules myélinisantes font l'objet de nombreuses recherches (pour revue, (Delbue et al., 2016; Dolati et al., 2016; Louapre et al., 2013)).

2. Modèles expérimentaux de démyélinisation

Plusieurs modèles animaux de démyélinisation sont actuellement utilisés afin d'explorer les mécanismes impliqués dans l'initiation et la progression de la maladie ainsi que pour valider de potentiels traitements favorisant la remyélinisation.

2.1. Démyélinisation induite par les toxines

Les modèles utilisant les toxines ont comme objectif de permettre de disséquer étape par étape dans le temps les différents processus impliqués dans la démyélinisation et la remyélinisation (Blakemore and Franklin, 2008). Les trois toxines principalement utilisées sont la lysolécithine (lysophosphatidylcholine ou LPC), le bromure d'éthidium et la cuprizone.

La LPC est un détergent qui induit d'une manière spécifique et rapide la phagocytose de la gaine de myéline et la formation de pores dans les OLS myélinisants. Le produit est classiquement injecté sous forme d'une solution saline à 1% dans la matière blanche de la moelle épinière ou dans le corps calleux après repérage stéréotaxique (Denic et al., 2011; Jeffery and Blakemore, 1995). Bien que le processus n'implique pas directement le système immunitaire, les sites de lésion sont souvent infiltrés par les lymphocytes T, les lymphocytes B et les macrophages, entre 6 et 12 heures après l'injection de la toxine. Cette infiltration pourrait avoir un rôle dans la forte activation de macrophages/microglie, observée au bout de 48 heures et donc sur le processus de démyélinisation (Ghasemlou et al., 2007). Toutefois, l'inflammation chronique dans ce modèle de lésions reste minimale et les lésions sont complètement réparées après environ 4 semaines.

Le traitement par la LPC est donc un modèle de démyélinisation rapidement réversible impliquant une réparation spontanée et mettant en jeu le système immunitaire. Plus l'animal est jeune, plus la remyélinisation sera efficace et rapide (Denic et al., 2011) d'où l'avantage de ce modèle dans la caractérisation des différentes phases de la remyélinisation. Ainsi, les tissus lésés peuvent être prélevés à différents temps après l'injection et analysés afin d'étudier différents aspects des mécanismes de réparation de la myéline. La prolifération et la migration des progéniteurs atteignent un maximum 5 jours suivant l'injection. Le processus se poursuit avec la différenciation et la maturation des OLs qui débute vers le jour 10 après l'injection. Enfin, la remyélinisation des axones est initiée vers le jour 15 (Blakemore and Franklin, 2008). Par ailleurs, la lysolécithine a également l'avantage d'être utilisable *ex-vivo* pour induire une démyélinisation dans des cultures organotypiques, notamment pour détruire les gaines de myéline entourant les axones des cellules de Purkinje du cervelet (Birgbauer et al., 2004; Hussain et al., 2011; Miron et al., 2010). Ce modèle *in vitro* peut servir à des études pharmacologiques plus rapides tout en réduisant le nombre d'animaux utilisés.

Le bromure d'éthidium (BET) est injecté à des concentrations de 0.01 à 0.1% par stéréotaxie dans le funicule dorsal de la moelle épinière ou dans les pédoncules cérébelleux postérieurs. Le BET est un agent intercalant de l'ADN. Il détruit les astrocytes et les OLs dans la région ciblée. Le processus de démyélinisation est plus lent (jusqu'à deux semaines) que celui observé pour la lysolécithine (Merrill, 2009). Bien que la lésion obtenue dans la moelle épinière soit souvent beaucoup plus étendue que celle induite par la LPC, la remyélinisation est aussi rapide dans les deux modèles (Blakemore and Franklin, 2008).

La cuprizone est un chélateur du cuivre administré par voie orale mélangé à raison de 0.2% à la nourriture des souris. Cette molécule cible les OLs matures qui ne parviennent plus à répondre à la demande métabolique importante pour fabriquer la myéline et meurent progressivement par apoptose (Franklin and Ffrench-Constant, 2008). Suite à ce traitement chez la souris, plusieurs structures cérébrales de la substance blanche (notamment le corps calleux et les pédoncules cérébelleux) et de la substance grise (le cortex et l'hippocampe), sont atteintes. Si la cuprizone est retirée de l'alimentation au bout de 4 à 6 semaines, une remyélinisation spontanée survient progressivement dans le corps calleux et le cortex. Si l'administration de cuprizone est maintenue pendant 12 semaines, la phase de remyélinisation à l'arrêt de l'administration est allongée (Gudi et al., 2009; Matsushima and Morell, 2001; Skripuletz et al., 2008).

2.2. Encéphalomyélite auto-immune expérimentale

L'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE) est le modèle expérimental le plus proche de la pathologie humaine. La démyélinisation est induite par une réaction immunitaire générée par l'injection sous-cutanée d'une émulsion contenant un adjuvant et des peptides de synthèse dérivés des composantes de la myéline de type MOG, MBP ou PLP (Franklin and Ffrench-Constant, 2008). L'immunisation entraîne l'activation des lymphocytes T périphériques qui en pénétrant le SNC, rencontrent les antigènes spécifiques de la myéline, et déclenchent la maladie. Ce modèle reflète à la fois l'aspect immunitaire et démyélinisant de la SEP. Il est utilisé dans plusieurs espèces allant du rongeur au primate non-humain (Baxter, 2007; Mix et al., 2008).

Ce modèle a contribué au développement de certains traitements utilisés en clinique comme la mitoxantrone, le natalizumab et l'acétate de glatiramer. Cependant, comme tout modèle animal, l'EAE possède également ses limites. Les cellules immunitaires de type CD4+, sont identifiées dans l'EAE, alors que les plus fréquemment observées dans la SEP sont de type CD8+. Par ailleurs, l'EAE ne permet pas de mimer la forme progressive primaire de la maladie (Gold et al., 2006). Un inconvénient majeur de ce modèle est la difficulté de suivre l'apparition chronologique des lésions dans le temps puisque les processus de démyélinisation et remyélinisation peuvent être concomitants à travers l'ensemble du SNC. Des variantes sont actuellement développées notamment une EAE focale qui consiste à provoquer des lésions précisément localisées en injectant par stéréotaxie un cocktail pro-inflammatoire chez un animal pré-immunisé (Chaudhary et al., 2015). Ce modèle permet de contrôler les lésions dans le temps et dans l'espace.

3. La remyélinisation

Le processus de remyélinisation spontanée consiste à régénérer de nouvelles gaines de myéline autour des axones suite à un événement démyélinisant. Ce processus de réparation permet ainsi le rétablissement de la conduction saltatoire et de l'intégrité axonale nécessaires à la récupération fonctionnelle (Duncan et al., 2009; Liebetanz and Merkler, 2006). Ce processus régénératif peut se produire spontanément dans les modèles murins de démyélinisation (Franklin and Ffrench-Constant, 2008) comme chez les patients atteints de SEP (Blakemore, 1981; Bunge et al., 1961; Hirano, 1989; Patrikios et al., 2006; Prineas and Connell, 1979). Néanmoins, chez certains patients, l'efficacité de la remyélinisation peut être très réduite pour des raisons mal

connues, ce qui conduit à une dégénérescence axonale et à la mort des neurones. Cette variabilité de la réparation n'est pas corrélée à l'âge ou au sexe des patients (Patrikios et al., 2006). Elle pourrait dépendre de certaines prédispositions génétiques, de la sévérité et de la répétition des poussées, de la localisation et de l'étendue des lésions dans le tissu nerveux. Les raisons précises restent à être déterminées. Par conséquent, comprendre les mécanismes de la remyélinisation et identifier les cellules et signaux moléculaires impliqués est nécessaire pour envisager des approches thérapeutiques permettant d'amplifier la remyélinisation spontanée.

3.1. Caractéristiques de la myéline régénérée

L'observation initiale des gaines de myéline régénérées après une lésion a d'abord indiqué des caractéristiques différentes de celles de la myéline produite au cours du développement post-natal (Ludwin and Maitland, 1984). En effet, dans la myéline régénérée, il semble n'y avoir aucune corrélation entre le diamètre de l'axone et l'épaisseur de la gaine de myéline contrairement à ce que l'on observe dans la myéline produite au cours du développement (Fancy et al., 2011a). La gaine de myéline régénérée est plus fine et elle est dotée de segments internodaux plus courts pour un diamètre d'axone donné (Blakemore, 1974) (Figure 8).

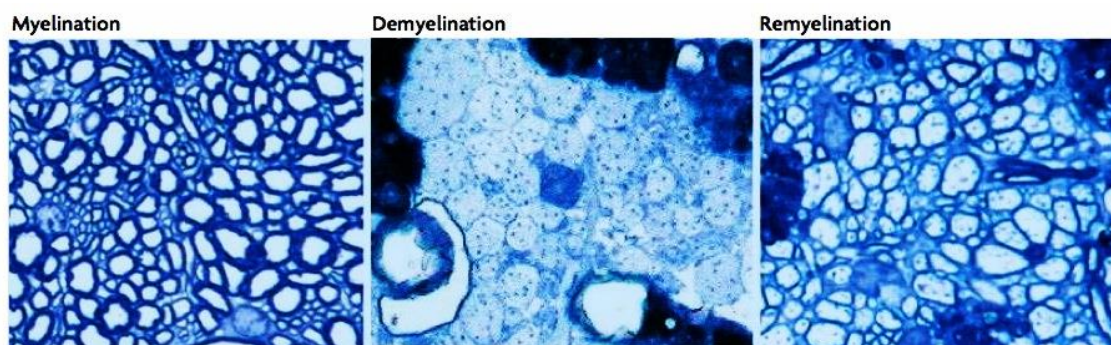


Figure 8: Architecture de la myéline après démyélinisation

Coupes transversales de la substance blanche cérébelleuse de rats adultes, montrant des axones normaux myélinisés de divers diamètres (à gauche), des axones démyélinisés après injection de bromure d'éthidium (au centre) et quatre semaines plus tard, des axones remyélinisés avec des gaines de myéline moins épaisses (à droite). D'après (Franklin and Ffrench-Constant, 2008).

Ainsi, le g-ratio des axones remyélinisés (c'est-à-dire le rapport entre le diamètre axonal et le diamètre total de la fibre incluant la myéline) semblait permettre de distinguer les axones sains des axones remyélinisés tout au moins dans le cas des axones de grand diamètre puisque sur

les axones de faible diamètre (par exemple ceux du corps calleux), la différence est beaucoup plus difficile à évaluer (Stidworthy et al., 2003). Cependant, cette hypothèse a été récemment remise en question. D'une part, des données récentes montrent que les OLs générés à l'âge adulte conduisent à des segments internodaux plus courts donc comparables à ceux que l'on observe dans la myéline régénérée (Young et al, 2013). D'autre part, plusieurs mois après une lésion, les segments de myéline régénérés ne se révèlent ni plus fins, ni plus courts que ceux de la myéline néonatale (Powers et al., 2013).

3.2. Les populations de cellules mobilisées : les progéniteurs

La remyélinisation est assurée par deux types de cellules: les OPCs du parenchyme et les OPCs dérivés des NSCs présentes dans la SVZ. Lors d'une démyélinisation, les OPCs présents dans le parenchyme à proximité de la lésion migrent rapidement vers celle-ci puis se différencient en OLs matures. Cette conclusion repose à la fois sur des expériences de transplantations cellulaires (Groves et al., 1993), sur l'observation de cellules oligodendrocytaires exprimant transitoirement des marqueurs d'OPCs et/ou d'OLs matures (Franklin and Blakemore, 1997; Levine and Reynolds, 1999) et plus récemment sur le traçage génétique des OPCs en utilisant la lignée de souris transgéniques *Pdgfra-CreERT2* (Zawadzka et al., 2010). Une observation intéressante montre qu'en réponse à une lésion focale de la moelle épinière ou du corps calleux, les OPCs dorsaux s'activent, migrent vers la lésion et se différencient d'une manière beaucoup plus importante que les OPCs ventraux, et par conséquent contribuent d'avantage à la remyélinisation. Par ailleurs, les OLs matures présents autour de la lésion ne semblent pas contribuer au processus de remyélinisation (Crawford et al., 2016).

Les OPCs dérivés de la SVZ dont nous avons précédemment mentionné l'existence en conditions physiologiques (Menn et al., 2006), ont été décrits dans le contexte de la remyélinisation à partir de la fin des années 1990 (Calza et al., 1998; Magalon et al., 2007; Nait-Oumesmar et al., 1999). La réactivité de la SVZ qui se traduit par une augmentation de la prolifération cellulaire locale est décrite chez le rongeur comme chez l'Homme (Nait-Oumesmar et al., 2008; Nait-Oumesmar et al., 2007). Elle induit une densité accrue de progéniteurs neuronaux PSA-NCAM+ co-exprimant des marqueurs du lignage oligodendrocytaire (Olig2, Sox10) dans la SVZ comme à proximité de la lésion. Une étude de traçage génétique plus récente confirme qu'après démyélinisation du corps calleux, les neuroblastes génèrent des cellules myélinisantes et participent à la réparation de la gaine (Jablonska et al., 2010). La capacité des

cellules de la SVZ à produire des OPCs est multipliée par quatre en contexte démyélinisant comparé aux conditions physiologiques (Menn et al., 2006).

Enfin, la remyélinisation du SNC peut également faire intervenir des cellules de Schwann, les cellules formant la myéline du système nerveux périphérique comme décrit dans plusieurs modèles animaux expérimentaux de démyélinisation ainsi que dans les maladies démyélinisantes humaines (Dusart et al., 1992; Felts et al., 2005; Snyder et al., 1975). Ces cellules de Schwann présentes dans les lésions du SNC dérivent comme les OLs matures des précurseurs NG2+ PDGFR α + et synthétisent de la myéline périphérique notamment constituée des protéines P0 et PMP22 (Zawadzka et al., 2010). Cette voie de différenciation des OPCs en cellules de Schwann est proposée être sous l'influence des astrocytes (Bielecki et al., 2016; Monteiro de Castro et al., 2015). De façon intéressante, une allogreffe de cellules de Schwann chez des rongeurs après induction d'une EAE augmente la survie des animaux (Zujovic et al., 2012).

3.3. Rôle de la microglie et de l'astroglie réactives

3.3.1. Implication de la microglie activée

La microglie constituée des cellules immunitaires résidentes du SNC et les macrophages d'origine périphérique jouent un rôle essentiel dans les troubles neuro-inflammatoires. Faisant partie du système immunitaire inné, cette population de cellules inflammatoires participe à la physiopathologie des maladies auto-immunes telles que la SEP (Jack et al., 2005). Les cellules microgliales et les macrophages étant difficiles à distinguer, nous les engloberons ici sous le terme de microglie. Dans des conditions pathologiques, la microglie peut être polarisée pour acquérir des phénotypes et des fonctions distinctes (Colton, 2009). On distingue la microglie activée pro-inflammatoire (de type M1) et la microglie activée anti-inflammatoire/immunorégulatrice (de type M2) (Miron et al., 2013; Psachoulia et al., 2016).

Les cellules microgliales M1 sont les premières à être mises en jeu suite à une lésion. Elles sécrètent des cytokines pro-inflammatoires dont les interleukines (IL)-1, IL-6 et le TNF α (Tumor necrosis factor alpha) (Jack et al., 2005), des dérivés réactifs à l'oxygène (ROS) ainsi que des radicaux libres favorisant la destruction des OLs et la démyélinisation (Liu et al., 2015). De plus, les cellules M1 sont des cellules présentatrices d'antigène conduisant au recrutement et

à l'activation des lymphocytes T (Jack et al., 2005). Dans le contexte de la SEP, cela conduit à une démyélinisation primaire généralisée.

Inversement, les cellules microgliales de type M2 suppriment l'inflammation en favorisant l'élimination des débris, l'angiogenèse, le remodelage des tissus et la réparation des lésions (Lassmann, 2014; Mantovani et al., 2013). Par conséquent, la microglie activée peut favoriser la remyélinisation par la phagocytose des débris de myéline qui sont connus pour inhiber la différenciation des OLs (Kotter et al., 2005; Robinson and Miller, 1999) et par la sécrétion de cytokines et de facteurs de croissance favorables à la remyélinisation (Arnett et al., 2004; Franklin, 2002; Franklin and Hinks, 1999). En accord avec ces observations, la déplétion de la microglie de type M2 conduit à un retard dans la différenciation des OLs au sein de la lésion (Miron et al., 2013) alors que l'augmentation de leur densité atténue les symptômes chez les souris EAE (Denney et al., 2012; Mikita et al., 2011).

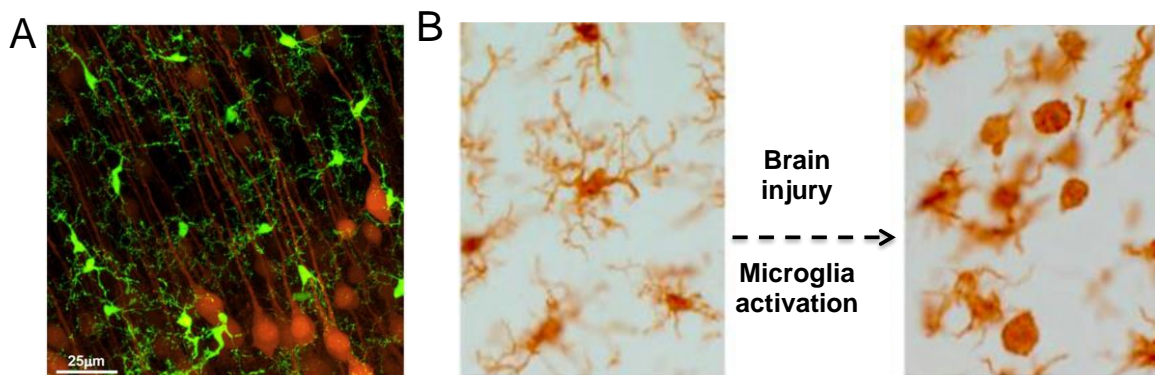


Figure 9: Les différentes morphologies de la microglie

(A) Image confocale de néocortex de souris transgénique (CX3CR1 GFP/+ :Thy1-YFP) montrant la microglie quiescente exprimant la GFP (en vert) qui s'intercale entre les dendrites des neurones pyramidaux exprimant la YFP (en jaune) (D'après (Eyo and Dailey, 2013)). (B) Après une lésion cérébrale dans le cortex de rat, la morphologie de la microglie ramifiée change rapidement. Les cellules perdent leurs extensions et deviennent amoéboïdes (Adapté de (Ziebell et al., 2015)).

3.3.2. Implication des astrocytes réactifs

En dehors de leur rôle dans le maintien de l'homéostasie du SNC, les astrocytes interviennent également dans les traumatismes du SNC en particulier dans les processus démyélinisants. En cas de lésion, ces cellules répondent rapidement. Ce phénomène de « astrogliose réactive » se caractérise par une induction de l'expression de la GFAP, un remodelage de la morphologie astrocytaire notamment une hypertrophie des prolongements

(Pekny et al., 2016) et une sécrétion abondante de cytokines pro-inflammatoires (IL6, iNOS, TNF α) et de facteurs de croissance (LIF, IGF1, PDGF α , CNTF) (Sofroniew and Vinters, 2010).

Plusieurs études soulignent les rôles directs et indirects des astrocytes réactifs dans le processus de remyélinisation. Par exemple, la forte expression de l'endothéline-1 sur les astrocytes réactifs présents dans les aires démyélinisées est un inhibiteur puissant de la remyélinisation parce qu'elle induit l'expression du ligand Jagged 1 dans les astrocytes réactifs qui à son tour active son récepteur Notch dans les OPCs (Hammond et al., 2014; Stidworthy et al., 2004; Zhang et al., 2009). A l'inverse, le fait que les OPCs endogènes mûrent en OLs myélinisants uniquement en présence d'astrocytes (Bielecki et al., 2016; Talbott et al., 2005) suggère soit l'absence de facteurs pro-myélinisants d'origine astrocytaire, soit la présence de signaux inhibiteurs prédominants dans les aires dépourvues d'astrocytes. Dans leur ensemble, ces données reflètent l'existence vraisemblable de différentes sous-populations d'astrocytes pour lesquelles des marqueurs bien spécifiques doivent maintenant être identifiés (Nash et al., 2011).

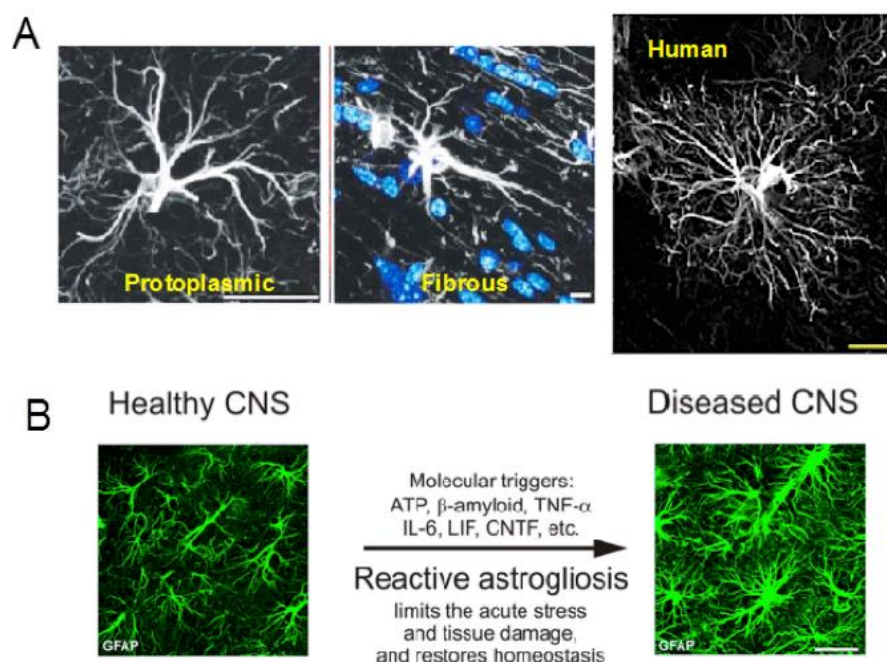


Figure 10: Les différentes morphologies des astrocytes marqués par la GFAP

(A) Astrocyte protoplasmique (à gauche) possédant une morphologie en étoile dans la substance grise et astrocyte fibreux (au centre) dans le corps calleux chez la souris. Adapté de (Sun and Jakobs, 2012). A droite, l'astrocyte GFAP+ chez l'Homme possède une morphologie plus complexe Adapté de (Oberheim et al., 2012). (B) Suite à une lésion dans le SNC, les astrocytes "activés" deviennent plus denses et hypertrophiés. D'après (Pekny et al., 2016).

Par ailleurs, les astrocytes activés peuvent agir indirectement dans la régulation de la différenciation des OPCs en affectant d'autres cellules présentes dans la lésion. Ainsi, chez les souris dépourvues du NF- κ B astrocytaire (un facteur de transcription qui altère la production de cytokines pro-inflammatoires), une réduction de l'infiltration de cellules inflammatoires et de la sécrétion de cytokines par les cellules T est observée dans la moelle épinière après induction de l'EAE (Brambilla et al., 2014). Cependant, les astrocytes réactifs contribuent aussi à l'augmentation de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique par la sécrétion de la thymidine phosphorylase (TYMP) et du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire A (VEGF-A) (Argaw et al., 2012; Chapouly et al., 2015).

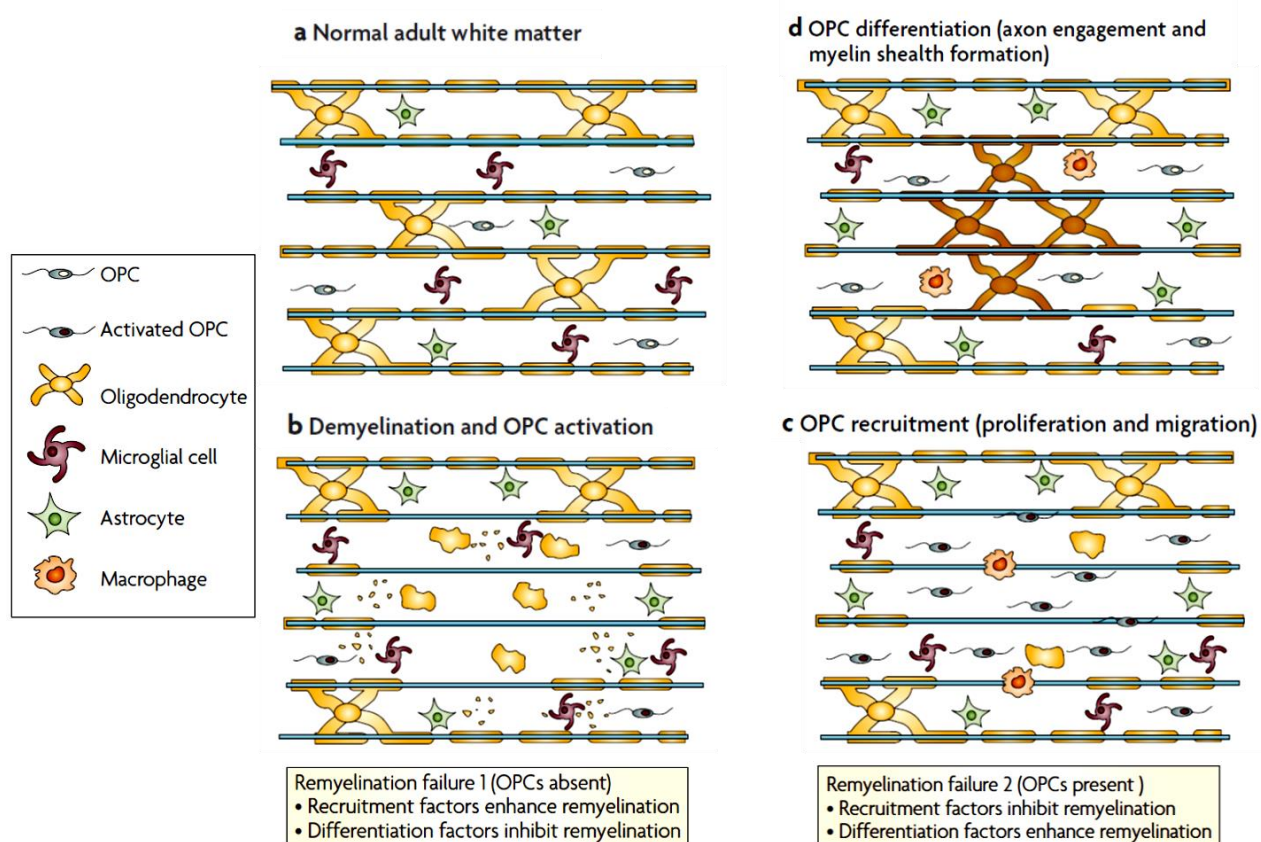


Figure 11: Les étapes et les populations cellulaires de la remyélinisation

(a) Substance blanche adulte normale. (b) Perte des OLs et destruction de la myéline suite à un évènement démyélinisant suivie de l'activation des OPCs, des astrocytes et de la microglie. (c) Phase de prolifération et migration des OPCs qui répondent aux mitogènes et aux facteurs pro-migratoires sécrétés par les astrocytes réactifs et la microglie. Les débris de myéline sont phagocytés par les macrophages. (d) Phase de différenciation des OPCs et de régénération de la myéline. D'après (Franklin and ffrench-constant, 2008).

3.4. Les différents régulateurs positifs et négatifs

Pour que la remyélinisation ait lieu, plusieurs étapes clés consécutives doivent être franchies (Figure 11). La première étape est la prolifération des OPCs et leur migration vers les régions démyélinisées. Cette étape peut être contrôlée par plusieurs facteurs parmi lesquels les facteurs de croissance PDGF et FGF, capables d'induire une prolifération rapide des OPCs (Carroll and Jennings, 1994) et les sémaphorines 3A et 3F nécessaires au recrutement des OPCs au cœur de la lésion (Piaton et al., 2011; Williams et al., 2007).

L'étape suivante consiste en la différenciation des OPCs en OLs remyélinisants. Cette étape comporte elle-même trois phases : i) l'établissement du contact avec l'axone destiné à être remyélinisé, ii) l'expression des gènes spécifiques de la myéline et la synthèse de la myéline, iii) l'enroulement et la compaction de la myéline pour former une gaine (pour revue, ((Fancy et al., 2011a; Franklin and Ffrench-Constant, 2008)). Par exemple, le facteur de transcription Olig1 qui possède un rôle primordial dans le développement précoce des OPCs, s'est avéré nécessaire à la maturation des OLs dans le cadre de la remyélinisation. En effet, les animaux Olig1 KO présentent une absence quasi totale de régénération de la myéline, malgré un nombre suffisant d'OPCs recrutés dans les lésions causées par l'intoxication à la cuprizone ou la LPC (Arnett et al., 2004).

C'est l'étape de différenciation des OPCs et de régénération de la myéline qui semble être la plus sensible dans ce processus et faire défaut dans les pathologies de la myéline (Kuhlmann et al., 2008), d'où la nécessité d'identifier les multiples facteurs qui contrôlent ces étapes afin de pouvoir à terme intervenir pour corriger une défaillance dans ce processus. Le tableau 1 présente une vue d'ensemble des principaux régulateurs extrinsèques et intrinsèques mis en jeu dans le processus de réparation en dehors des facteurs liés à l'âge ou à l'environnement puisque la jeunesse et des conditions environnementales propices à l'exercice physique et à l'enrichissement intellectuel constituent des facteurs positifs pour la remyélinisation (Magalon et al., 2007; Sim et al., 2002).

Tableau 1: Principaux facteurs impliqués dans le processus de remyélinisation.

Facteurs	Effets sur les oligodendrocytes et la régénération	Voie / mode d'administration chez l'animal	Références
Facteurs de croissance- neurotrophiques			
PDGF	Favorise la prolifération des OPCs et augmente la remyélinisation		(Fruttiger et al., 1999; Mason et al., 2003; Murtie et al., 2005; Woodruff et al., 2004)
FGF2	Induit le recrutement des OPCs vers la lésion / inhibe la différenciation		(Armstrong et al., 2000; Messersmith et al., 2000; Zhou et al., 2012)
EGF	Induit la migration et la prolifération des OPCs et augmente la remyélinisation	Infusion dans le ventricule latéral ou administration intranasale du HB-EGF induisent le recrutement des OPCs de la SVZ vers les lésions démyélinisées.	(Aguirre and Gallo, 2007; Cantarella et al., 2008; Gonzalez-Perez et al., 2009)
BDNF	Régule le nombre d'OPCs et induit leur différenciation; stimule l'expression des protéines de la myéline		(VonDran et al., 2011)
NT-3	Induit la prolifération des OPCs et augmente la survie des OLS matures	Injection directe dans le corps calleux induit l'oligodendrogenèse et la remyélinisation dans un modèle LPC	(Cohen et al., 1996; Jean et al., 2003)
IGF-1	Favorise la prolifération des OPCs et augmente la remyélinisation	Transfert adénoviral d'IGF-1 échoue à induire la remyélinisation	(Mason et al., 2000; Mason et al., 2003; Yao et al., 1995)
Cytokines			
TNFα	Régule négativement le nombre et la différenciation des OPCs		(Arnett et al., 2001; Cammer and Zhang, 1999)
CXCL12	Induit la prolifération, la migration et la maturation des OLS		(Patel et al., 2010)
IL-1β	Accélère la différenciation des OLS		(Mason et al., 2001a)
LIF	Favorise la prolifération, la maturation des OPCs et augmente la réparation de la myéline	Dans un modèle LPC, le ciblage des progéniteurs NG2+ par des nanoparticules délivrant le LIF augmente le nombre d'axones myélinisés et l'épaisseur de la myéline.	(Deverman and Patterson, 2012; Marriott et al., 2008; Rittchen et al., 2015)
IL-4I-I	Diminue l'inflammation et augmente le nombre des OLS matures		(Psachoulia et al., 2016)
Endothéline 2	Augmente la remyélinisation en favorisant la formation de la gaine de myéline		(Yuen et al., 2013)
CNTF	Favorise la prolifération et la migration des OPCs de la SVZ et induit leur maturation		(Tanaka et al., 2013; Vernerey et al., 2013)
Hormones			
T3 (triiodothyronine)	Favorise la maturation des OPCs et induit l'expression de la MBP et de la PLP dans les OLS matures	Dans le modèle cuprizone, l'injection systémique de T3 chez les rats augmente le ratio OLS matures/OPCs; Dans le modèle EAE, le traitement par la T3 favorise la formation de la gaine de myéline, la protection axonale et augmente la conduction nerveuse	(Bogazzi et al., 1994; Dell'Acqua et al., 2012; Franco et al., 2008; Harsan et al., 2008)
Progestérone/PR	Favorise la prolifération et la migration des OPCs	Le traitement par la progestérone ou la nésotorone augmente la remyélinisation des axones dans des tranches de cervelet démyélinisées par la LPC et dans des lésions chroniques du corps calleux et du cortex cérébral	(El-Etr et al., 2015; Hussain et al., 2011; Schumacher et al., 2012)
Téostostérone/AR	Favorise le recrutement des astrocytes favorable à la prolifération et la différenciation des OLS	Le traitement à la testostérone stimule la régénération de la myéline dans un modèle de démyélinisation chronique sévère chez la souris	(Bielecki et al., 2016; Hussain et al., 2013)

Facteurs	Effets sur les oligodendrocytes et la régénération	"Voie / mode d'administration chez l'animal"	Références
Facteurs de transcription			
Olig1	Crucial pour la différenciation des OLS et la réparation de la myéline		(Arnett et al., 2004)
Myt1	Module la prolifération des OPCs et régule leur différenciation		(Nielsen et al., 2004; Vana et al., 2007)
Sox17	Induit la différenciation des OPCs et la survie des OLS		(Ming et al., 2013)
Olig2	Augmente la différenciation des OPCs et la remyélinisation	La surexpression inductible d'Olig2 chez les souris TetOlig2:Sox10 (rtTA/+) favorise la réparation des lésions induite par la LPC	(Wegener et al., 2015)
RXR-γ	Favorise la maturation des OLS	L'administration de l'acide rétinoïque 9-cis, sur des tranches de cervelet démyélinisées permet d'accélérer la remyélinisation axonale; Le traitement EA peut activer la signalisation RXR favorisant la différenciation des OPC en OL dans des lésions de la moelle épinière.	(Huang et al., 2011; Yang et al., 2016)
Autres voies de signalisation			
Notch	Retarde la maturation des OPCs et la remyélinisation		(Hammond et al., 2014; Zhang et al., 2009)
Wnt /β-caténine	Inhibe la différenciation des OPCs et la remyélinisation	La petite molécule XAV-939 qui stabilise le niveau de l'Axine 2 inhibitrice de la β-caténine, favorise la différenciation des OLS et accélère la remyélinisation	(Fancy et al., 2011a; Fancy et al., 2009; Fancy et al., 2011b)
Shh	Induit la prolifération et la différenciation des OLS; diminue l'astrogliose et la microgliose réactives	La surexpression adénovirale de Shh diminue la taille de la lésion et augmente le nombre d'oligodendrocytes	(Ferent et al., 2013)
BMP	Inhibe la remyélinisation et empêche la récupération	L'infusion de l'antagoniste des BMP Noggin dans les lésions augmente la densité des OLS matures dans le corps calleux. Son antagoniste Chordine induit l'oligodendrogenèse dérivée de la SVZ.	(Ara et al., 2008; Bae et al., 2009; Fuller et al., 2007; Jablonska et al., 2010; Sabo et al., 2011)
Autres régulateurs			
Nétrine-1	Stimule la migration des OPCs de la SVZ et du nerf optique		(Cayre et al., 2013; Spassky et al., 2002)S
Gas6	Stimule la génération des OLS et augmente la production de la myéline		(Goudarzi et al., 2016)
LINGO-1	Inhibe la différenciation des OPCs et la remyélinisation	Anti-LINGO1 accélère la remyélinisation et la conduction axonale	(Mi et al., 2008; Mi et al., 2007; Mi et al., 2009; Pepinsky et al., 2011a)
Gal-3 (Galectine-3)	Nécessaire pour l'enrobage de la myéline et le maintien des axones		(Hoyos et al., 2016)
HDAC	Inhibe l'activation des gènes de la myéline et la remyélinisation		(Shen et al., 2008)

Facteurs positifs à la remyélinisation / facteurs négatifs à la remyélinisation

Chapitre 3. La voie Sonic Hedgehog et son implication dans la régulation du système nerveux central

Parmi les nombreuses voies de signalisation fondamentales identifiées depuis la drosophile jusqu'à l'humain, la voie Hedgehog (Hh) est connue pour réguler la prolifération, la croissance et la mise en place de la plupart des tissus, y compris le système nerveux. Une activation aberrante ou une insuffisance d'activité de cette voie sont respectivement à l'origine de cancers et d'anomalies du développement. Ce chapitre récapitule les connaissances actuelles sur la signalisation Hh dans le système nerveux central (SNC), en particulier celles concernant les mécanismes d'action canoniques et non canoniques associés à cette voie, le contrôle Hh-dépendant de la genèse et du maintien du lignage oligodendrocytaire et son implication dans les pathologies du SNC, notamment les pathologies démyélinisantes.

1. Les protéines Hedgehog : identification, biogenèse, sécrétion et transport

Les protéines de la voie Hedgehog (Hh) sont des protéines sécrétées appartenant à la famille des morphogènes. Ces molécules contrôlent le développement et l'homéostasie tissulaire et participent à la spécification de différents types cellulaires en fonction de leur concentration dans l'environnement. Le gène Hh a été identifié pour la première fois en 1980, dans un criblage génétique réalisé chez la drosophile par Christian Nüsslein-Volhard et Eric Wieschaus (Nusslein-Volhard and Wieschaus, 1980). Ils reçurent le Prix Nobel de Médecine en 1995 pour leur découverte des gènes de polarité segmentaire de l'embryon de drosophile parmi lesquels le gène Hh. La perte de fonction de la protéine Hh conduit à l'apparition de denticules recouvrant la majorité du corps de l'animal et lui donnant l'aspect d'un hérisson, d'où l'origine du nom 'Hedgehog'.

Des gènes orthologues de la famille Hh ont ensuite été identifiés dans plusieurs espèces telles que, le poisson zèbre (Krauss et al., 1993; Roelink et al., 1994), le poulet (Riddle et al., 1993), la souris (Echelard et al., 1993), le xénope (Ekker et al., 1995) et l'Homme (Marigo et al., 1995) (Figure 12). Chez les vertébrés, Sonic hedgehog (Shh), Indien hedgehog (Ihh) et Desert hedgehog (Dhh) forment une famille de protéines sécrétées jouant un rôle clé dans la mise en

place des tissus embryonnaires. Shh est en particulier impliqué dans le développement du SNC. Dhh et Ihh sont notamment reconnus pour leur activité respective au cours du développement du tissu nerveux périphérique et du tissu osseux. Bien qu'il s'agisse de trois gènes différents, les protéines correspondantes partagent des mécanismes de synthèse, de sécrétion et de transport similaires (Gallet, 2011).

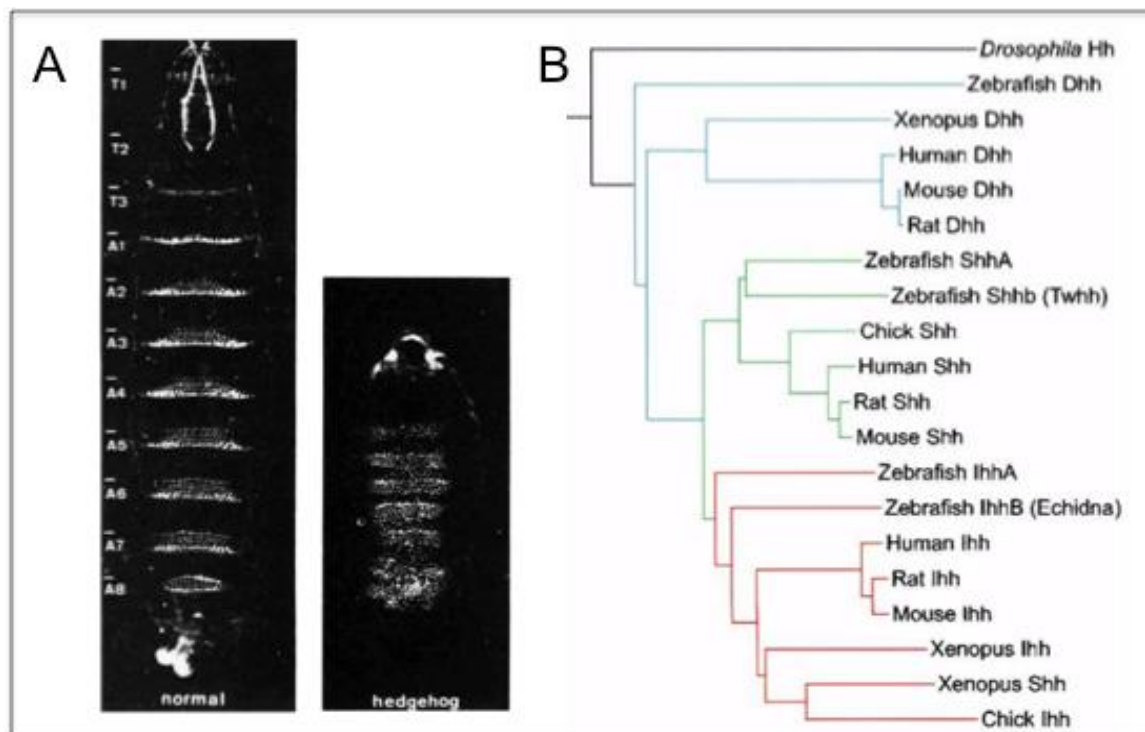


Figure 12: La famille Hedgehog

(A) Illustration du mutant Hedgehog (à droite) comparé à une larve de drosophile normale (à gauche). Chez le mutant, on observe une taille globalement réduite et le rapprochement des différents segments constituant le corps de la mouche. D'après (Nusslein-Volhard and Wieschaus, 1980). (B) Phylogramme illustrant l'évolution des protéines Hh. Les différentes protéines ont été alignées en utilisant le logiciel PRANKSTER. Les sous-familles Hh sont indiquées par un code couleur : Dhh (bleu), Shh (vert) et Ihh (rouge) D'après (Varjosalo and Taipale, 2008).

1.1. Synthèse et maturation

Les protéines Hh sont d'abord synthétisées sous la forme d'une protéine-précurseur de 45 kDa qui subit de multiples modifications post-traductionnelles dans le réticulum endoplasmique avant d'être sécrétée hors de la cellule, via des mécanismes conservés au cours de l'évolution des espèces (pour revue, (Varjosalo and Taipale, 2008)) (Figure 13). Ces modifications impliquent un premier clivage de l'extrémité N-terminale du précurseur

correspondant à la séquence signal, et un deuxième clivage auto-protéolytique de la partie C-terminale qui possède des caractéristiques d'intéines. Ces clivages génèrent un peptide C-terminal (Hh-C ou Shh-C) et un peptide N-terminal biologiquement actif (Hh-N ou Shh-N) respectivement de 25 et 20 kDa. L'autoprotéolyse du précurseur s'accompagne de l'addition covalente d'un groupement cholestérol sur l'extrémité N-terminale du peptide amino-terminal (Porter et al., 1996). Enfin, sur la cystéine du peptide amino-terminal (exposée après clivage du peptide signal, un acide palmitique est ajouté par l'acyltransférase, Skn (Chen et al., 2004) ou Hhat (Buglino and Resh, 2008) chez les vertébrés, et Ski chez la drosophile (Chamoun et al., 2001).

Ces deux modifications lipidiques sont essentielles à l'activité de la signalisation Hh. L'addition du cholestérol est considérée comme une modification post-traductionnelle rare. Elle augmente la lipophilie des protéines Hh, favorise leur ancrage dans la membrane plasmique et limite par conséquent un relargage inapproprié de la protéine (Chen et al., 2004). Mais de façon inattendue, cette modification semble également avoir un rôle important dans le transport à longue distance des protéines Hh actives en participant notamment à la constitution du gradient de concentrations caractéristique des morphogènes. En accord avec cette hypothèse, la mutation du site de liaison du cholestérol accroît l'étendue du gradient tout en réduisant l'activité de la protéine (pour revue, (Briscoe and Therond, 2013)).

Cependant des données plus récentes rapportent qu'une forme non modifiée par le cholestérol peut aussi être libérée par de nombreuses cellules chez les mammifères comme chez la drosophile. Les deux formes semblent avoir des rôles complémentaires sur l'activité de la signalisation Hh, ce qui laisse penser que la quantité absolue de protéines Hh, mais aussi les proportions relatives des différentes formes participent de manière complexe à l'activité de la voie grâce à la création de gradients plus complexes que ce que l'on imaginait initialement (Palm et al., 2013).

L'addition de l'acide palmitique confère quant à elle aux protéines Hh une activité 40 à 160 fois plus élevée que celle de la forme non palmitoylée (Buglino and Resh, 2008). L'inhibition de Hhat par l'inhibiteur RU-SKI 43, conduit à l'inhibition de la signalisation Hh indiquant le rôle critique de l'enzyme et de la palmitoylation qu'elle induit (Rimkus et al., 2016).

1.2. Sécrétion et transport

La libération des différentes formes des protéines Hh par les cellules qui les synthétisent a fait l'objet de multiples études (pour revue, (Eaton, 2008)). La forte hydrophobicité des protéines

Hh modifiées par les lipides (Hh-Np) a conduit à émettre plusieurs hypothèses pour expliquer leur relargage dans le milieu extracellulaire notamment leur interaction avec différentes protéines telles que la protéine à 12 segments transmembranaires Dispatched (Disp) ou des composantes de la matrice extracellulaire comme les héparanes sulfates protéoglycanes (HSPGs) (pour revue, (Briscoe and Therond, 2013)) (Figure 13).

Disp s'apparente à la famille des transporteurs de type RND (Résistance Nodulation Division) et possède un domaine sensible aux stéroïdes. Disp et la protéine sécrétée Scub2 interagissent avec différentes régions de la molécule de cholestérol pour libérer Hh-Np et permettre son activité à longue distance (Tukachinsky et al., 2012). Plus récemment, D'Angelo et collaborateurs ont montré que Disp permet en plus l'internalisation de Hh-Np puis son recyclage par un mécanisme dépendant des protéines Rab, un processus nécessaire pour promouvoir l'activité à longue distance des protéines Hh (D'Angelo et al., 2015).

Les HSPGs sont quant à eux attachés à la membrane plasmique des cellules par une ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI). Ils supportent la formation de multimères / oligomères de Hh-Np (pour revue, Varjosalo and Taipale, 2008 ; Briscoe and Therond, 2013). Les complexes HSPGs / Hh-Np peuvent recruter la lipoprotéine lipophorine permettant l'assemblage des multimères en particules lipoprotéiques qui sont ensuite libérées de la membrane plasmique par Notum, une enzyme proche des phospholipases C. Par ailleurs, les multimères assemblés à la surface de la cellule productrice peuvent être internalisés, puis conditionnés dans des vésicules intraluminales qui après fusion avec la membrane plasmique sont libérées sous forme d'exovésicules ou exosomes. Alternativement si des sheddases, des enzymes de la famille ADAM qui conduisent à l'élimination des groupements cholestérol et palmitate sur les protéines Hh-Np, sont présentes à la surface de la cellule productrice, les protéines Hh sont libérées sous forme de multimères non associés à des lipides (Jakobs et al., 2016; Jakobs et al., 2014; Parchure et al., 2015).

Enfin, un autre mécanisme de communication a été également rapporté entre les cellules produisant et les cellules répondant au ligand Hh au niveau des bourgeons des membres chez le poulet. Ce mécanisme repose sur l'émission d'extensions (ou filopodes) contenant soit le ligand Hh dans le cas des cellules émettant le signal soit ses récepteurs (en particulier Cdo et Boc) dans le cas des cellules recevant le signal (Sanders et al., 2013). De nombreuses questions demeurent notamment sur l'existence d'un tel mécanisme dans d'autres types cellulaires et la nature du moteur moléculaire permettant le transport des protéines Hh le long de ces filopodes.

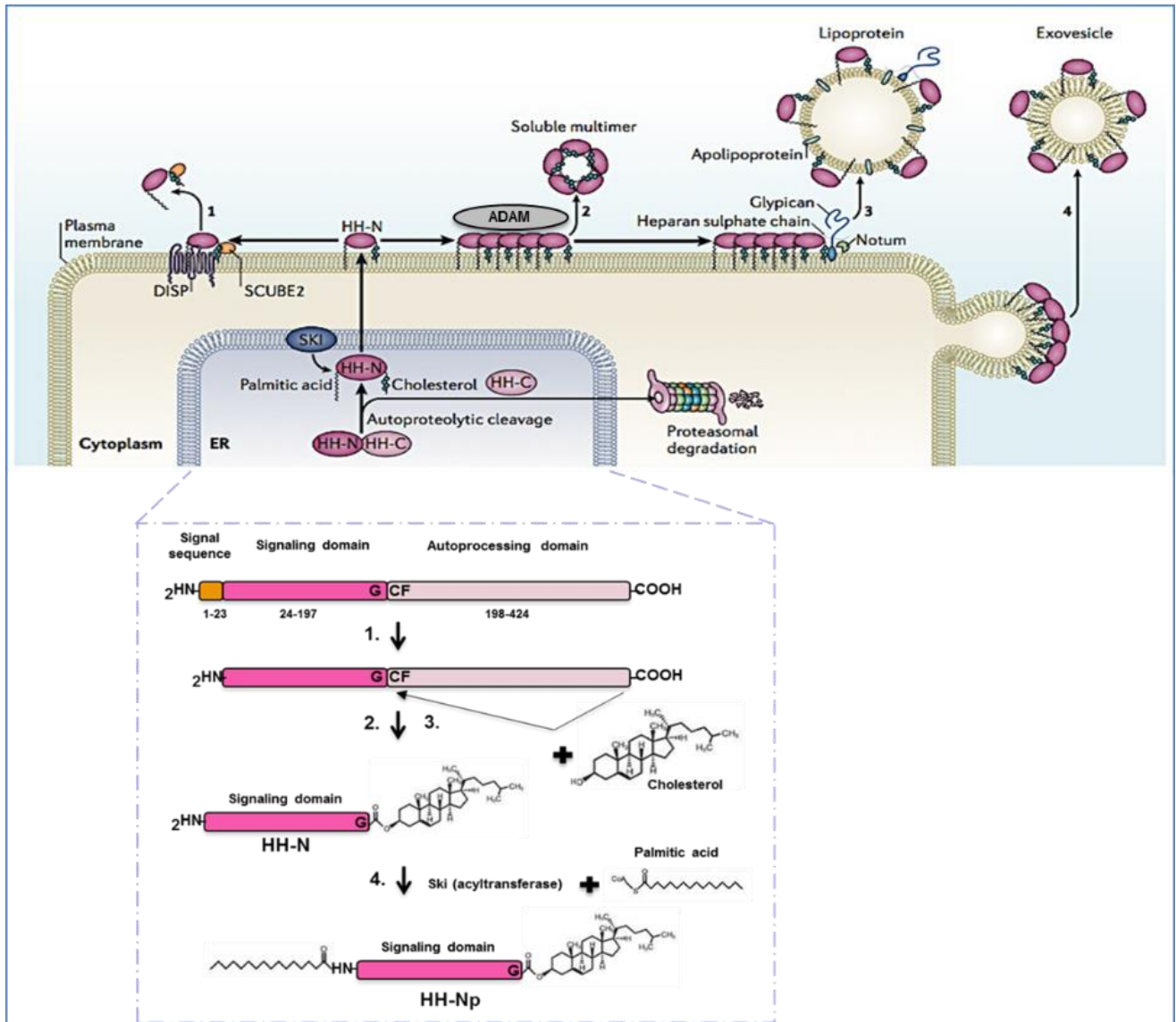


Figure 13: Biogenèse et sécrétion de la protéine Hedgehog

Les protéines Hedgehog sont synthétisées sous forme d'un précurseur de 45 kDa. Elles subissent plusieurs modifications post-traductionnelles dans le réticulum endoplasmique (ER). Ces modifications sont montrées plus en détail dans l'encart situé en bas de la figure. La séquence signal est clivée (1), le domaine autocatalytique (HH-C) induit la protéolyse du précurseur libérant le segment N-terminal HH-N (2) et participe à l'addition d'une molécule de cholestérol à son extrémité C-terminale avant d'être dégradé par le protéasome (3). L'acyltransférase Skinny (SKI) hedgehog ajoute un acide palmitique en N-terminal de HH-N (4) conduisant à la forme finale (HH-Np). Adaptée de (Varjosalo and Taipale, 2008). Une fois à la surface externe de la cellule, HH-Np est associé à la bicouche lipidique de la membrane plasmique. Sa libération peut se faire par l'un des mécanismes suivants: (1) sécrétion du monomère sous l'action coopérative de DISP et SCUBE2, (2) association de plusieurs monomères en multimères qui se libèrent de la membrane en présence de sheddases. (3) recrutement d'apolipoprotéines via les chaînes héparane sulfates des glypicans permettant aux multimères de s'assembler en particules lipoprotéiques. (4) libération à la surface d'exovésicules. Adaptée de (Briscoe and Théron, 2013).

2. Transduction du signal Sonic Hedgehog

2.1. La voie canonique

Le modèle classique de transduction du signal Hh est décrit chez les vertébrés au niveau du cil primaire, une organelle présente à la surface de la plupart des cellules de vertébrés et constituant le site de rassemblement des différentes composantes de certaines voies de signalisation (Szymanska and Johnson, 2012). Ce modèle implique un complexe de récepteurs comprenant d'une part le principal récepteur des protéines Hh, Patched (Ptc), une protéine à 12 domaines transmembranaires possédant comme précédemment décrit pour Disp, un domaine sensible aux stérols, et d'autre part l'un des co-récepteurs du ligand, à savoir les protéines de surface cellulaire de la famille des immunoglobulines / fibronectines comme Cdon/Ihog et Boc/Boi (chez vertébrés/drosophile), ou la glycoprotéine à ancre GPI, Gas-1 (chez les vertébrés) (Izzi et al., 2011). La glycoprotéine Hip (Hedgehog interacting protein) quant à elle est un récepteur des protéines Hh, mais a été caractérisée comme un antagoniste physiologique de ces protéines chez les vertébrés (Chuang et al., 2003).

En absence de Shh, Ptc exerce une activité répressive sur Smoothened (Smo), protéine à 7 domaines transmembranaires qui appartient à la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G, en particulier à la sous-famille des récepteurs Frizzled (Schulte, 2010). La liaison de Shh sur ses récepteurs, lève l'inhibition exercée par Ptc sur Smo, ce qui déclenche une cascade de signalisation intracellulaire complexe aboutissant à l'activation des facteurs de transcription de la famille Gli chez les vertébrés, permettant ainsi la transcription des gènes cibles de la voie entre autres Ptc et Gli1 (pour revue, (Briscoe and Therond, 2013; Robbins et al., 2012)).

La transcription de Gli1 reflète le niveau d'activation de la voie Hh tandis que les autres membres de la famille, Gli2 et Gli3, fonctionnent respectivement comme activateur (GliA) et répresseur (GliR) transcriptionnels (Sasaki et al., 1999). En l'absence de ligand Hh, Gli1 existe sous forme de complexe avec la protéine Suppressor of fused (Sufu) qui l'empêche d'entrer dans le noyau. Quant à Gli2 et Gli3, elles sont phosphorylées et adressées au protéasome où elles sont alternativement dégradées (Gli2) ou clivées pour générer un fragment N-terminal doté d'une activité répressive (Gli3). En présence de Hh, Gli2 et Gli3 ne sont pas clivées. La forme longue de Gli2 est un activateur transcriptionnel, tandis que celle de Gli3 théoriquement activatrice, est rapidement dégradée (pour revue, (Robbins et al., 2012)) (Figure14).

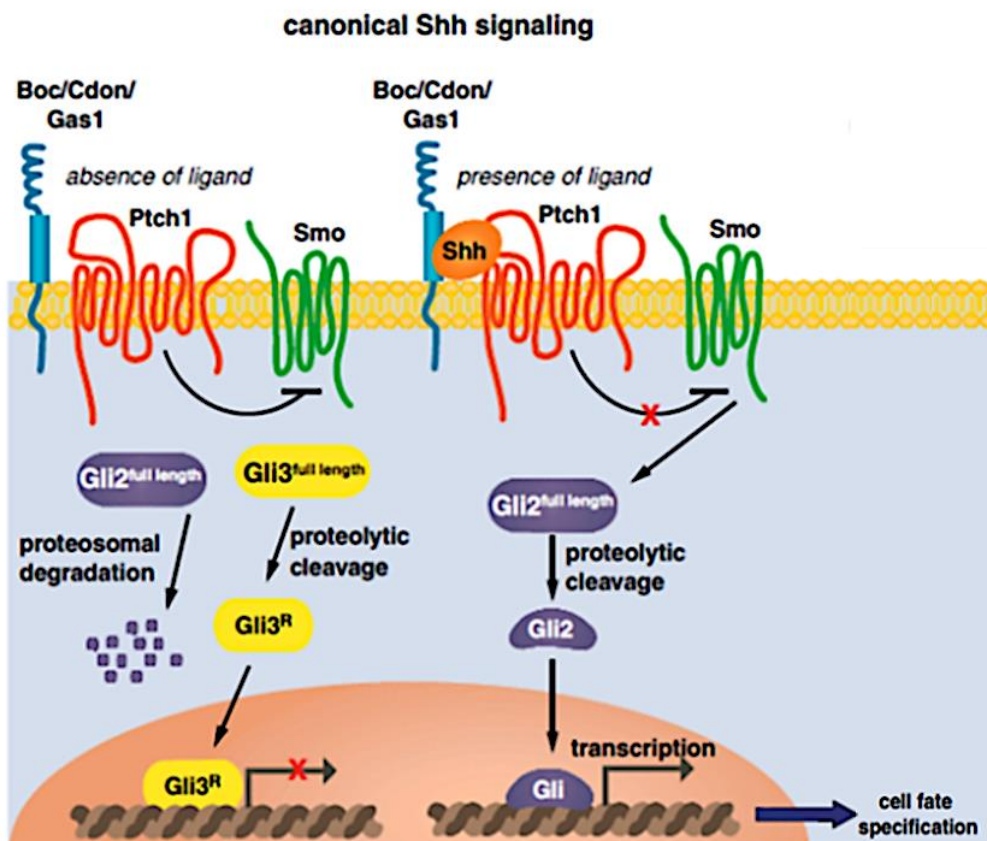


Figure 14: La voie canonique de Shh

En absence de Shh, Ptch1 inhibe Smo. La séquence complète de Gli2 est dégradée par le protéasome et celle de Gli3 est clivée pour générer le répresseur Gli3^R bloquant la transcription. Shh active la signalisation en se liant à ses récepteurs Ptch1, Boc, Cdon ou Gas1 levant l'inhibition sur Smo. L'activation de Smo stimule le clivage protéolytique de Gli2 puis sa translocation dans le noyau induisant la transcription des gènes cible de la voie. Adaptée de (Yam and Charron, 2013).

2.1.1. Les mécanismes d'interaction proposés entre Ptc et Smo

Comme précédemment mentionné, Ptc représente le récepteur majeur des protéines Hh. L'affinité du peptide Hh-N pour Ptc est de l'ordre du nanomolaire (Marigo et al., 1996) (pour revue, (Briscoe and Therond, 2013; Varjosalo and Taipale, 2008)). La fixation du ligand sur son récepteur est suivie de l'internalisation rapide du complexe formé et par conséquent de la diminution du nombre de récepteurs Ptc disponibles à la surface de la cellule. La transcription de Ptc étant elle-même induite par l'activation de la voie Hh, une boucle de rétrocontrôle s'établit puisque le récepteur Ptc nouvellement généré permet de limiter l'activation de la voie et/ou de réduire la quantité de ligand libre qui pourrait diffuser dans le tissu de façon inappropriée (Dessaud et al., 2007). De façon intéressante, Ptc participe à la formation du gradient de

concentrations des protéines Hh. Ce gradient serait fonction du rapport existant entre les récepteurs Ptc liés au ligand et les récepteurs Ptc libres, mais aussi de la quantité totale de récepteurs Ptc exprimés à la surface cellulaire (Casali, 2010).

Les mécanismes précis permettant l'inhibition de Smo par Ptc continuent à susciter la curiosité des scientifiques. L'hypothèse d'une interaction directe a été proposée suite à des expériences de co-immunoprécipitation, mais elle fut rapidement démentie par des études ultérieures. Plusieurs observations vont à l'encontre de cette hypothèse. Les profils d'expression de Ptc et Smo ne sont pas toujours superposables comme montré dans le cerveau post-natal chez les mammifères (Traiffort et al., 1998). De même, les deux protéines ne sont pas systématiquement co-localisées à l'échelle subcellulaire chez la drosophile (Denef et al., 2000; Incardona et al., 2002). Par ailleurs, une seule molécule de Ptc est capable d'inhiber de nombreuses molécules de Smo, ce qui caractérise un mode d'action catalytique et non stœchiométrique (Ingham et al., 2000).

La structure de Ptc, similaire à celle des pompes à petites molécules de type RND, suggère que ce récepteur pourrait agir en transportant une molécule qui serait directement responsable de la régulation de l'activité de Smo (Taipale et al., 2002). En accord avec cette hypothèse, des études *in vitro* et *in vivo* chez le poisson zèbre proposent la vitamine D3 comme un régulateur négatif de l'activité de Smo (Bijlsma et al., 2006). Les oxystérols (des intermédiaires de synthèse dans la voie de biosynthèse du cholestérol) ont été caractérisés comme des activateurs de Smo probablement requis pour la signalisation endogène (Nedelcu et al., 2013).

L'implication de Ptc dans l'efflux du cholestérol des cellules a été montrée. Elle pourrait permettre la stabilisation de Smo à la surface de la membrane plasmique (Bidet et al., 2011). De plus, Ptc pourrait empêcher l'accumulation de phospholipides membranaires notamment les phosphatidyl-inositol-4 phosphate (PIP4), qui participent à la localisation membranaire et à l'activité de Smo (Yavari et al., 2010). Enfin, les endocannabinoïdes viennent d'être identifiés comme une classe de lipides capables de bloquer la signalisation Hh vraisemblablement au niveau de Smo (Khaliullina et al., 2015). Il est intéressant de noter qu'à l'inverse, Smo régule Ptc puisque la dégradation de Ptc par les ubiquitines ligases de la famille des Smurfs dépend de Smo (Huang et al., 2013).

2.1.2. De l'activation de Smo vers l'induction des Glis : quel est le rôle du cil primaire ?

Smo appartient à la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G (GPCRs) et plus spécifiquement à la classe des récepteurs Frizzled. Ces récepteurs comportent 7 domaines transmembranaires et un domaine riche en cystéines (CRD pour 'Cystein Rich Domain'). La cristallisation des domaines transmembranaires, puis celle du domaine CRD et enfin de l'ensemble du récepteur ont été réalisées (Byrne et al., 2016; Nachtergaele et al., 2013; Wang et al., 2013). Le domaine CRD s'avère être un site de liaison des oxystérols et de plus être absolument indispensable à la signalisation des ligands Hh natifs (Nachtergaele et al., 2013). La superposition dans l'espace du domaine CRD et des domaines transmembranaires semble contribuer à stabiliser Smo dans un état inactif. Plus surprenant encore, une molécule de cholestérol a été détectée dans le site de liaison du domaine CRD. Elle permet à Smo de transmettre les signaux Hh natifs (Byrne et al., 2016).

Au niveau de ses domaines intracellulaires, Smo est activé par la phosphorylation de plusieurs sites situés dans son extrémité C-terminale (Jia et al., 2004). Ces phosphorylations sont censées contrebalancer les interactions électrostatiques qui maintiennent Smo dans sa conformation inactive (Zhao et al., 2007). Plusieurs kinases sont impliquées, mais la grande conservation des sites GRKs suggère que la régulation de Smo par ces enzymes est essentielle au déclenchement de la signalisation intracellulaire en aval du récepteur (Maier et al., 2014).

Le changement conformationnel faisant passer Smo de l'état inactif à l'état actif s'accompagne de sa dimérisation et de sa translocation à la surface de la cellule. Le niveau d'activation de Smo est fonction du degré de phosphorylation du récepteur. Ainsi, la caséine kinase 1 γ permettrait d'atteindre le niveau d'activation maximal du récepteur (Li et al., 2016).

Le cil primaire, caractéristique de la signalisation Hh chez les vertébrés (Goetz and Anderson, 2010), est une organelle composée d'un corps basal formé par les centrioles mère et fille, d'un faisceau de microtubules centraux connu sous le nom d'axonème, des complexes protéiques constituant la 'zone de transition' et de la membrane ciliaire. Le transport dans et en dehors du cil est un processus très finement régulé et, des mutations des protéines structurales du cil primaire conduisent à des pathologies appelées ciliopathies (Srymanska K et al, Cilia, 2012).

Localisé dans la membrane ciliaire lorsque son ligand est absent, Ptc sort du cil lors de la fixation de la protéine Hh. Ce mouvement de Ptc s'accompagne de la translocation de Smo

phosphorylé dans le cil, un processus médié par la β -arrestine et KIF3A, un membre de la famille des protéines de transport intra-flagellaires (IFT) (Corbit et al., 2005; Kovacs et al., 2008; Rohatgi et al., 2007).

La translocation de Smo est concomitante avec la sortie de GPCR161, un régulateur négatif de la signalisation Hh qui en accroissant les niveaux d'AMPc favorise la protéolyse des facteurs Gli en leur forme répressive (Mukhopadhyay et al., 2013). La présence de Smo dans le cil s'accompagne d'une augmentation des protéines Gli à l'extrémité distale du cil. Le complexe Sufu/Gli se dissocie pour permettre aux facteurs Gli d'être transloqués dans le noyau (pour revue, Briscoe and Therond, 2013). La localisation appropriée des facteurs de transcription Gli dans le cil est médiée par la kinésine Kif7 (He et al., 2014).

2.2. Les voies non-canoniques indépendantes de Gli

A côté de la voie canonique aboutissant à l'activation de la transcription de gènes cibles et qui est principalement impliquée dans la prolifération et la différenciation cellulaire, des voies non-canoniques indépendantes des facteurs de transcription Gli ont aussi été décrites (pour revue, (Brennan et al., 2012; Ferent and Traiffort, 2015; Robbins et al., 2012)). Les voies non-canoniques identifiées chez les vertébrés sont les mieux caractérisées et seront les seules à être décrites dans ce manuscrit. Ces voies non-canoniques se répartissent en mécanismes de type I impliquant Ptc (mais pas Smo) et de type II impliquant Smo de manière dépendante (IIa) ou indépendante (IIb) du cil primaire (Figure 15).

Les voies non-canoniques de type I décrites jusqu'à maintenant contrôlent la prolifération et la survie cellulaire. La première de ces voies repose sur l'interaction de la troisième boucle intracellulaire de Ptc (en l'absence de son ligand) avec la cycline B1. La rétention de cette cycline hors du noyau ralentit la progression du cycle cellulaire. A l'inverse, la présence du ligand Hh modifiant vraisemblablement la conformation du récepteur Ptc réduit son affinité pour la cycline B1 tout en augmentant celle pour la kinase GRK2 induisant ainsi la mitose (Barnes et al., 2001; Jiang et al., 2009). La seconde voie non-canonique de type I repose sur la caractérisation de Ptc comme un récepteur à dépendance. En effet, en l'absence de son ligand, Ptc induit une apoptose cellulaire indépendante de la voie de signalisation canonique. Pour induire cette apoptose, Ptc doit être clivé par des caspases afin d'exposer son domaine pro-apoptotique qui lui permet de recruter un complexe constitué de la caspase 9, de DRAL et de TUCAN-1 (Mille et al., 2009; Thibert et al., 2003).

Les mécanismes de signalisation Hh non-canoniques de type II sont définis comme des cascades de signalisation Smo-dépendantes et Gli-indépendantes destinées au réarrangement du cytosquelette, à la modulation des signaux calciques intracellulaires ou au contrôle du métabolisme cellulaire. En tant que GPCR fonctionnel, Smo possède une sélectivité pour les protéines hétérotrimériques Gi notamment caractérisées par leur sensibilité à la toxine pertussique (PTX). La capacité de Smo à agir comme un GPCR classique a été associée à certaines réponses canoniques de la voie telles que la prolifération des progéniteurs des cellules granulaires du cervelet induite par Shh (Barzi et al., 2011). Cependant elle est surtout considérée comme un mécanisme de signalisation Hh non-canonique dans différents contextes tels que la migration des fibroblastes, la tubulogenèse des cellules endothéliales (Chinchilla et al., 2010; Polizio et al., 2011), le switch métabolique induit par l'activation d'un axe Smo-Ca²⁺Ampk dans les adipocytes et le muscle squelettique (Teperino et al., 2012) ou, le déclenchement de pics d'activités calciques dans le cil primaire des neurones post-mitotiques de la moelle épinière (Belgacem and Borodinsky, 2011). Enfin, la stimulation de l'activité de la famille des Src kinases par Shh via Boc et de façon Smo-dépendante est un autre exemple de signalisation non-canonique qui contrôle le guidage des axones commissuraux (Yam et al., 2009) (voir Chapitre 4)

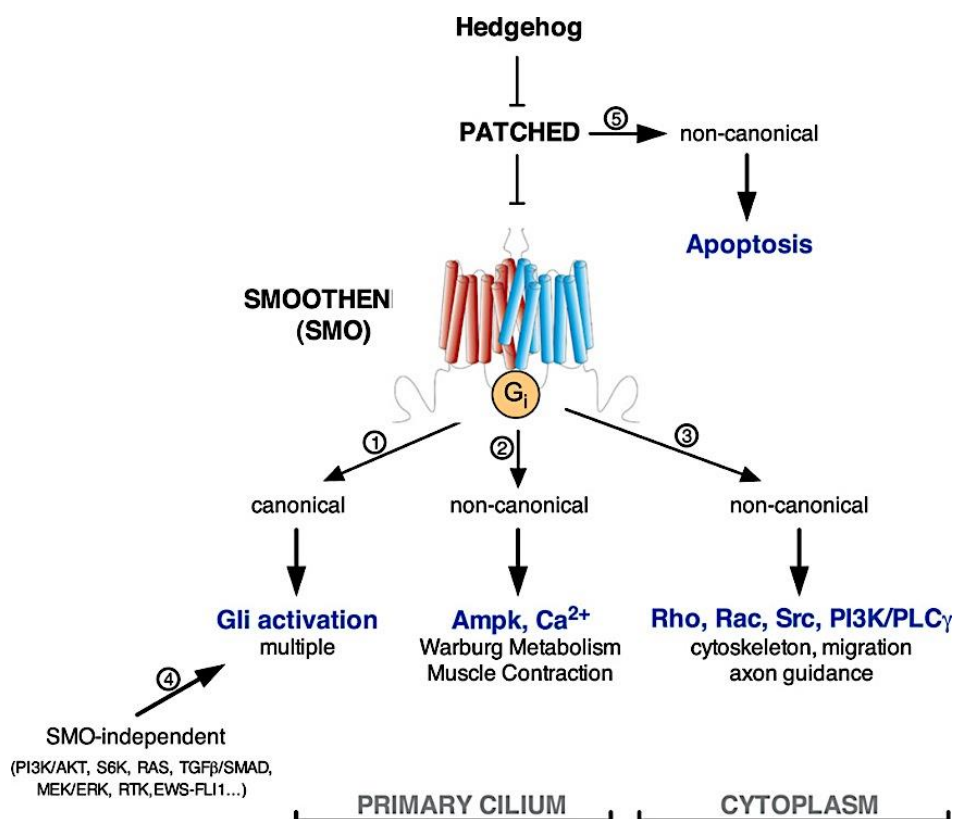


Figure 15: Les différents types de voies non canoniques de Shh
D'après (Teperino et al., 2014)

3. Shh et le lignage oligodendrocytaire

Le morphogène Shh a été initialement caractérisé comme un signal essentiel à la ventralisation du tube neural. Depuis cette découverte, la signalisation Hh a été impliquée dans des activités très diversifiées allant du guidage axonal au cours du développement au contrôle de l'activité électrique des neurones matures dans le SNC adulte (pour revue, (Ferent and Traiffort, 2015; Traiffort et al., 2010)). Dans ce paragraphe seront décrits les différents rôles physiologiques de Shh dans le développement du lignage oligodendrocytaire chez l'embryon et en période post-natale (pour revue, (Traiffort et al., 2016) ainsi que l'implication de la voie dans le processus de remyélinisation. Nous terminerons en citant brièvement les autres rôles de la signalisation Hh dans le SNC.

3.1. Au cours du développement embryonnaire

3.1.1. Dans la moelle épinière

Shh est produit à la fois par la notochorde (le mésoderme qui sous-tend la moelle épinière ventrale) et la plaque de plancher (le type cellulaire le plus ventral de la moelle épinière) au niveau de la ligne médiane ventrale du tube neural. Le morphogène forme un gradient de concentrations ventro-dorsal qui est interprété par les progéniteurs afin d'établir des profils d'expression de plusieurs facteurs de transcription à homéodomaines ou de type hélice-boucle-hélice (bHLH). L'expression combinée de ces gènes (dits de classe I s'ils sont réprimés par Shh ou de classe II s'ils sont activés par Shh) divise ainsi la partie ventrale du tube neural en 5 domaines qui vont générer des sous-types spécifiques de motoneurones et d'interneurones au moment où la différenciation neuronale est initiée. De la partie dorsale vers la partie ventrale, ces domaines sont nommés, p0, p1, p2, pMN et p3 et génèrent respectivement les neurones V0, V1, V2, les motoneurones MN et les neurones V3. Les régions les plus ventrales, p3 et pMN sont respectivement définies par l'expression des facteurs de transcription Nkx2.2 et Olig2 (Briscoe et al., 2000; Briscoe et al., 1999; Dessaud et al., 2010; Ericson et al., 1997) (Figure 16A).

Dans les années 1990, la démonstration par plusieurs groupes que la génération des OLs est restreinte au domaine pMN et dépend de la présence de la notochorde et/ou de la plaque du plancher (Poncet et al., 1996; Pringle et al., 1996) a conduit à suggérer que Shh produit par ces deux structures pouvait être le facteur impliqué dans la spécification des OPCs. En accord avec

cette hypothèse, l'expression ectopique de Shh dans la ligne médiane dorsale induit la production de nombreuses cellules oligodendrocytaires dans la région adjacente à cette source ectopique de Shh (Rowitch et al., 1999). De plus, l'expression de Shh est complètement compatible avec l'apparition des OPCs dans la moelle épinière ventrale du poulet (Orentas et al., 1999; Soula et al., 2001).

Les facteurs de transcription de type bHLH, Olig1 et Olig2, critiques pour la spécification des OPCs, sont les cibles de la signalisation Shh dans ce processus. Le morphogène est apparemment nécessaire et suffisant pour l'expression de ces facteurs. De plus, dans les souris Shh knockout, une absence complète de transcrits Olig est observée dans les zones exprimant normalement Shh (Lu et al., 2000).

Les premiers OPCs étant générés à E12.5 dans le domaine pMN qui quelques jours auparavant (E10.5) génère des motoneurones, de nombreuses études ont été menées afin de comprendre le mécanisme de cette transition motoneurones/OPCs. Ces travaux démontrent que le domaine générant les OPCs est situé dans la partie la plus ventrale du domaine Nkx2.2+ du neuroepithelium chez le poulet et non pas dans le domaine adjacent Pax6+ à partir duquel émergent les motoneurones (Soula et al., 2001). De façon intéressante, Shh participe à la transition motoneurones/OPCs et donc à la mise en place du domaine d'où dérivent les OPCs, notamment en maintenant l'expression d'Olig2 dans le domaine pMN, en favorisant l'extension dorsale du domaine Nkx2.2 et en induisant la régression du domaine Pax6 qui a lieu entre E5 et E6 chez le poulet (Agius et al., 2004). Le mécanisme moléculaire à l'origine de cette activité de Shh implique l'accumulation de la protéine Shh à la surface des progéniteurs sous l'influence de la sulfatase 1, un régulateur des HSPGs. (Al Oustah et al., 2014; Danesin et al., 2006; Touahri et al., 2012).

Des travaux plus récents de Ravanelli et collaborateurs utilisant des protéines photoconvertibles exprimées par un transgène Olig2 et l'imagerie à intervalles de temps réguliers, indiquent par ailleurs que la majorité des motoneurones et des OPCs dérivent de lignages de progéniteurs distincts. La ségrégation de ces deux populations de cellules résulte du recrutement, via les protéines Hh, de progéniteurs de cellules gliales qui à partir d'un domaine en position dorsale par rapport au pMN se déplace ventralement et progressivement vers le domaine pMN après la période de neurogenèse, mais avant de commencer à exprimer Olig2 et à générer des OPCs (Ravanelli and Appel, 2015).

Comme nous l'avons déjà mentionné dans le Chapitre 1, Shh ne participe pas à la seconde vague de production des OPCs qui débute vers E15.5 dans le tube neural dorsal (Figure

16B). Comme 80% des cellules du lignage oligodendrocytaire sont d'origine ventrale dans la moelle épinière de l'adulte, les populations d'OLs chez l'adulte sont donc majoritairement celles générées de façon Shh-dépendante (Tripathi et al., 2011).

3.1.2. Dans le cerveau postérieur et le mésencéphale

Comme dans la moelle épinière en développement, les premiers OPCs de la partie la plus caudale du cerveau sont générés à partir de progéniteurs ventraux chez la souris, le poulet et le poisson zèbre (Alberta et al., 2001; Davies and Miller, 2001; Lu et al., 2000; Park et al., 2002). Chez le poulet, la zone ventriculaire ventrale est le site où les premiers OPCs sont détectés dans le métencéphale (la région à l'origine du pons et du cervelet) chez le poulet au stade 26. Entre les stades 26 et 34, les OPCs envahissent les parties latérales et dorsales du métencéphale d'une manière rostro-caudale. D'autres domaines ventriculaires en position plus latérale et plus dorsale génèrent aussi une population restreinte d'OPCs d'apparition un peu plus tardive et correspondant à environ 20% de l'ensemble des OPCs produits (Alberta et al., 2001). Tous les domaines générant des OPCs sont corrélés avec l'expression transitoire de Shh dans le tissu adjacent. L'injection de l'anticorps Shh mAb5E1 au stade 19 conduit à une diminution dramatique du nombre d'OPCs générés (Davies and Miller, 2001). Chez la souris (Alberta et al., 2001) et le poisson zèbre (Park et al., 2002), ce processus dépend aussi de la signalisation Shh et des facteurs de transcription Olig1/2. Le mutant Smo homozygote chez le poisson zèbre présente une absence totale de cellules Plp/dm20 dans le cerveau caudal où la signalisation Hh contrôle non seulement l'expression d'Olig2 mais aussi de Nkx2.2a.

Dans le mésencéphale, Shh est détecté à proximité des cellules Olig2+ qui émergent de la zone ventriculaire ventrale et dorsale (Fu et al., 2003). Par ailleurs, la bande parabasale, une petite région du neuroépithélium mésencéphalique a récemment été proposée comme étant la source de la majorité des OPCs présents dans le cervelet (Mecklenburg et al., 2011). L'implication de Shh dans la spécification de cette population d'OPCs reste à être étudiée. Cependant, des données récentes indiquent que dans le cervelet périnatal, Shh stimule la prolifération des OPCs Olig2+ et diminue leur différenciation en inhibant les effets des facteurs de pro-différenciation. En accord avec cette hypothèse, à la fin de la première semaine post-natale, les cellules de Purkinje diminuent la synthèse de Shh et produisent la vitronectine qui induit la maturation des OPCs (Boslama-Oueghlani et al., 2012).

3.1.3. Dans le cerveau antérieur

Comme dans la moelle épinière et le cerveau caudal, Shh est impliqué dans la première vague de spécification des OPCs dans la partie ventrale du cerveau antérieur à partir de l'aire entopédonculaire (AEP) et de la MGE (Nery et al., 2001) (Figure 16 B,C). Cependant les différentes études consacrées à l'implication de Shh dans la spécification des OPCs du télencéphale semblent révéler un niveau de complexité plus important que dans les autres régions (Alberta et al., 2001; Nery et al., 2001; Qi et al., 2002; Tekki-Kessarlis et al., 2001). Le premier argument en faveur de l'implication de Shh est que le domaine d'expression des cellules Pdgfr α ⁺ est situé dans le neuroépithélium de l'hypothalamus antérieur qui co-exprime Shh et son récepteur Ptc entre E13.5 et E17 chez le rat. Par ailleurs, les souris mutantes Nkx2.1 qui n'expriment pas Shh dans le télencéphale (Nery et al., 2001) ou le poisson zèbre mutant Syu, dépourvu de Shh (Park et al., 2002) sont respectivement dépourvues d'OPCs Pdgfr α ⁺ dans la zone ventriculaire du cerveau antérieur ou dotés d'une expression très réduite d'Olig2. De façon cohérente, l'expression ectopique de Shh dans le neuroépithélium télencéphalique d'embryons de souris à E9.5 conduit à la production d'une majorité d'OPCs aux dépens des neurones (Nery et al., 2001). En revanche, ces résultats ne sont pas confirmés *in vitro* dans des cultures de télencéphale ventral issu de souris Nkx2^{-/-} puisque ces cultures génèrent des OPCs (Nery et al., 2001; Tekki-Kessarlis et al., 2001). Cette discordance reste à être éclaircie même si l'une des hypothèses avancées soit la présence de protéines Hh dans les milieux de culture.

Contrairement à ce qui a été observé dans la moelle épinière, le développement des OPCs n'est pas affecté dans le télencéphale du mutant Gli2 (Qi et al., 2003). A E12.5, chez ce mutant comme chez les animaux sauvages, Shh est exprimé dans la zone du manteau de la MGE, de l'AEP et de l'hypothalamus et les cellules Pdgfr α ⁺ et Olig2⁺ sont présentes dans la zone ventriculaire de la MGE et à un niveau moindre dans la LGE. De même, à E14.5, de nombreux OPCs Olig2⁺ et Pdgfr α ⁺ se retrouvent dans les régions striatale et septale, et atteignent dorsalement le néocortex dans les deux phénotypes (Qi et al., 2003).

Une autre source d'OPCs régulée par Shh dans le cerveau antérieur ventral est le plancher du troisième ventricule situé juste au-dessus du chiasma optique (Figure 16D). Les OPCs générés à ce niveau envahissent le nerf optique par un mécanisme qui est resté mal compris jusqu'à ce que Gao et collaborateurs démontrent que Shh synthétisé dans les cellules ganglionnaires de la rétine et transporté jusqu'au chiasma optique via les axones rétiniens induit l'apparition des OPCs dans cette aire cérébrale (Gao and Miller, 2006). La colonisation du nerf optique par les OPCs dépend également de Shh via un mécanisme probablement Gli-dépendant

(Merchan et al., 2007). La Mégaline, un membre de la famille des récepteurs aux lipoprotéines de basse densité, pourrait participer à ces effets. Exprimée par les astrocytes, la mégaline fixerait Shh puis le libèrerait progressivement pour induire la prolifération et la migration des cellules Olig2+ qui expriment Ptc et Gli1 (Ortega et al., 2012).

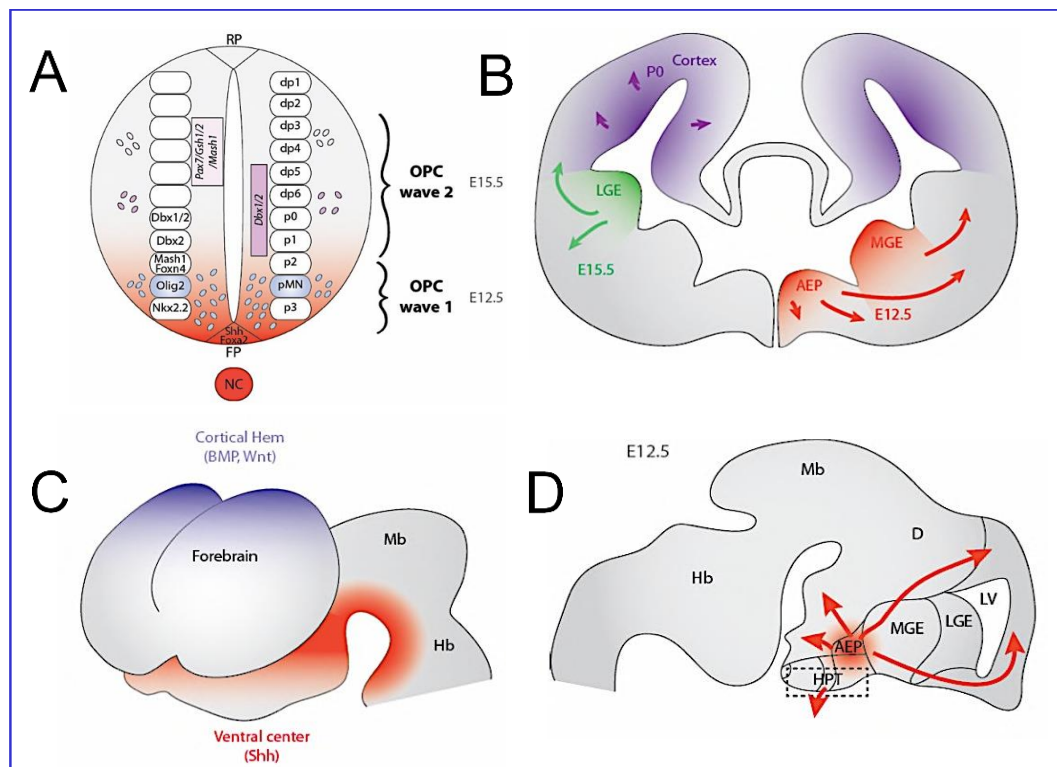


Figure 16: La génération des oligodendrocytes dépend de Shh dans la moelle épinière et le cerveau en développement.

(A) Vue en coupe transversale du tube neural indiquant la production des protéines Shh (rouge) sécrétées par la notochorde (NC) et la plaque du plancher (FP pour Floorplate). La plaque du toit (RF pour Roofplate) sécrète les protéines BMP et Wnt. Les OPCs sont produits sous forme de deux vagues successives à E12.5 et E15.5 chez la souris. La première vague dépend de Shh et provient du domaine pMN. La seconde dérive de progéniteurs exprimant Pax7 / Gsh1/2 / Mash1 ou Dbx1/2 et est indépendante de Shh. Les domaines du neuroépithélium ventral (p0-p3, pMN) et dorsal (dp1-6) sont indiqués sur le côté droit du tube neural alors que les profils d'expression génique de chaque domaine ventral sont indiqués sur le côté gauche. (B) Vue en coupe transversale du télencéphale de souris indiquant les régions de la zone ventriculaire où les différentes vagues d'OPCs sont générées. La première vague (E12.5, rouge) provient des précurseurs exprimant Nkx2.1, qui apparaissent dans l'AEP et la MGE, puis migrent dans l'ensemble du télencéphale. La deuxième vague dérive de précurseurs Gsh2+ situés dans l'éminence ganglionnaire latérale (LGE, vert) à E15.5. La dernière vague émerge des précurseurs corticaux exprimant Emx1 (bleu) autour de la naissance. (C) Schéma visualisant les centres organisateurs du cerveau antérieur en position ventrale (rouge) et dorsale (bleu), qui sécrètent respectivement les protéines Hedgehog et BMP / Wnt; (D) Vue sagittale du cerveau indiquant la position de l'hypothalamus qui génère les OPCs destinés à envahir le nerf optique. D'après (Traiffort et al., 2016).

3.2. Au cours du développement post-natal précoce

La découverte de l'existence de trois vagues successives d'OPCs dans le cerveau antérieur a contribué à améliorer notre compréhension des mécanismes apparemment complexes qui régulent l'oligodendrogenèse dans cette région (voir Chapitre 1). A partir de cette observation, l'hypothèse selon laquelle dans la moelle épinière, les OPCs d'origine ventrale dépendent de la signalisation Shh alors que ceux d'origine dorsale n'en dépendent pas, fut remise en question dans le cerveau antérieur.

En effet, l'inactivation du récepteur Smo dans les progéniteurs neuroépithéliaux Nestine+ au stade E12.5 chez la souris conduit à un déficit en OLs dans le télencéphale post-natal précoce (Machold et al., 2003) et suggère que Smo est impliqué dans la dernière vague de production des OPCs (Kessar et al., 2006). De plus, des cultures purifiées d'OPCs issues du cortex néonatal de rat répondent à Shh qui induit une augmentation dose-dépendante de la prolifération de ces progéniteurs (Lelievre et al., 2006). En accord avec ces observations, les travaux de Tong et collaborateurs indiquent que la signalisation Shh via Smo contrôle la génération des OPCs à partir de la partie dorsale de la V-SVZ à la période péri-natale (Tong et al., 2015). L'expression de Gli1 dans cette aire cérébrale et le résultat des manipulations génétiques de Smo dans les cellules de la glie radiale dorsale *in vivo* sont en faveur d'un rôle positif de Smo via Gli1 dans la production des OPCs dans le corps calleux (Tong et al., 2015). Cependant ces résultats entrent en contradiction apparente avec des travaux menés en parallèle en utilisant les souris Gli1 knockout qui indiquent une myélinisation plus précoce du corps calleux lorsque Gli1 est invalidé (Samanta et al., 2015).

Chez l'Homme, les OPCs proviennent à la fois du télencéphale ventral et de la SVZ corticale (Jakovcevski et al., 2009; Rakic and Zecevic, 2003). La production des OLs générés *in vitro* à partir des cellules de la glie radiale fœtale humaine isolées de la SVZ corticale est augmentée en présence de Shh, mais n'est pas bloquée par un antagoniste de Smo, la cyclopamine suggérant l'existence d'un mécanisme Shh / Smo indépendant supplémentaire au moins *in vitro* (Mo and Zecevic, 2009; Ortega et al., 2013).

3.3. A l'âge adulte : Shh en physiologie et en pathologie

3.3.1. L'expression des composantes de la voie Shh dans le cerveau mature

En 1998, Elisabeth Traiffort et ses collaborateurs ont décrit pour la première fois l'expression persistante des différents gènes de la voie Shh dans le cerveau adulte (Traiffort et al., 1998; Traiffort et al., 1999). Une cartographie étendue des cellules exprimant Shh, Ptc, Smo et Hip a été établie en utilisant des sondes non radiomarquées (Coulombe et al., 2004; Traiffort et al., 1999), puis confortées quelques années plus tard par l'utilisation de sondes radiomarquées (Banerjee et al., 2005) et de souris transgéniques exprimant un gène rapporteur sous le promoteur des gènes spécifiques de la voie notamment Shh, Ptc, Gli1, Gli2, Gli3 (Garcia et al., 2010; Harwell et al., 2012; Machold et al., 2003) (Figure 17).

Chez le rongeur adulte, l'expression de Shh est majoritairement détectable dans la partie ventrale du cerveau antérieur (globus pallidus, septum, hypothalamus, amygdale), dans le cortex (couches IV et V), les cellules de Purkinje du cervelet et les motoneurones du tronc cérébral et de la moelle épinière. Sa localisation est essentiellement neuronale (Traiffort et al., 1998; Traiffort et al., 2001; Traiffort et al., 1999). Dans certaines régions, Shh et son complexe récepteur Ptc-Smo sont co-exprimés. C'est le cas du cortex cérébelleux ou de la paroi de la partie ventrale du troisième ventricule. Dans le cas particulier du cervelet, une analyse détaillée de l'expression de Shh, Ptc et Smo à l'échelle cellulaire indique leur co-expression dans les cellules de Purkinje (Petralia et al., 2012; Traiffort et al., 1999). Ptc et Smo seuls sont exprimés dans les cellules de la glie de Bergmann et dans les cellules granulaires avec un enrichissement du côté post-synaptique suggérant l'implication de la signalisation Hh dans l'activité des neurones post-mitotiques (Petralia et al., 2012; Traiffort et al., 1999). Dans d'autres régions, seuls Shh et Ptc sont co-exprimés notamment dans le noyau facial et le septum médian.

Alternativement, Ptc peut être observé dans des aires de projection des régions exprimant Shh. Enfin, Smo est souvent détecté dans des aires n'exprimant pas Ptc telles que les organes circumventriculaires ou le noyau réticulaire thalamique suggérant que le complexe Shh-Ptc d'une part, et Smo d'autre part, peuvent vraisemblablement fonctionner indépendamment l'un de l'autre dans le cerveau adulte (Pascual et al., 2005; Traiffort et al., 1998; Traiffort et al., 1999). Les transcrits de la protéine réceptrice Hip comme ceux de Ptc sont visualisés dans des aires de projection des régions exprimant Shh, mais pas obligatoirement dans des régions où Ptc est exprimé (Coulombe et al., 2004; Loulier et al., 2005) suggérant que Ptc et Hip n'ont

vraisemblablement pas dans le cerveau adulte, les activités coordonnées qui ont été décrites durant le développement embryonnaire (Jeong and McMahon, 2005; Loulier et al., 2005).

La localisation des facteurs de transcription Gli a aussi été caractérisée dans le cerveau de souris adultes. Les cellules exprimant Gli1, Gli2 et Gli3 sont des cellules complètement différenciées appartenant à des sous-populations d'astrocytes matures co-exprimant le récepteur Ptc dans le cerveau antérieur (Garcia et al., 2010). Un pourcentage très minime des cellules Gli1+ exprime le marqueur oligodendrocytaire APC dans la substance grise et Gli1 est absent des passages de fibres du cerveau antérieur adulte (Garcia et al., 2010). Dans le cerveau caudal, en particulier dans le cervelet, Gli2 et Gli3 sont fortement exprimés dans la couche des cellules de Purkinje et dans la couche des cellules granulaires, Gli1 est présent à un plus faible niveau dans la couche granulaire que dans la couche des cellules de Purkinje (Corrales et al., 2004).

A l'échelle subcellulaire, Shh est localisé dans des microdomaines membranaires enrichis en sphingolipides et cholestérol, appelés 'radeaux' (Traiffort et al., 2001). Shh est également transporté via les axones comme montré dans les cellules ganglionnaires de la rétine par des expériences d'incorporation de méthionine radiomarquée (Traiffort et al., 2001) ainsi que par la visualisation de la protéine ShhN sous forme de signaux ponctiformes colocalisés avec des marqueurs de vésicules synaptiques dans le soma, les dendrites et l'axone de ces cellules (Beug et al., 2011). Smo est aussi associé à des vésicules synaptiques dans les fibres moussues des cellules granulaires de l'hippocampe (Masdeu et al., 2007). Enfin, Ptc et Smo sont essentiellement localisés du côté post-synaptique dans le cervelet (Petralia et al., 2012). Ces localisations suggèrent l'implication de la signalisation Hh dans l'activité des neurones post-mitotiques.

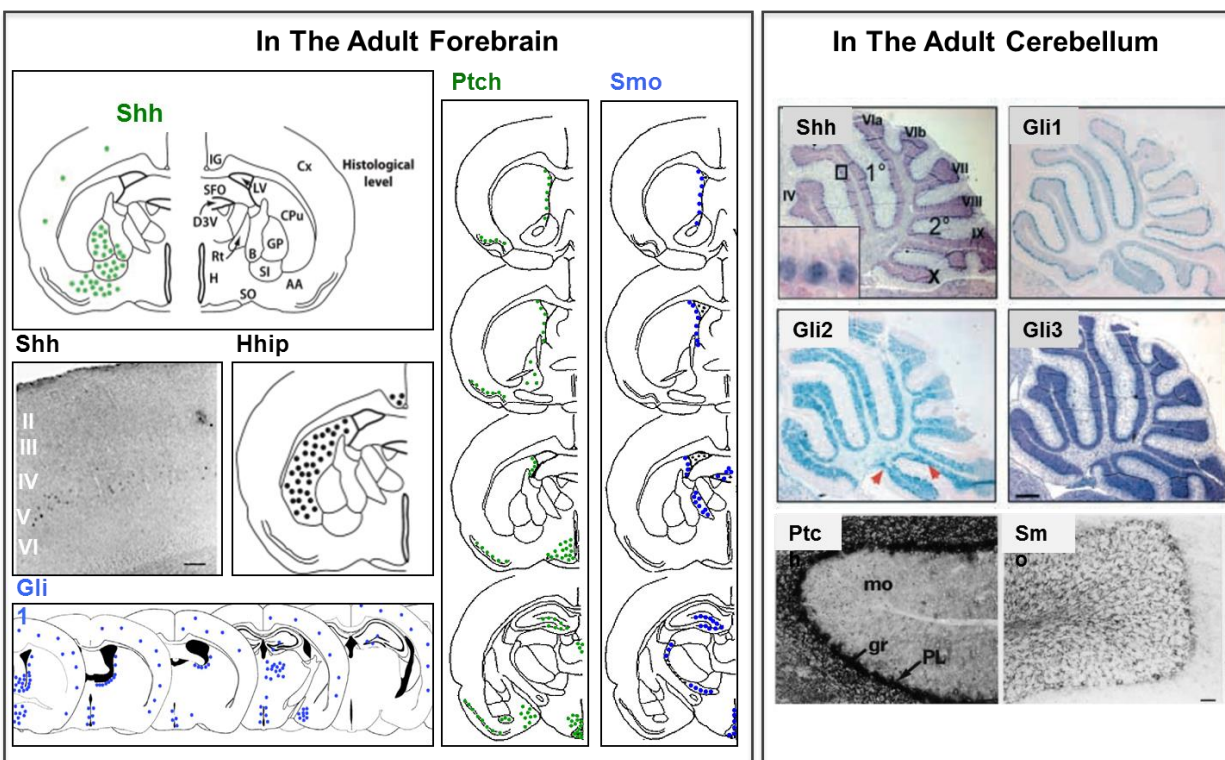


Figure 17: Expression des composants de la voie Shh dans le cerveau et le cervelet adulte du rongeur

Panel gauche, localisation des cellules exprimant Shh dans le cerveau de rat et distribution comparée de ses récepteurs Ptc, Smo, Hip. Adaptée de (Traiffort et al., 2010; Traiffort et al., 2001; Traiffort et al., 1999) et de son gène cible Gli1 (Alvarez-Buylla and Ihrie, 2014). Les transcrits sont indiqués par des points colorés. AA, anterior amygdaloid area; B, basal nucleus of Meynert; CPu, caudate putamen; Cx, cerebral cortex; D3V, dorsal third ventricle; fi, fimbria; GP, globus pallidus; H, hypothalamus; IG, indusium griseum; Rt, reticular thalamic nucleus; SFO, subfornical organ; SI, substantia innominata; SO, supraoptic nucleus. **Panel droit**, expression de Shh, des facteurs Gli (Corrales et al., 2004), des récepteurs Ptc et Smo (Traiffort et al., 1999) dans le cervelet. PL, Purkinje cell Layer; mo, molecular cell layer; gr: granular cell layer

3.3.2. Rôles de Shh dans le lignage oligodendrocytaire chez l'adulte

A ce jour, peu de données relient la signalisation Shh et la production persistante des OLS myélinisants dans le SNC adulte. Les recherches basées sur le transfert adénoviral de ShhN dans le ventricule latéral de souris adultes montrent une augmentation du niveau d'expression de *Ptc* dans les cellules oligodendrocytaires exprimant le marqueur Olig1 dans le cortex et le corps calleux. De plus, 26 jours après l'infection virale, une augmentation significative de 50% de la prolifération des OPCs exprimant le protéoglycane NG2 ou les transcrits de la protéine plp/dm20 est observée dans le cortex cérébral et le corps calleux des animaux analysés (Jiao

and Chen, 2008; Loulier et al., 2006). En accord avec ces données, les travaux récents de Tong et collaborateurs montrent que la surexpression de la forme constitutivement active de Smo, SmoM2, induite dans la V-SVZ dorsale de souris âgées de 30 jours conduit un mois après l'injection à une augmentation significative du nombre de cellules exprimant Olig2, Sox10 et le marqueur d'OLs matures APC dans le corps calleux de ces animaux suggérant que l'activation ectopique de Smo dans la V-SVZ dorsale favorise l'oligodendrogenèse chez l'adulte (Tong et al., 2015).

Si les données concernant directement le lignage oligodendrocytaire restent peu nombreuses, il convient malgré tout de décrire brièvement les autres activités connues de la signalisation Shh dans le cerveau adulte sain en particulier parce qu'elles concernent le contrôle des NSCs, des neurones et des astrocytes qui peuvent participer directement ou indirectement à la myélinisation physiologique. La présence des composantes de la signalisation Shh dans les aires neurogéniques adultes, la SVZ des ventricules latéraux et la zone sous-granulaire (SGZ) du gyrus denté de l'hippocampe, a rapidement orienté les recherches sur l'activité de la voie dans ces deux régions. La première démonstration de l'activation possible de la voie a été réalisée par l'injection intra-striatale de la protéine recombinante qui induit fortement l'expression du gène cible Ptc dans la SVZ (Charytoniuk et al., 2002). Ces résultats furent ensuite confirmés par l'utilisation de modulateurs pharmacologiques du récepteur Smo qui régulent la prolifération cellulaire dans cette région (Machold et al., 2003; Palma et al., 2005), par l'invalidation de Smo dans les cellules Nestine+ indiquant que Smo est requis pour le maintien de la neurogenèse adulte (Balordi and Fishell, 2007) et par la surexpression de Shh dans le ventricule latéral qui induit la rétention des neuroblastes nouvellement générés dans la SVZ (Angot et al., 2008). Shh participe aussi à l'organisation en mosaïque de la SVZ en contrôlant la génération de populations de neurones gabaergiques bien définies dans les bulbes olfactifs (Ihrie et al., 2011). En accord avec la colocalisation de ShhN avec des marqueurs de vésicules synaptiques, sa sécrétion peut être induite par dépolarisation des cellules neuronales différenciées (Beug et al., 2011). La signalisation Shh est également un régulateur des NSCs de l'hippocampe (Han et al., 2008; Lai et al., 2003; Machold et al., 2003).

Enfin, l'hypertrophie astrocytaire induite par l'invalidation de Smo spécifiquement dans les astrocytes suggère que la signalisation Shh est vraisemblablement impliquée dans la communication astrocyte-neurone (Garcia et al., 2010). De plus, le profil moléculaire et fonctionnel des astrocytes dans le cerveau adulte sain est contrôlé par la sécrétion neuronale de Shh (Farmer et al., 2016).

3.3.3. Pathologies associées à une dysrégulation de la voie Shh et son rôle dans les maladies démyélinisantes

Etant donné l'implication majeure de la voie de signalisation Shh dans de multiples processus biologiques dans le cerveau en développement ou adulte, il est évident d'une part que tout dysfonctionnement de la voie peut être à l'origine de pathologies telles que des malformations congénitales ou des tumeurs, et d'autre part que sa manipulation pharmacologique peut constituer une approche thérapeutique potentielle pour diverses pathologies neurodégénératives.

Parmi les nombreux désordres congénitaux associés au dysfonctionnement de la signalisation Shh, nous citerons l'holoprosencéphalie (HPE) et le syndrome de Down (SD) qui ont fait l'objet d'un nombre considérable de travaux. L'HPE est la plus fréquente des malformations du cerveau antérieur chez l'Homme avec un spectre clinique pouvant aller d'une incompatibilité complète avec la vie intra-utérine jusqu'à des malformations isolées de la face (Hong and Krauss, 2012). Des mutations inactivatrices ont été détectées sur plusieurs gènes de la voie incluant Shh, Gli2, Cdo tandis que Ptc ou Boc jouent le rôle d'allèles modificateurs modulant la sévérité du spectre clinique de l'HPE (voir Chapitre 3). Le syndrome de Down, l'une des causes génétiques les plus fréquentes de déficit intellectuel, est relié dans la majorité des cas à une insuffisance d'activité de la signalisation Shh par surexpression du récepteur Ptc vraisemblablement liée à des niveaux accrus du précurseur de la protéine amyloïde (Trazzi et al., 2013). L'activation pharmacologique de la voie par un agoniste de Smo suffit à normaliser la morphologie du cervelet et à restaurer la capacité d'apprentissage associée au fonctionnement de l'hippocampe (Currier et al., 2012; Das et al., 2013).

L'activation inappropriée de la signalisation Shh est non seulement la cause majeure de médulloblastomes, les tumeurs cérébrales malignes les plus fréquentes de l'enfance mais aussi de gliomes, les plus communes des tumeurs cérébrales primaires chez l'adulte (Huang and Yang, 2015; Li et al., 2009; Northcott et al., 2012). Le médulloblastome a été initialement associé au syndrome de Gorlin, une pathologie congénitale caractérisée par des mutations inactivatrices du récepteur Ptc. Les cellules cibles du processus oncogéniques sont les précurseurs des cellules granulaires du cervelet (pour revue, (de Lucas et al., 2016)).

Par ailleurs, l'activation de la signalisation Shh pourrait être bénéfique dans des pathologies telles que la maladie de Parkinson, l'axotomie du nerf facial, les déficits cérébraux

néonataux liés à l'administration de glucocorticoïdes (pour revue, Traiffort et al., 2010). Enfin, la protéine induit la neurogenèse, l'angiogenèse et l'oligodendrogenèse.

Avant les travaux publiés par l'équipe, l'implication de la signalisation Shh dans le processus de remyélinisation a été suggérée au cours de diverses études. Un déficit de clivage de la protéine Shh a d'abord été proposé dans des expériences d'analyse de western blots réalisées à partir du tissu cérébral post-mortem de malades atteints de sclérose en plaques. L'étude concluait à une diminution de la protéine Shh dans la matière grise de ces patients (Mastronardi et al., 2003). En contradiction apparente avec ces données une augmentation de Shh est montrée dans des lésions de sclérose en plaques et des modèles d'animaux EAE (Seifert et al., 2005; Wang et al., 2008).

Par ailleurs, l'amélioration clinique obtenue après administration d'interféron- β ou de triiodothyronine dans différents modèles animaux de démyélinisation chez le rongeur a été attribuée à une augmentation de l'expression de Shh (Franco et al., 2008; Harsan et al., 2008; Mastronardi et al., 2004) corrélée à une augmentation progressive du nombre de cellules Olig2+ (Harsan et al., 2008). De plus, dans un modèle de lésion de la moelle épinière, des allogreffes d'OPCs combinées à l'administration de la protéine recombinante Shh se sont révélées plus efficaces que les allogreffes seules sur le plan de la conduction axonale (Bambakidis and Miller, 2004). En accord avec cette conclusion, l'administration d'un agoniste de la voie dans ce modèle induit une augmentation de prolifération d'une population de précurseurs neuraux endogènes (Bambakidis et al., 2009). La signalisation Shh se révèle aussi être un facteur contrôlant l'ouverture de la barrière hémato-encéphalique et un système anti-inflammatoire endogène d'importance probablement majeure lors des attaques immunitaires du SNC, telles qu'elles sont observées dans la sclérose en plaques (Alvarez et al., 2011).

Récemment, le blocage de l'activité du facteur de transcription Gli1 a été récemment rapporté comme une approche thérapeutique prometteuse dans les maladies démyélinisantes (Samanta et al., 2015). Ces données sont apparemment discordantes avec le rôle de régulateur positif de la remyélinisation que nos propres travaux ont permis d'attribuer à la signalisation Shh (Ferent et al., 2013)

En effet, nos données montrent que 4 jours après injection stéréotaxique de LPC dans le corps calleux des souris, la protéine Shh est sécrétée par les cellules oligodendrocytaires Olig2+. Cette sécrétion s'accompagne d'une forte induction de la transcription du récepteur Smo et du facteur de transcription Gli2, mais d'une induction plus limitée des gènes cibles classiques de la voie Gli1 et Ptc. Le transfert adénoviral de Shh augmente le nombre d'OPCs et d'OLs matures,

réduit l'étendue de la lésion ainsi que la gliose réactive au niveau de la lésion. A l'inverse, le transfert adénoviral de l'antagoniste physiologique de Shh, Hip, bloque la prolifération et la différenciation des OPCs et empêche la réparation du tissu (Ferent et al., 2013). Etant donné l'existence d'un certain nombre de discordances apportées par l'ensemble de ces données, les mécanismes moléculaires impliqués dans la réparation des lésions démyélinisantes médiée par la modulation de l'activité des composantes de la signalisation Hh méritent à présent d'être finement disséqués.

Chapitre 4. Boc, une protéine transmembranaire, impliquée dans la transmission de la signalisation hedgehog

La communication cellulaire est à la base du développement harmonieux des organes et de l'homéostasie tissulaire. Les cellules sont capables d'interagir entre elles par différents mécanismes parmi lesquels l'adhésion cellulaire et l'activation de diverses cascades de signalisation par des molécules extracellulaires. Cdo ou Cdon (pour Cell adhesion molecule-related / Down-regulated by Oncogenes) et Boc (pour Brother of Cdo), ont récemment émergé comme des acteurs importants au sein de ces deux mécanismes de communication. Je me focaliserai dans ce chapitre plus particulièrement sur Boc sur lequel porte mon projet de thèse, mais je ferai aussi référence à Cdo en tant que premier membre de cette nouvelle famille à avoir été isolé.

1. Identification, structure et interactions

Le gène *Cdo* a été isolé à partir du criblage d'une banque d'ADNc destiné à identifier de nouveaux gènes impliqués dans la capacité de certaines lignées de fibroblastes de rat à résister à l'effet induit par les oncogènes sur la croissance cellulaire (Kang et al., 1997). Peu de temps après, l'implication de Cdo dans la différenciation myogénique fut rapportée (Kang et al., 1998). Ensuite, le criblage à faible stringence d'une banque d'ADNc de cerveau fœtal humain avec une sonde *Cdo* de rat, a conduit à l'identification du gène apparenté *Boc* codant pour une protéine ayant des effets semblables à ceux de Cdo sur la différenciation myogénique (Kang et al., 1998; Kang et al., 2002). Chez la drosophile, les homologues de Boc et Cdo ayant été identifiés lors d'un criblage visant à isoler de nouvelles composantes de la voie de signalisation Hh, ces deux gènes furent nommés *Ihog* (*Interference hedgehog*) et *Boi* (*Brother of ihog*) (Lum et al., 2003).

Chez l'Homme, le gène *BOC* est localisé sur le chromosome 3 et composé de 20 exons codant pour une protéine de 1114 acides aminés. Chez la souris, *Boc* est situé sur le chromosome 16 et code pour une protéine de 1110 acides aminés. Boc et Cdo sont très conservés chez les vertébrés y compris chez le poisson zèbre chez lequel *Boc* code pour une

protéine de 1033 acides aminés et présente 75% d'identité en nucléotides avec *Boc* humain, de rat, de souris ou de xénope. Les protéines codées par ces gènes sont des glycoprotéines de surface proches des molécules d'adhésion cellulaire (CAMs) appartenant à la superfamille des Immunoglobulines (Ig). Elles comprennent un domaine extracellulaire ou ectodomaine contenant cinq (Cdo) ou quatre (Boc) domaines Ig-like, suivi par trois motifs fibronectine (Fn1-3) de type 3, un unique domaine transmembranaire et une région intracellulaire de 270 (CDO) ou 238 (BOC) acides aminés. Cette dernière région n'étant pas conservée, elle est susceptible d'expliquer certaines différences fonctionnelles entre les deux protéines. L'homologie en acides aminés de l'ectodomaine de Boc et Cdo varie de 38% dans le quatrième domaine Ig à 80% dans le troisième domaine Fn (Kang et al., 2002; Mulieri et al., 2002). Chez la drosophile, *Ihog* et *Boi* se distinguent par la présence de 4 domaines Ig et seulement 2 motifs Fn (Fn1-2) (Figure 18A). Par ailleurs, l'arbre phylogénétique permettant de comparer Boc/Cdo et des protéines structurellement apparentées, tels que les récepteurs impliqués dans le guidage axonal qui possèdent aussi 5 domaines Ig et 3 domaines Fn, indique que Boc et Cdo forment une sous-famille distincte de la sous-famille contenant Roundabout (Robo), Neurogenin ou Deleted in Colorectal Cancer (DCC) (Figure 18C).

Boc et Cdo interagissent au niveau de leurs domaines extra- et intracellulaires pour former des homo- ou hétérodimères en *cis* (au niveau de la membrane d'une seule cellule). Les deux protéines lient à haute affinité la partie N-terminale biologiquement active des membres de la famille Hh. La liaison au ligand ShhN met en jeu le domaine Fn3 de Boc/Cdo et un site de liaison du calcium sur ShhN (Figure 18B) (McLellan et al., 2008; Tenzen et al., 2006; Yao et al., 2006). Ce mode de liaison n'est pas conservé chez la drosophile où la liaison au ligand implique le domaine Fn1 de *Ihog/Boi* et le site de liaison de l'héparine sur HhN (McLellan et al., 2008; Yao et al., 2006). En plus de cette liaison au ligand, Boc/Cdo (via Fn1 et Fn2 ; (Izzi et al., 2011)) et *Boi/Ihog* (via Fn2 ;(Zheng et al., 2010)) forment un complexe avec le récepteur Ptc. Chez la drosophile, ce complexe est nécessaire à la liaison à haute affinité des protéines Hh sur leur principal récepteur Ptc. En accord avec cette observation, les embryons chez lesquels *Boi/Ihog* sont génétiquement invalidés présentent un défaut d'expression des gènes cibles de la voie et de sévères anomalies du processus de segmentation de la larve (Zheng et al., 2010).

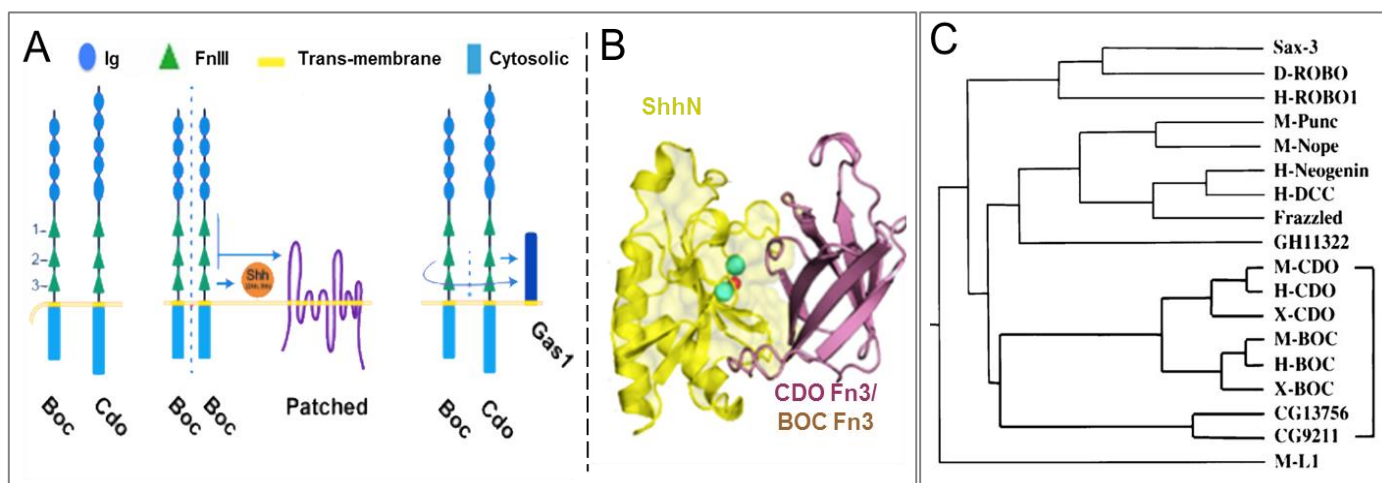


Figure 18: Représentation de la structure tridimensionnelle et des interactions de la protéine Boc

(A) Dans le contexte de la signalisation Hh, Boc s'associe aux protéines Shh Dhh ou Ihh et à Ptc. Des interactions homo- (Boc/Boc) ou hétérodimériques (Boc/Cdo) existent. Les hétérodimères peuvent aussi se lier à Gas1. Les flèches et les pointillés représentent les interactions protéiques. Les domaines fibronectine de type III (FnIII) numérotés de 1 à 3 sont matérialisés par des triangles verts et les domaines Ig par des ellipses bleues. (B) Représentation des résultats de l'analyse cristallographique du complexe calcium-dépendent formé entre ShhN (jaune) et CDOFn3 (violet) ou BOCFn3 (marron). L'ion zinc est représenté par un disque rouge et les deux ions calcium par des disques bleus. Adapté de (Kavran et al., 2010). (C) Arbre phylogénétique comparant les séquences complètes des protéines Cdo et Boc avec les séquences apparentées identifiées dans les bases de données (Kang et al., 2002).

Chez les vertébrés, des expériences de gain et perte de fonction respectivement réalisées dans l'embryon de poulet ou de souris suggèrent que les complexes Shh/Boc ou Shh/Cdo augmentent le niveau de signalisation dans la cellule répondant à Shh en facilitant la présentation de la forme active du ligand à Ptc ou alternativement en empêchant la séquestration et le turnover du ligand. En accord avec cette hypothèse, l'expression ectopique de Boc ou Cdo favorise la ventralisation du tube neural chez le poulet. Par ailleurs, l'expression de Boc et Cdo est régulée négativement suite à l'activation de la signalisation Shh suggérant un possible mécanisme de rétro-contrôle destiné à empêcher une activation excessive de la voie (Tenzen et al., 2006).

Une différence notable entre les vertébrés et la drosophile est l'existence chez les vertébrés d'une autre protéine capable de lier les protéines Hh et de se substituer à la fonction de Boc ou Cdo. Cette protéine est Gas1, une protéine à ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI) dont le domaine extracellulaire partage des homologies avec le récepteur du GDNF (Glial derived neurotrophic factor) (Schueler-Furman et al., 2006). Si l'inactivation génétique de Boc ou Cdo n'a qu'un effet modéré sur l'activité de la signalisation Shh, l'inactivation simultanée de ces deux

gènes ou de l'un d'entre eux associée à l'inactivation de Gas1 aboutit à une réduction notable des réponses induites par Shh telles que la ventralisation du tube neural (Allen et al., 2011; Bae et al., 2011). Ainsi, chez les doubles mutants Boc^{-/-} ;Cdo^{-/-} ou Gas1^{-/-} ;Cdo^{-/-} ou Gas1^{-/-} ;Boc^{-/-}, la spécification des progéniteurs neuraux Nkx2.2⁺ et Olig2⁺ est sévèrement altérée au niveau du domaine pMN dans le tube neural. L'inactivation complète des 3 gènes abolit la ventralisation du tube neural phénotypant la perte totale de Shh ou de Smo (Allen et al., 2011). Cependant, l'implication de Cdo et Boc dans l'activation de la signalisation Shh dépend du tissu considéré puisque par exemple la spécification des doigts induite par Shh chez l'embryon est tout à fait normale dans le mutant Boc^{-/-} ;Cdo^{-/-} (Allen et al., 2011; Zhang et al., 2011).

Malgré des redondances fonctionnelles, Boc et Cdo utilisent des mécanismes différents pour activer la signalisation Hh. Des approches de gain de fonction dans le tube neural du poulet en développement, ont servi à évaluer le rôle du domaine transmembranaire et des domaines Fn de Boc et Cdo dans la transmission du signal Hh. La première observation est que l'ancrage à la membrane de Boc et Cdo est indispensable pour transmettre le signal Hh, puisque les formes solubles de ces protéines sont incapables d'induire l'activation de la voie (Tenzen et al., 2006). Cependant, lorsque le domaine transmembranaire de Boc et Cdo est remplacé par le domaine transmembranaire de la protéine de surface CD4 ou par une ancre GPI, toutes ces constructions sont capables de promouvoir la signalisation Hh à l'exception de la construction Boc /GPI suggérant l'existence d'une différence dans les mécanismes par lesquels Boc et Cdo agissent. Puisque l'arrimage de Boc à la surface de la membrane par l'ancre GPI rend la protéine non fonctionnelle, la localisation subcellulaire de Boc semble être essentielle à son activité en tant que co-récepteur des protéines Hh. De plus, il apparaît que les domaines Fn de Cdo sont suffisants pour induire la signalisation Hh, alors que ceux de Boc ne le sont pas. En effet, Boc nécessite un motif additionnel de 78 acides aminés qui relie les domaines Fn et Ig et agit de concert avec les domaines Fn1 ou Fn2 pour activer la voie. L'activité de Boc requiert également une séquence juxtamembranaire contenant un site de reconnaissance de la matrice métallopeptidase 9. Ce domaine conduit à la libération du domaine extracellulaire de Boc par une protéase non encore identifiée. Il reste à déterminer si ce clivage est requis pour que Boc induise l'activation du signal Hh (Song et al., 2015)

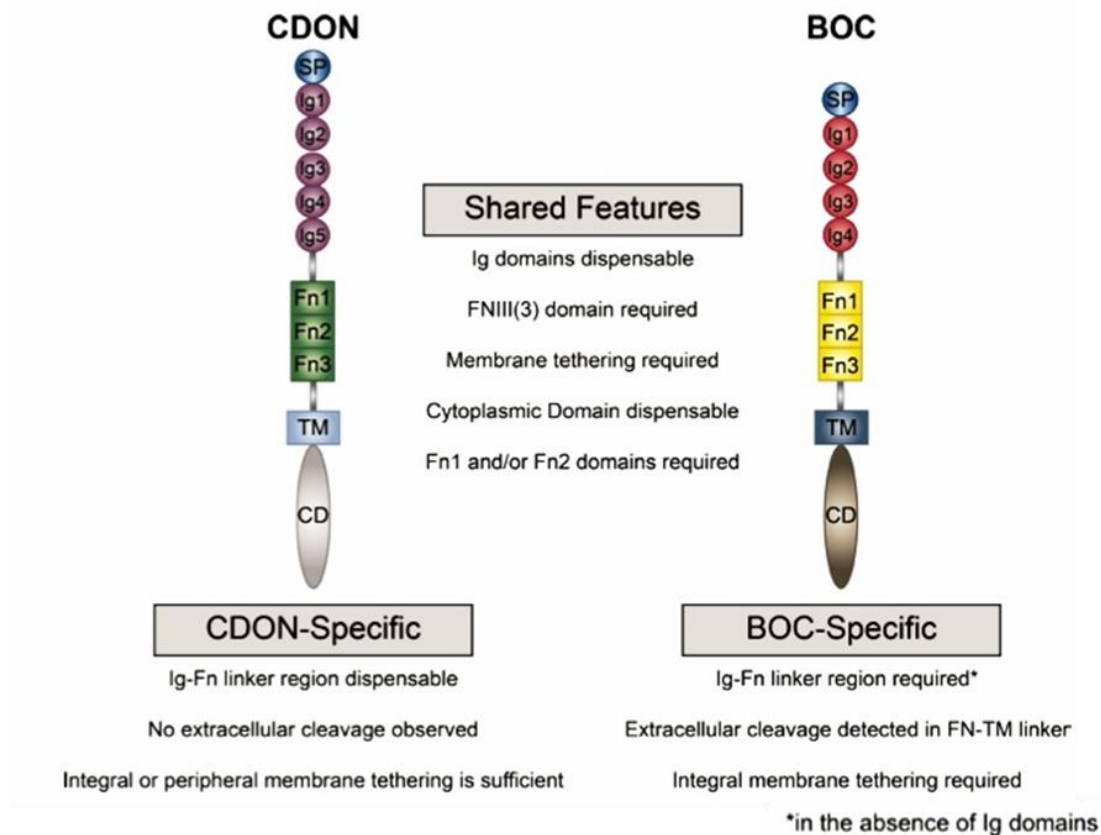


Figure 19: Schéma résumant les domaines de Cdo et Boc requis ou non pour la transduction du signal Hh

Les caractéristiques communes aux deux co-récepteurs sont répertoriées au centre alors que celles spécifiques à l'un ou l'autre sont indiquées sous chaque protéine. Parmi les caractéristiques partagées: le domaine cytoplasmique et les domaines Ig ne sont pas indispensables pour induire la signalisation Hh. A l'inverse, le domaine Fn3, les domaines Fn1 et/ou Fn2 et l'ancrage à la membrane sont requis. Parmi les caractéristiques spécifiques d'un récepteur : en l'absence des domaines Ig, Boc, à l'inverse de Cdo, nécessite une séquence de liaison supplémentaire située en N-terminal des domaines Fn. Boc possède également un site de clivage extracellulaire dont le rôle dans l'induction du signal Hh n'est pas encore connu. Enfin, Boc nécessite un ancrage intégral dans la membrane plasmique, alors que Cdo reste fonctionnel même s'il est ancré en périphérie de la membrane. D'après (Song et al., 2015).

A côté de la cascade intracellulaire classiquement associée à la voie Hh mettant en jeu les facteurs de transcription de la famille Gli, d'autres cascades de signalisation ont été récemment associées à l'activité des protéines Boc et Cdo. C'est d'abord l'analyse d'une activité indépendante de la signalisation Hh, l'induction de la différenciation myogénique des cellules C2C12, qui a contribué à une meilleure compréhension du rôle de chaque protéine et des mécanismes d'action associés (Bae et al., 2009; Kang et al., 2002). L'activité pro-différenciative

des myoblastes associée au complexe Boc/Cdo repose sur le domaine intracellulaire de Cdo alors que le domaine intracellulaire de Boc ne semble pas être indispensable dans ce contexte (Kang et al., 2002). La cascade de signalisation intracellulaire comporte l'association de la tyrosine kinase Abl sur un motif riche en résidus proline du domaine intracellulaire de Cdo. La kinase Abl activée permet ensuite l'activation de la p38 MAP kinase requise pour la différenciation myoblastique (Bae et al., 2009).

Un autre modèle informatif sur le plan mécanistique est celui de la différenciation neuronale et de la formation des dendrites induite par Shh via Boc. Dans ce cas, en réponse à Shh le domaine SH2 de la kinase Abl interagit avec le motif riche en proline (YXXP) conservé au niveau de la région 963-1037 du domaine intracellulaire de Boc. Cette interaction entraîne l'activation de la kinase c-Jun NH2-terminale (JNK). En accord avec cette cascade intracellulaire, l'invalidation ou la réduction de Boc diminue le niveau de JNK activée durant la différenciation neuronale. De plus, Abl augmente l'activation de JNK lorsqu'elle est co-exprimée avec Boc. Enfin, des anticorps anti-phospho-tyrosine étant capables d'immunoprécipiter Boc, on peut imaginer que Boc est vraisemblablement phosphorylé par une kinase qu'il reste à identifier (Vuong et al., 2017). D'autres tyrosines kinases telles que les membres de la famille des Src kinases (SFKs) ont été impliquées en aval du complexe Shh/Boc notamment dans le contexte du guidage axonal. Dans ce cas, l'activation des SFKs dépend de Smo, mais pas de l'induction de la transcription de Gli (Yam et al., 2009). Ainsi diverses kinases semblent être nécessaires pour réguler Boc et transmettre le signal destiné à contrôler la dynamique du cytosquelette.

2. Expression, activation et renouvellement

Les ARNs messagers de Boc et Cdo ont été initialement identifiés dans des lignées de cellules myoblastiques comme mentionné précédemment. Les profils d'expression des deux gènes se superposent d'ailleurs largement dans le système musculo-squelettique au cours du développement (Kang et al., 1998; Mulieri et al., 2002).

La distribution de Boc et Cdo a ensuite été analysée en détail chez l'embryon de souris au cours des étapes de gastrulation (E6.5-E8.0), neurulation (E8.5-E10.5), organogenèse (E11.5-E13.5) et vie foetale tardive (E14.5-E17.5) (Figure 20)

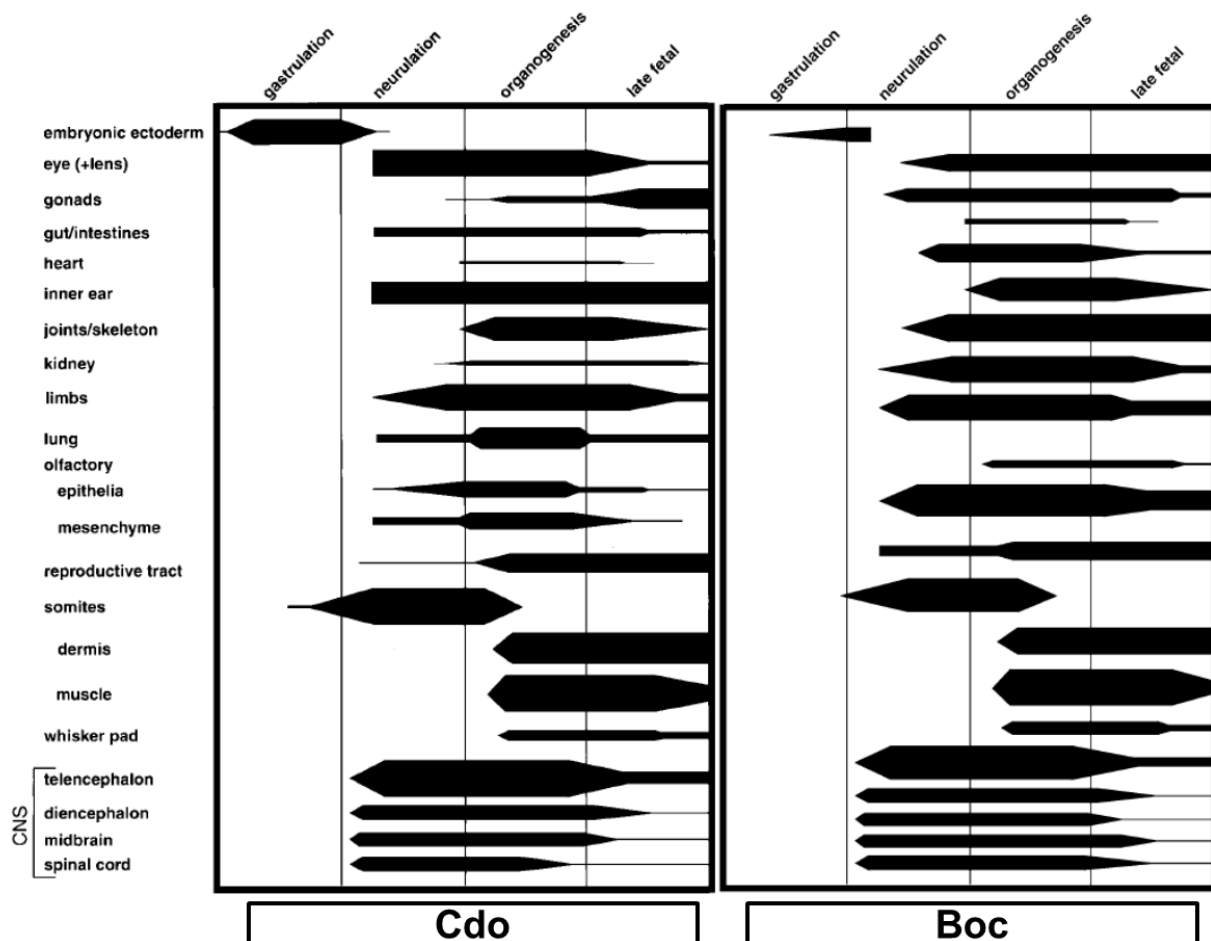


Figure 20: Profils d'expression de Cdo et Boc
Adapté de (Mullieri et al., 2000 ; Mullieri et al., 2002)

Boc est exprimé dans de nombreux tissus à partir de la fin de la gastrulation jusqu'à la fin de l'embryogenèse. Les domaines d'expression de Boc sont majoritairement des régions contenant des cellules en prolifération ou indifférenciées. De façon remarquable, le profil d'expression observé pour Boc (Mullieri et al., 2002) est très proche de celui décrit pour Cdo (Mullieri et al., 2000). Cependant plusieurs divergences discrètes sont à noter. Par exemple, l'expression la plus précoce de Cdo se situe entre E7.0 et E7.5 alors que celle de Boc n'est détectée qu'à partir de E8.0. Plus généralement, au cours du développement de nombreux tissus,

l'expression de Cdo est plus précoce que celle de Boc, mais l'expression de Boc persiste plus longtemps que celle de Cdo suggérant que les deux protéines peuvent fonctionner indépendamment l'une de l'autre. Une autre observation renforçant cette hypothèse est que durant le développement des muscles squelettiques et des reins, Boc est exprimé respectivement dans les myoblastes et le primordium métanéphrique, mais pas dans les cellules musculaires différenciées ou les tubules matures du tractus uro-génital où Cdo est détecté.

Des profils d'expression particuliers sont également à noter dans les organes sensoriels notamment dans l'œil où Cdo est exprimé dans toutes les structures oculaires à l'exception de l'épithélium pigmentaire rétinien alors que Boc n'est quasiment pas détecté sauf dans la cornée à un niveau très faible. De plus, dans l'épithélium de l'oreille interne, Cdo est fortement exprimé tout au long du développement alors que Boc n'est détecté que très tardivement (Mulieri et al., 2002; Mulieri et al., 2000)

Dans le système nerveux central, la plus forte expression de Boc et Cdo est détectée dans les régions dorsales chez la souris, le poulet et le poisson-zèbre (Aglyamova and Agarwala, 2007; Connor et al., 2005; Mulieri et al., 2002). La première cartographie a été réalisée chez la souris où l'expression de Boc apparaît entre les jours embryonnaires E8.0 et E8.5 dans deux régions dorsales du repli céphalique et sous forme d'un gradient antéro-postérieur le long de la partie dorsale des plis neuraux (Figure 21). A E9.5, l'expression est uniforme dans la partie dorsale de la totalité du tube neural. Pendant le reste du développement, l'expression de Boc est essentiellement restreinte aux régions dorsales du télencéphale et du diencéphale, ainsi que dans le cerveau médian, postérieur et la moelle épinière. Néanmoins, Boc est détecté à un faible niveau dans quelques structures ventrales telles que l'éminence ganglionnaire médiane et l'hypothalamus (Mulieri et al., 2002).

Dans le télencéphale dorsal, *Boc* est exprimé dans le neuroépithélium contenant les cellules progénitrices corticales depuis le stade E9.0 jusqu'au stade E13.5. A cette période, l'expression se limite à la zone ventriculaire. Aux stades embryonnaires plus tardifs, une forte expression de *Boc* est maintenue le long des ventricules dans les neuroblastes en prolifération (Mulieri et al., 2002). Cette expression se limite à l'éminence ganglionnaire latérale et à la zone ventriculaire corticale, mais reste complètement absente de l'éminence ganglionnaire médiane (Tucker et al., 2008).

Dans le diencéphale, *Boc* est initialement exprimé dans la région thalamique dorsale et dans la région hypothalamique ventrale dans les deux cas suivant un gradient dorso-ventral. A E13.5,

ce gradient persiste dans la région thalamique, mais seul un faible niveau d'expression de *Boc* peut être détecté dans l'hypothalamus. Aux stades plus tardifs, l'expression de *Boc* est encore plus restreinte et se limite à l'extrémité dorsale du diencephale (Mulieri et al., 2002).

Boc est également détecté dans le cerveau médian et postérieur. Comme dans le cerveau antérieur, la plus forte expression de *Boc* est limitée au neuroépithélium dorsal du cerveau médian. Cependant, un faible niveau d'expression peut être observé dans les structures ventrales. Dans la région antérieure du cerveau postérieur qui est à l'origine du cervelet (du côté dorsal) et du pons (du côté ventral), *Boc* est exprimé dans le neuroépithélium de ces deux structures, mais seul le cervelet exprime fortement *Boc*. Dans la partie postérieure du cerveau postérieur, qui est à l'origine de la médulla oblongata, une forte expression de *Boc* est détectée dans la partie dorsale. Comme dans le télencéphale, au-delà du stade E13.5, les régions du cerveau médian et postérieur exprimant *Boc* sont des zones contenant des neuroblastes en prolifération (Mulieri et al., 2002).

Dans la moelle épinière en formation, l'expression de *Boc* est également limitée aux structures dorsales. Entre E9.5 et E11.5, *Boc* est exprimé dans la zone ventriculaire selon un large gradient dorsoventral. Alors que le développement progresse, son expression se restreint aux régions médianes et dorsales. A E14.5, l'expression se limite à une bande étroite de cellules le long de la moelle épinière (Mulieri et al., 2002).

A l'issue de ces premières cartographies, la localisation de *Boc* a été caractérisée à l'échelle cellulaire dans le SNC, Ainsi, *Boc*, mais pas *Cdo*, se localise au niveau des neurones commissuraux différenciés de la moelle épinière (Okada et al., 2006) et dans les cellules ganglionnaires ipsilatérales de la rétine (Fabre et al., 2010). Durant le développement postnatal précoce, *Boc* est aussi détecté dans les précurseurs neuronaux, au niveau des couches granulaires externe et interne du cervelet (EGL et IGL) ainsi que dans les cellules de Purkinje (Izzy et al., 2011). Enfin, l'expression de *Boc* augmente dans le cortex entre le jour postnatal P4 et P14, dans les cellules neuronales callosales projetant au niveau des couches 2/3 du cortex (Harwell et al., 2012).

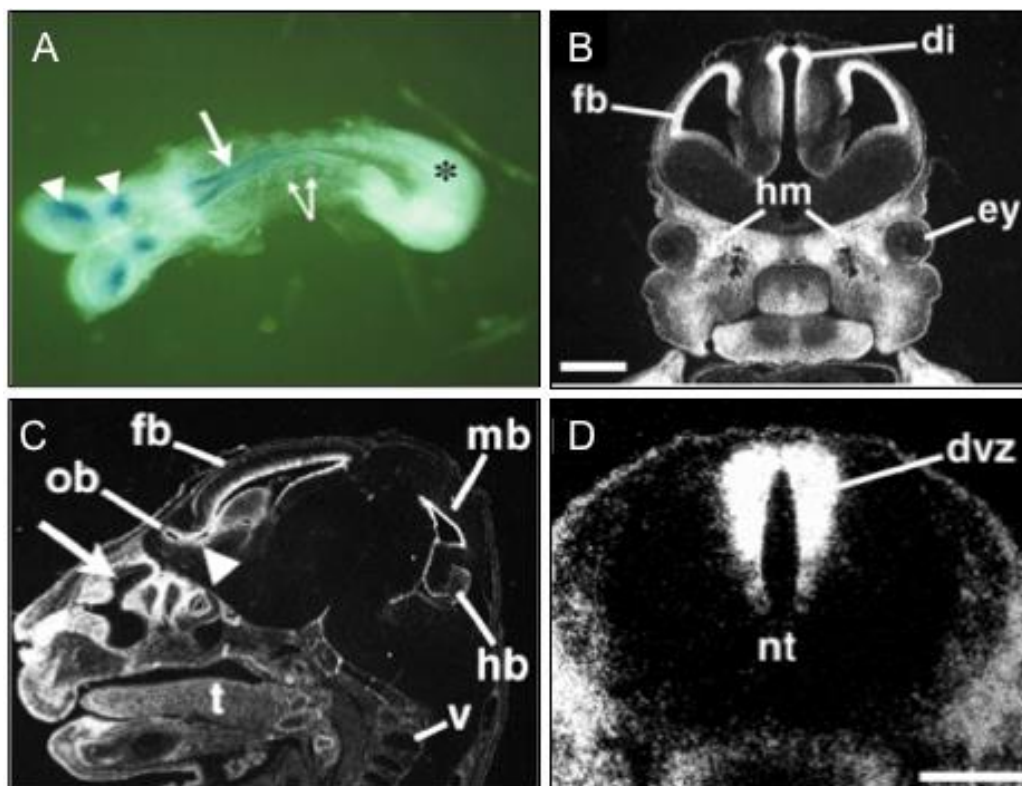


Figure 21: Expression de Boc dans le système nerveux central embryonnaire.

(A) Hybridation *in situ* in toto sur embryon de souris au stade E8.5 montrant l'expression de *Boc* dans le tube neural dorsal sous forme d'un gradient antéropostérieur (flèche) et dans le repli céphalique (pointes de flèches). Un faible niveau d'expression de *Boc* est également détecté dans les somites (double flèche). Aucune expression n'est détectée dans le mésoderme présomitique (astérisque). (B,C) Coupe frontale (B) ou parasagittale (C) de cerveau d'embryons à E12.5 indiquant une forte expression de *Boc* dans la partie dorsale du télencéphale, du diencephale, du cerveau médian et postérieur. Un haut niveau d'expression de *Boc* est détecté dans le mésenchyme olfactif (C, flèche) et dans le trajet de migration rostral (C, pointe de flèche). (D) Coupe frontale de moelle épinière d'embryons de souris à E12.5 montrant le niveau élevé d'expression de *Boc* dans la zone ventriculaire dorsale. fb, forebrain ; di, diencephalon ; hm, head mesenchyme ; ey, eye ; dvz, dorsal ventricular zone ; nt, neural tube ; v, vertebra. Adapté de (Mulieri et al., 2002).

La distribution majoritairement dorsale de *Boc* et *Cdo* dans le tube neural et par conséquent leur exclusion de la plupart des domaines de signalisation Hh suggéra très rapidement que *Boc* et *Cdo* sont des cibles transcriptionnelles négatives de la signalisation Hh. En accord avec cette hypothèse, l'invalidation de la signalisation Hh chez les mutants murins *Shh* et *Smo* accroît l'expression de *Cdo* et *Boc* qui s'étend alors notamment dans le tube neural ventral. A l'inverse, le profil d'expression normal de *Boc* et *Cdo* est perdu ou notablement réduit, lorsque la signalisation Hh est dé-réprimée dans le mutant *Ptc* ou activée de façon ectopique

suite à la surexpression d'un allèle constitutivement actif de Smo (Tenzen et al., 2006). De façon inattendue, dans le mutant *Gli3*, l'expression de *Boc* s'étend de façon ectopique dans la MGE et la région septale suggérant que Gli3 ne régule pas *Boc* en réprimant la signalisation Shh. Alternativement, l'activité répressive que Shh exerce sur *Boc* de façon Gli3-dépendante pourrait dépendre de la fonction activatrice de Gli3 (Tucker et al., 2008).

Cependant *Boc* et *Cdo* participent aussi à la signalisation Hh dans des domaines où la signalisation Hh est active comme l'indique l'expression élevée des cibles transcriptionnelles *Ptc* et *Gli1* à la limite ventrale du domaine d'expression de *Boc* dans le tube neural ou à la limite postérieure du domaine d'expression de *Boc* et *Cdo* dans le mésenchyme des membres. Ces observations font donc de *Boc* et *Cdo* des régulateurs positifs de la signalisation Hh qui en retour les régule négativement. La régulation négative de *Boc* et *Cdo* permet vraisemblablement de limiter l'activation de la voie à une région strictement définie (Tenzen et al., 2006). L'étude de *Boc* chez le poisson zèbre a permis de valider les mêmes conclusions et de montrer que *Boc* amplifie les signaux Hh en augmentant la concentration locale de Hh ou son temps de liaison à la cellule réceptrice (Bergeron et al., 2011; Connor et al., 2005). De façon remarquable, les autres protéines membranaires capables de lier les protéines Hh telles que *Ptc* ou *Hip* sont considérées comme des régulateurs négatifs de la signalisation Hh qui en retour les régule positivement. La signalisation Hh est ainsi très finement régulée dans les tissus où elle est active (Tenzen et al., 2006). Cependant, l'étude du mutant de poisson zèbre *umleitung* (*uml*) porteur d'une mutation inactivatrice de *Boc*, révèle pour *Boc* un rôle inattendu de régulateur négatif de la signalisation Hh dans la spécification et la prolifération des progéniteurs participant à la formation de la mâchoire inférieure. Dans ce tissu, l'expression élevée de *Boc* conduirait à piéger Shh et à limiter sa capacité à activer la chondrogenèse et la prolifération cellulaire (Bergeron et al., 2011).

3. Fonctions Biologiques de Boc

Après la caractérisation initiale de l'activité Hh-indépendante de *Boc/Cdo* dans le processus de différenciation myogénique (Kang et al., 2002), le développement et la caractérisation des souris mutantes *Boc* knockout (Okada et al., 2006) et l'identification du mutant de poisson zèbre *uml* (Bergeron et al., 2011) furent le point de départ d'un nombre croissant d'études destinées à identifier les rôles de *Boc* notamment dans la transmission des signaux Hh.

De façon remarquable, les souris mutantes Boc sont viables, fertiles et ne présentent pas de phénotype apparent. Néanmoins, l'analyse précise de ce mutant permet à présent d'impliquer Boc dans plusieurs activités induites par les protéines Hh au niveau des tissus périphériques ou du SNC. Je souligne ci-dessous des aspects importants de ses activités en développant en partie celles spécifiques du SN.

3.1. Boc s'associe à Cdo pour réguler positivement la différenciation myogénique

La première activité associée à Boc fut son implication dans la différenciation des myoblastes. Plusieurs arguments sont en faveur de cette conclusion. (i) *Cdo* et *Boc* sont co-exprimés dans les précurseurs musculaires dans l'embryon de souris et dans la lignée myoblastique C2C12; (ii) la surexpression rétrovirale de l'ADNc humain de *CDO* ou *BOC* dans les lignées myoblastiques C2C12 et F3 favorise la différenciation cellulaire; (iii) l'oncogène Ras inhibe la différenciation des myoblastes en diminuant l'expression de CDO et de BOC; (iv) CDO et BOC forment des hétérodimères en *cis* dans des lysats de cellules C2C12; (v) la surexpression de BOC ou CDO dans la lignée cellulaire de rhabdomyosarcome humain RD induit la différenciation de ces cellules normalement déficiente chez les enfants atteints de rhabdomyosarcome (Wegorzewska et al., 2003).

L'analyse détaillée du rôle de Boc dans la différenciation des myoblastes révéla que Boc interagit directement avec Cdo au niveau du domaine extra- et intracellulaire. Dans ce complexe membranaire, Boc est vraisemblablement impliqué par son domaine extracellulaire dans la reconnaissance d'un ligand en *trans* ou d'autres composantes nécessaires au complexe en *cis*, mais pas dans la signalisation intracellulaire conduisant à la différenciation des myoblastes qui est-elle assurée par le domaine intracellulaire de Cdo (Kang et al., 2002) via la formation d'un complexe intracellulaire avec la kinase Abl (Bae et al., 2009).

3.2. Boc est impliqué dans la régulation du poids et de la masse adipeuse

Malgré leur apparence normale, les souris Boc KO à l'âge de 32 semaines présentent un surpoids de 16% par rapport aux souris sauvages. Ce surpoids est vraisemblablement lié à une

augmentation progressive du tissu adipeux. En effet, le tissu adipeux blanc (dont l'accumulation est la principale caractéristique de l'obésité) est significativement augmenté tant au niveau sous-cutané que viscéral. Il en est de même du tissu adipeux brun qui présente chez les animaux mutants des marques de blanchiment évidentes.

Les mutants Boc ne sont pas hyperphagiques, mais présentent une diminution de leur température corporelle, de leur activité locomotrice spontanée, de leur quotient respiratoire ainsi qu'une dépense énergétique plus faible que les souris sauvages. Ces mutants développent par ailleurs une réponse exagérée à un régime riche en graisses avec notamment des perturbations de l'homéostasie glucidique, des taux de triglycérides et d'acides gras non estérifiés plus élevés que la normale, une accumulation des lipides hépatiques et une augmentation des enzymes associées au métabolisme lipidique favorisant l'adipogenèse. L'absence de Boc se traduit par une diminution de l'expression des gènes cibles de la signalisation Shh, Gli1 et Ptc, et une induction de l'expression de Cdo. Néanmoins, des allèles 'faibles' du gène BOC chez l'Homme sont proposés contribuer à l'accumulation du tissu adipeux blanc chez des individus possédant des prédispositions génétiques ou liées à leur style de vie (Lee et al., 2015).

3.3. Boc modifie le spectre de l'holoprosencéphalie chez des souris mutantes Gas1 et Cdo

Contrairement aux mutants Cdo et Gas1, les mutants Boc ne présentent pas de phénotype d'holoprosencéphalie (HPE), un déficit du développement notamment caractérisé par des anomalies de clivage du télencéphale. Chez l'Homme, les formes sporadiques d'HPE sont les plus fréquentes. Elles sont reliées à des anomalies chromosomiques aboutissant à des protéines mutées dans quatre voies de signalisation principales parmi lesquelles la signalisation Hh (Roessler and Muenke, 2010).

Cette pathologie peut se présenter sous des formes très variables dites alobaires, semilobaires et lobaires qui décrivent le niveau de clivage du télencéphale. L'étude récente de Seppala et collaborateurs (Seppala et al., 2014) a ajouté un rôle essentiel de Boc dans l'étiologie d'une forme unique d'HPE lobaire qui apparaît lorsque l'activité Gas1 est également perdue en plus de son rôle dans l'accroissement des phénotypes chez les souris Cdo^{-/-} (Zhang et al., 2011). Cette découverte s'est d'abord appuyée sur l'existence de différences discrètes dans la localisation de Boc, Cdo et Gas1 dans la région fronto-nasale de l'embryon de souris puis sur l'analyse des doubles mutants Boc^{-/-} Gas1^{-/-}. Cette analyse permet la mise en évidence d'un

phénotype jusque-là non détecté dans la région pré-maxillaire des mutants Gas1 ou Cdo comportant des incisives surnuméraires ou dupliquées, une fente labiale unilatérale, une fente palatine particulièrement sévère, une langue fendue et une cavité nasale fenestrée. Les incisives surnuméraires ont une architecture reflétant un arrêt apparent de développement compatible avec l'expression de Boc dans l'épithélium et le mésenchyme des incisives maxillaires en formation.

En plus de ces anomalies fronto-nasales, les double mutants ont un télencéphale normalement divisé, mais leur corps calleux ne se développe pas notamment au niveau de la ligne médiane, les ventricules sont élargis et la structure du diencephale désorganisée. La réduction du domaine d'expression des gènes cibles Ptc et Gli1 dans la ligne médiane de la face et du SNC en développement suggère que l'HPE lobaire est vraisemblablement secondaire à une diminution de la signalisation Shh et que Boc et Gas1 sont des co-récepteurs du morphogène. En raison de sa localisation sur le chromosome 3q13.2 humain, Boc est proposé être un locus modificateur pour l'HPE. En accord avec cette hypothèse, des délétions dans une région encadrant ce locus ont été précédemment associées à une agénésie du corps calleux et à des anomalies de la face (Genuardi et al., 1994; Lawson-Yuen et al., 2006), mais l'hypothèse reste à être validée.

3.4. Boc est impliqué dans la prolifération des progéniteurs des neurones granulaires du cervelet induite par Shh

Le rôle de la signalisation Shh dans le développement post-natal du cervelet a été décrit il y a plus de quinze ans. Secrété par les cellules de Purkinje durant la période embryonnaire tardive, puis tout au long de la vie post-natale (Traiffort et al., 1999), Shh induit la prolifération des progéniteurs des neurones granulaires du cervelet (CGNPs) (Dahmane and Ruiz i Altaba, 1999; Kenney and Rowitch, 2000; Wallace, 1999; Wechsler-Reya and Scott, 1999). Ces cellules issues de laèvre rhombique entre les jours embryonnaires E13.5 et E14.5, migrent et forment la couche germinale externe (EGL) du cervelet en développement (Roussel and Hatten, 2011). La prolifération des CGNPs dans l'EGL est suivie de leur différenciation en cellules granulaires et de leur migration au-delà de la couche des cellules de Purkinje afin de constituer la couche granulaire interne (IGL) présente dans le cervelet mature.

A E18.5, Boc est observé dans l'EGL en prolifération et plus faiblement dans la couche des cellules de Purkinje. Cdo se confine à l'extrémité de laèvre rhombique. A l'âge post-natal

P6, alors que Cdo n'est détecté que dans les plexus choroïdes, Boc est fortement exprimé dans les CGNPs en prolifération et plus faiblement dans les cellules granulaires différenciées en cours de migration ainsi que dans les cellules de Purkinje (Figure 22A).

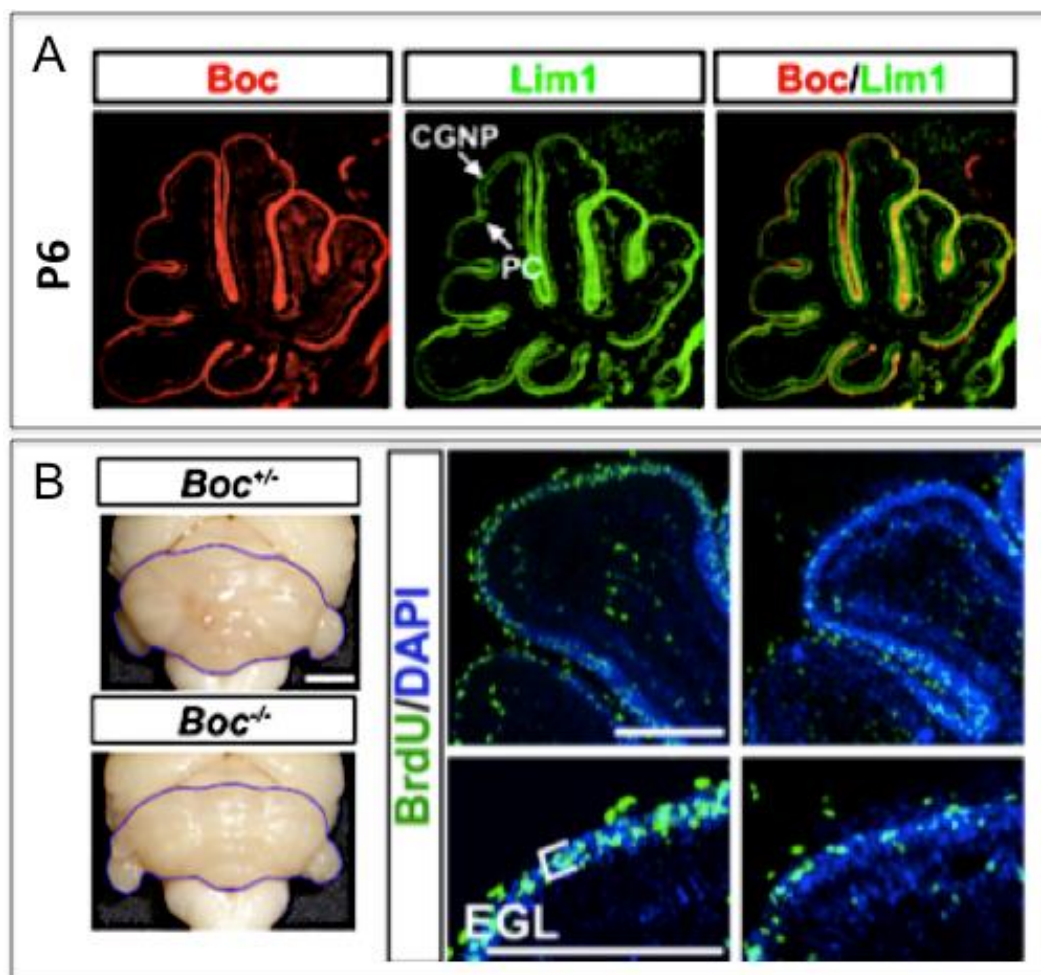


Figure 22: Le phénotype des souris Boc KO dans le cervelet en développement

(A) Immunofluorescence sur des coupes de cervelet de souris au jour postnatal P6 montrant la localisation de Boc dans les cellules exprimant Lim1, un marqueur des neurones granulaires du cervelet (CGNPs) et des cellules de Purkinje (PC). (B) La comparaison du cervelet adulte de souris Boc^{-/-} et Boc^{+/-} montre qu'en l'absence totale de Boc, la taille du cervelet est réduite en accord avec la diminution de la densité des CGNPs en prolifération, visualisée par le marquage anti-BrdU spécifique des cellules en division (Izzi et al., 2011).

Dans le mutant Boc, la réduction de la taille du cervelet est en accord avec la capacité de Boc à réguler de façon cellule-autonome la prolifération des CGNPs induite par Shh (Figure 22B). Ce phénotype est comparable à celui observé dans le mutant Gas1. Alors que les simples mutants ne conduisent pas à l'abolition complète de la réponse des GCNPs à Shh, le double

mutant *Boc*^{-/-} *Gas1*^{-/-} présente une absence complète de prolifération des CGNPs. Les données de co-immunoprécipitation ne vont pas dans le sens d'un complexe tripartite *Boc*/*Gas1*/*Ptc*, mais plutôt de complexes *Boc*/*Ptc* ou *Gas1*/*Ptc*. Par ailleurs, l'introduction de mutations ponctuelles de *Shh* au niveau de la glutamine E90 qui conduit à une forme de *Shh* capable de se lier à *Ptc* mais pas à *Boc*/*Cdo*/*Gas1* indique que la liaison de *Shh* à *Ptc* n'est pas suffisante à elle seule pour induire la prolifération des CGNPs (Izzi et al., 2011).

3.5. Boc favorise la progression des médulloblastomes vers des formes de tumeurs avancées

Le médulloblastome, la plus commune des tumeurs cérébrales malignes de l'enfant, résulte dans certains cas d'une suractivation inappropriée de la voie de signalisation *Shh*. Dans les médulloblastomes humains appartenant à cette sous-famille, l'expression de *BOC* est fortement induite. L'analyse génomique comparative d'une cohorte de médulloblastomes humains indique que 9% de ces tumeurs ont un gain du locus 3q13.2, la région chromosomique contenant le gène *BOC*. Des patients atteints du syndrome de Li-Fraumeni qui présentent une mutation somatique du gène codant pour la protéine tumorale *p53* et développent des médulloblastomes de la sous-famille *Shh* ont aussi une amplification de la région chromosomique contenant le gène *BOC*.

De même, dans les modèles murins de médulloblastomes, *Boc* est très fortement exprimé dans les CGNPs à la fois dans les formes pré-néoplasiques et dans les formes avancées. La surexpression de *Boc* dans des cultures de CGNPs augmente la prolifération de ces cellules. Inversement, l'inactivation de *Boc* réduit la taille des tumeurs et réduit leur progression vers une forme avancée. La régulation de la taille de la tumeur associée à l'activité de *Boc* est médiée par l'expression de gènes importants pour la prolifération cellulaire notamment *Cyclin D1* et *N-Myc*. De plus, en favorisant la signalisation *Shh*, *Boc* entraîne l'apparition d'un niveau élevé de dommages sur l'ADN. Ainsi, l'inactivation de *Boc* réduit l'endommagement de l'ADN, mais aussi l'incidence de la perte d'hétérozygotie de *Ptc*, un événement critique dans le contrôle de la progression de la tumeur vers une forme avancée (Mille et al., 2014).

3.6. Boc est le récepteur de Shh dans le guidage des axones commissuraux.

Les premières données reliant Boc et le guidage des axones du SNC sont issues d'études d'inactivation du gène chez le poisson zèbre en utilisant des oligonucléotides morpholino antisens. L'inactivation de *Boc* induite au moment de la neurulation, lorsque son expression se confine au cerveau dorsal, entraîne l'apparition de trajectoires aberrantes pour les axones du télencéphale en formation qui projettent en direction du cerveau ventral via le tractus supraoptique. Au lieu de suivre une trajectoire purement ventrale, ces axones se développent de façon anormale à travers le cerveau dorsal suggérant que Boc pourrait agir comme un signal chémorépulsif. Ainsi, les axones du tractus supraoptique sortent de ce tractus et cheminent le long du domaine contenant les cellules exprimant normalement Boc. Par ailleurs, les axones du tractus dorsoventral du diencephale et ceux du tractus de la commissure postérieure se croisent en l'absence de Boc alors qu'ils sont normalement séparés par des cellules neuroépithéliales exprimant Boc chez les animaux contrôles (Connor et al., 2005).

D'autres travaux menés en parallèle chez la souris mutante Boc révélèrent peu de temps après que Boc joue un rôle majeur en tant que récepteur de Shh dans le guidage des axones commissuraux du tube neural. En effet, les neurones commissuraux situés dans la partie dorsale du tube neural envoient leurs axones en direction, puis à travers la plaque du plancher au niveau de la ligne médiane ventrale. Deux molécules attirent ces axones dans la plaque du plancher : la nétrine-1 (Kennedy et al., 1994) et Shh (Charron et al., 2003). *Boc* et *Cdo* sont exprimés dans les progéniteurs des neurones commissuraux à partir de l'âge embryonnaire E11.5. Alors que l'expression de *Cdo* reste essentiellement dorsale, celle de Boc s'étend plus latéralement et ventralement y compris dans la région où les interneurons commissuraux post-mitotiques débutent leur différenciation. L'analyse du mutant Boc à E11.5 montre que les axones commissuraux sont très dispersés et envahissent la moelle épinière ventrale, un phénotype comparable à celui des animaux mutants *Smo* (Figure 23A). *In vitro*, l'inhibition de l'expression de Boc à l'aide d'ARN interférents dans des explants de moelle épinière dorsale compromet la capacité des axones commissuraux à être attirés vers des cellules COS surexprimant Shh et la Netrin-1 (Okada et al., 2006).

Grâce à la mise au point d'un test *in vitro* de guidage axonal permettant d'imager les neurones commissuraux alors qu'ils sont en train de répondre à un gradient bien défini de molécules chimiques, Yam et collaborateurs montrèrent que Shh transmet cette activité de guidage axonal en induisant l'activité des enzymes de la famille des Src kinases (SFKs)

permettant une réponse rapide ne faisant pas appel à la transcription de gènes. Cette réponse rapide dépend non seulement de Smo, mais aussi de Boc, puisque l'expression de Boc est requise pour conduire à une forte activation des enzymes SFKs en réponse à Shh (Yam et al., 2009).

3.7. Boc est indispensable à la ségrégation des axones ipsilatéraux des cellules ganglionnaires de la rétine

Dans le chiasma optique, le guidage des axones d'une sous-population de cellules ganglionnaires de la rétine (RGC) est également régulé par Shh via Boc (Fabre et al., 2010). La majorité des axones des RGCs croisent la ligne médiane et continuent leur progression vers le cerveau dans le tractus optique contralatéral. Cependant chez les animaux ayant une vision binoculaire, un nombre restreint de ces axones évitent le chiasma optique et continuent leur trajet de façon ipsilatérale. Shh est présent dans la zone chiasmatisée et sa capacité à induire la rétraction des axones des RGCs est connue depuis de nombreuses années (Sanchez-Camacho and Bovolenta, 2008; Trousse et al., 2001).

Néanmoins des données plus récentes utilisant des explants rétinien enregistrés par des approches d'imagerie en 'time-lapse' indiquent que cette activité de Shh est spécifique des axones exprimant *Boc*. Chez la souris, les RGCs exprimant *Boc* co-expriment les marqueurs *Zic2* et *EphB1* et correspondent à la sous-population des RGCs projetant du côté ipsilatéral. La rétraction des axones induite par Shh dépend de Smo, mais aussi de Boc comme indiqué par la diminution du nombre d'axones dans le tractus optique ipsilatéral (Figure 23B) dans les embryons mutants *Boc* (Fabre et al., 2010). D'une manière intéressante, Boc se révèle être un récepteur de guidage axonal bifonctionnel pour Shh. En effet, d'une part, il est nécessaire pour l'attraction des axones commissuraux de la moelle épinière (Okada et al., 2006) et d'autre part, il est indispensable pour la rétraction des axones des RGCs ipsilatéraux l'une et l'autre induites par Shh (Fabre et al., 2010). Ainsi, Boc (comme d'autres récepteurs du guidage axonal) est important pour transmettre les effets positifs (attraction) et négatifs (rétraction) de Shh. Ces effets opposés pourraient être dus à l'existence de facteurs intrinsèques ou extrinsèques capables de moduler la réponse induite par Shh ou à l'existence de différents complexes incluant le récepteur Boc.

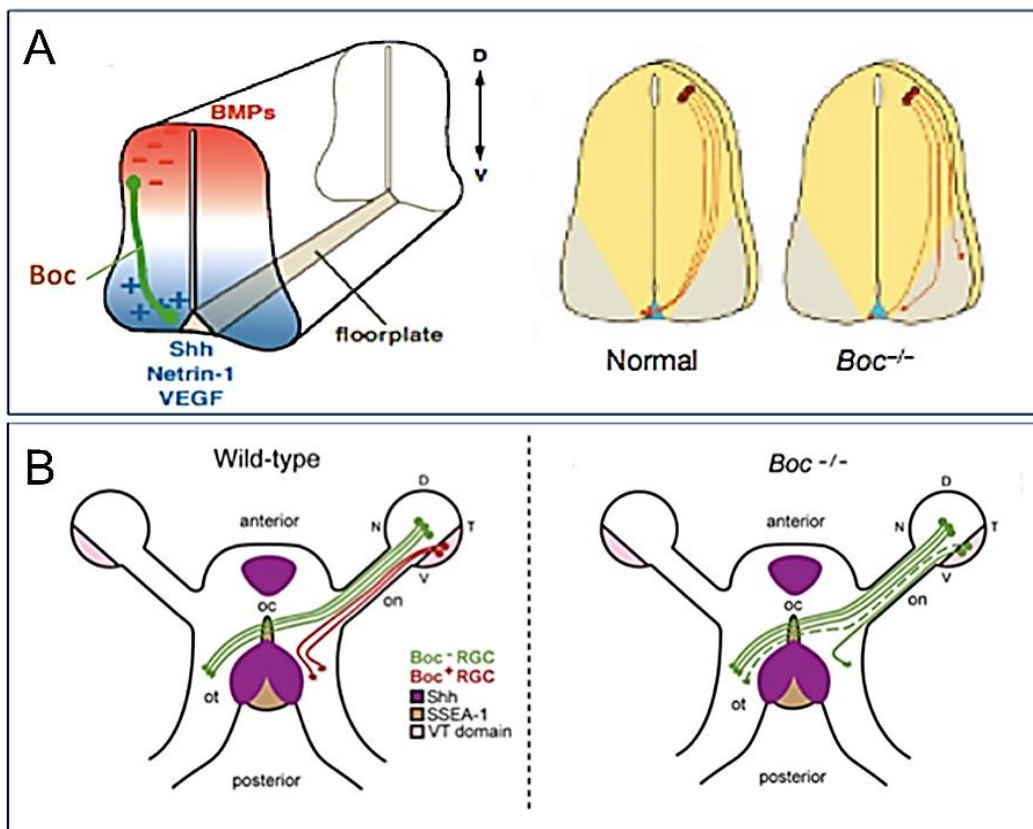


Figure 23: Le récepteur de Shh Boc est impliqué dans le guidage axonal dans le tube neural et le chiasma optique

(A) Au niveau du tube neural, les axones commissuraux exprimant Boc sont attirés par Shh, nétrine-1 et VEGF. Les axones commissuraux des souris sauvages partent de la partie dorsale de la moelle épinière (rouge) en direction de la plaque du plancher dans la partie ventrale (bleue). Dans les souris *Boc*^{-/-}, les axones dérivent latéralement avant d'atteindre la plaque de plancher.

(B) Au niveau du chiasma optique des souris sauvages, les axones exprimant Boc (rouge) proviennent de la rétine ventro-temporale (VT) et évitent le domaine d'expression de Shh dans le chiasma optique. Chez les souris *Boc* mutantes, les axones provenant de la rétine ventro-temporale n'expriment pas Boc et ne parviennent pas à détecter Shh au niveau de la ligne médiane. Au lieu d'être repoussés par Shh, ils traversent le chiasma et projettent de façon contralatérale (ligne en pointillés). Adapté de (Okada et al., 2006 ; Fabre et al., 2010).

3.8. Shh via son récepteur Boc participe à la formation des microcircuits corticaux durant le développement postnatal précoce.

Dans le cortex post-natal précoce, au cours de la période où la majorité des synapses se développent, les profils d'expression complémentaires de Boc et Shh ont incité Harwell et collaborateurs à engager une analyse fonctionnelle précise de Shh et de son récepteur Boc (Harwell et al., 2012). Dans le cortex cérébral, Boc est exprimé dans une population de neurones des couches II/III, IV et Va dans lesquelles Cdo n'est pas exprimé. Au cours du développement post-natal, l'expression de Boc s'accroît très fortement entre P4 et P14 et la majorité des neurones Boc+ co-expriment SATB2, un marqueur des neurones calleux de projection (Figure 24A). De façon intéressante, les neurones exprimant Shh sont essentiellement localisés dans la couche V du cortex post-natal (Figure 24B).

Contrairement aux neurones exprimant Boc, les neurones Shh+ co-expriment le facteur de transcription CTIP2, fortement exprimé dans les neurones corticofuges. L'invalidation conditionnelle de Shh dans les neurones corticofuges Emx1+ indique que Shh est requis pour la croissance de ces neurones et le développement des circuits corticaux. En parallèle, l'analyse des mutants Boc indique une réduction significative de la densité des épines dendritiques, de la croissance et de la complexité des dendrites spécifiquement dans la couche V des animaux mutants. En utilisant une approche d'optogénétique par électroporation de la canal-Rhodopsine-2 dans les neurones de la couche II/III, Harwell et collaborateurs montrèrent que les courants post-synaptiques excitateurs dans la couche V sont amplement réduits en cas de perte du ligand Shh ou de son récepteur Boc. Gli1 n'étant pas détecté dans les neurones du cortex post-natal, il est possible que la transmission du signal Shh via Boc mette en jeu des voies intracellulaires non-canoniques ou alternativement que les astrocytes du cortex cérébral exprimant Gli1 interviennent dans la régulation de la formation des synapses (Harwell et al., 2012).

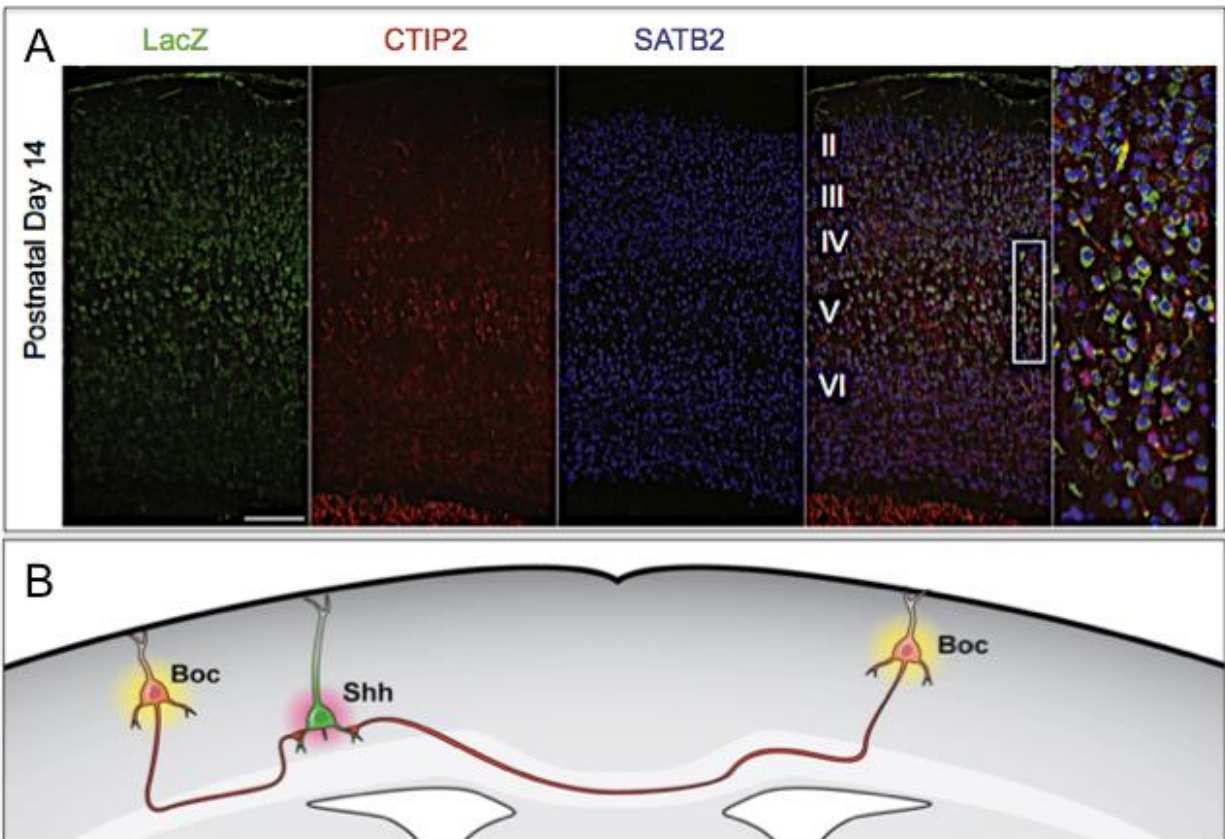


Figure 24: Shh et son récepteur Boc régulent la formation spécifique des synapses pendant le développement cortical.

(A) Des sections coronales de Boc +/- LacZ-ires-PLAP au jour postnatal 14 indiquent l'expression de LacZ (Boc) principalement dans les neurones callosaux SATB2 positifs situés dans les couches II, III, IV et Va. (B) L'expression de Shh par les neurones corticofuges de la couche 5 guide la formation du circuit cortical en collaborant avec les neurones de projections callosaux exprimant Boc au niveau de la couche II/III du cortex. Adapté de (Harwell et al., 2012)

Objectifs

Au cours des dernières années, des progrès significatifs ont été réalisés dans la prévention des épisodes de démyélinisation qui surviennent au cours de la sclérose en plaques, mais beaucoup moins dans le domaine de la régénération de la myéline détruite. L'identification des mécanismes moléculaires et des voies de signalisation impliquées dans le processus qui conduit spontanément à la réparation de la myéline, mais aussi l'investigation du rôle des différents types cellulaires mis en jeu sont essentielles à l'élaboration de nouvelles approches thérapeutiques des maladies démyélinisantes

Les données obtenues avant mon arrivée par l'équipe où j'ai effectué ma thèse, ont permis d'identifier la protéine Shh comme étant un facteur nécessaire à la remyélinisation et jouant un rôle positif d'une part en augmentant la survie, la prolifération et la différenciation des OLs et d'autre part en réduisant l'astroglie et l'infiltration des macrophages (Ferent et al., 2013). Cependant, les mécanismes moléculaires mis en jeu restent encore largement méconnus. Mon travail de thèse a permis de focaliser nos investigations sur le rôle de l'un des récepteurs de Shh, Boc, notamment en raison de sa forte induction transcriptionnelle pendant le processus de réparation de la myéline. Ce projet repose sur l'utilisation du mutant murin Boc knockout précédemment développé (Okada et al., 2006) et vise principalement à :

- i. Caractériser le rôle de Boc dans la production des cellules du lignage oligodendrocytaire et la myélinisation postnatales précoces.
- ii. Déterminer les conséquences de l'absence de Boc sur le maintien du lignage oligodendrocytaire et de la myéline dans le cerveau des animaux adultes.
- iii. Caractériser la capacité de remyélinisation des animaux démyélinisés par injection stéréotaxique de lysolécithine dans le corps calleux.
- iv. Evaluer l'implication de Boc dans la réaction gliale inflammatoire étroitement associée au mécanisme de régénération de la myéline (*travail de collaboration avec le laboratoire INSERM U1217-CNRS UMR5310 – Lyon - France*)

Résultats

Le manuscrit suivant est le fruit de données originales répondant aux trois premiers objectifs du projet et permettant de caractériser l'implication de Boc au cours du développement de la myéline et de sa réparation dans le système nerveux central. Nos principaux résultats peuvent se résumer de la façon suivante :

1) Tout d'abord, nous caractérisons l'expression de Boc au cours des quatre premières semaines post-natales pendant lesquelles la maturation des progéniteurs oligodendrocytaires (OPCs) et la production de la myéline ont lieu. L'étude menée en parallèle dans deux régions cérébrales (le cervelet et le cerveau antérieur) où le rôle de la signalisation Hedgehog dans le lignage oligodendrocytaire commence à être connu, montre qu'en dehors de son expression neuronale précédemment rapportée, Boc est exprimé dans une population restreinte d'oligodendrocytes (OLs) matures uniquement dans le cerveau antérieur.

2) Ensuite, nous montrons qu'au moment où la myélinisation des axones est maximale (autour du quinzième jour post-natal), l'absence de Boc dans la lignée Boc KO induit une augmentation de la production de myéline à la fois dans le cervelet et dans le cerveau antérieur. Cette augmentation est cohérente avec l'augmentation de la densité des OLs matures dans le cervelet, mais est vraisemblablement liée à un mécanisme différent dans le cerveau antérieur où la densité des cellules appartenant au lignage oligodendrocytaire n'est pas significativement modifiée par l'absence de Boc.

3) De plus, nos résultats révèlent que Boc contrôle négativement la spécification des OPCs (un processus péri-natal dans le cerveau antérieur). Par ailleurs, Boc est positivement impliqué dans la prolifération de ces cellules et constitue à l'inverse un frein à leur maturation/différenciation en particulier dans le cervelet. Ces données suggèrent que Boc pourrait transmettre les effets induits par Sonic Hedgehog sur le lignage oligodendrocytaire.

4) Dans le cerveau des animaux adultes, l'absence de Boc déséquilibre les densités relatives des OPCs et des OLs matures dans le cerveau antérieur, en particulier dans le cortex et le corps calleux, aboutissant à une augmentation des OLs matures et à la persistance de l'hypermyélinisation précédemment détectée au cours du développement post-natal.

5) L'analyse ultrastructurale de la myéline dans le corps calleux des animaux Boc KO nous conduit à suggérer que Boc constitue un frein à la myélinisation des axones de petit diamètre et qu'il régule l'épaisseur de la gaine de myéline autour de cette même population d'axones

6) Enfin, en utilisant le modèle de démyélinisation par injection stéréotaxique locale de lysolécithine dans le corps calleux des souris, nous montrons que Boc est un régulateur positif de la maturation des OPCs et qu'il contribue à la régression de la taille de la lésion au cours du processus régénératif. Ces effets mimant ceux de Shh, Boc pourrait donc transmettre les effets réparateurs du morphogène. Cependant Boc et Shh présentent un effet opposé sur la densité des cellules microgliales.

Le dernier volet du projet concernant l'évaluation de l'implication de Boc dans la réaction gliale inflammatoire nécessaire à la réparation de la myéline nous a conduit à croiser les animaux homozygotes de la lignée Boc KO avec les animaux d'une lignée exprimant un rapporteur fluorescent inductible sous le promoteur Cx3cr1 exprimé par les cellules microgliales. Ce projet mené en collaboration avec un laboratoire INSERM à Lyon consiste pour notre part à fournir à nos collaborateurs des animaux Boc^{-/-};Cx3cr1-CreER-YFP et Boc^{+/+};Cx3cr1-CreER-YFP traités par le Tamoxifen et alimentés pendant 12 semaines par une nourriture supplémentée ou non par 0,2% de cuprizone. Celle-ci permet une démyélinisation notamment du cortex cérébral, qui contrairement au corps calleux, est accessible à l'imagerie sur l'animal anesthésié. L'analyse de ces animaux est complètement externalisée dans le laboratoire avec lequel nous collaborons. Des enregistrements de la microglie seront réalisés sur les souris anesthésiées afin de mettre en évidence les conséquences de l'absence de Boc sur cette population cellulaire au niveau des régions démyélinisées.

Unique Roles for Sonic Hedgehog Receptor, Boc, in Regulating Myelin Production in The Central Nervous System

Mary Zakaria et al.

U1195 Inserm and University Paris-Sud and University Paris-Saclay, Kremlin-Bicêtre, France

Abstract

Starting during the early postnatal period, the production of myelin that surrounds the axon is a highly dynamic and fine-tuned process mediated by the oligodendrocytes in the central nervous system (CNS). One important feature of myelin formation is its maintenance throughout the adult life. In the healthy or pathological brain, myelin remodeling or repair takes place in the purpose of cognitive adaptation or tissue regeneration. In order to maximize the efficiency of axonal conduction, an optimal ratio exists between axon size and myelin thickness. Here, we report that the type I transmembrane protein Boc (Brother of cell-adhesion-molecule-related/downregulated by oncogenes) related to axon guidance receptors of the immunoglobulin superfamily, may act as a brake to control the myelination level in the early postnatal and adult brain. Boc may also participate in the determination of the diameter threshold of axons which are myelinated. Interestingly, in the context of myelin repair, Boc promotes the maturation of oligodendrocyte progenitors instead of preventing it as observed during the development. In conclusion, Boc stands as a regulator of CNS myelin production likely endowed with a dual activity in the transmission of the Sonic hedgehog signaling according to the developmental or pathological context.

Key words: Myelin, oligodendrocyte, axon, hedgehog signaling.

Myelination in vertebrates is fundamental for the rapid conduction of action potentials along the axons. In the central nervous system (CNS), this complex process relies on reciprocal interactions between neurons and oligodendrocytes (OLs), the cells synthesizing myelin. During development, the thickness and the length of the myelin segments are optimized to achieve a fine-tuning of the conduction speed along the myelinated axons (Fields, 2008; Tomassy et al., 2016; Ullen, 2009). In the CNS, which comprises myelinated and unmyelinated axons, even small calibre axons can be myelinated (Hildebrand et al., 1993; Lee et al., 2012). Recently, magnetic resonance imaging has allowed the detection of variations in the structure of the white matter in people performing complex visuomotor skills such as juggling (Scholz et al., 2009) or piano practise (Bengtsson et al., 2005). In the same line, learning complex motor task requires the formation of new myelin sheaths in mice (McKenzie et al., 2014). Thus, adaptative myelination is a major aspect of neural plasticity.

Demyelinating insult, which can occur upon injury or during demyelinating diseases, has been shown to have a tremendous functional impact. A spontaneous process of myelin regeneration impeding axon degeneration has been observed in the adult brain but this process is not always efficient and may fail for still poorly understood reasons. In this context, the identification of the factors / pathways contributing to myelin production during development and in the adult brain in physiological and pathological conditions is extremely important (El Waly et al., 2014; Lopez Juarez et al., 2016). Many factors and morphogens have been shown to be key regulators of oligodendrogenesis and myelin formation in both contexts as for example the secreted molecule Sonic hedgehog (Shh) (Feret et al., 2013; Tong et al., 2015).

Cell adhesion molecules are obvious candidates for the transmission of cues between the OLs and the axon to be myelinated as previously shown for the polysialylated form of the neural cell adhesion molecule (PSA-NCAM) acting as an inhibitor of myelination at the surface of axons (Coman et al., 2005) or more recently for the integrin receptors which play an

instructive role to initiate myelination in the CNS (Camara et al, 2009). The type 1 transmembrane receptor Boc (Brother of cell-adhesion-molecule-related/downregulated by oncogenes so-called Cdon), related to the cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily, has initially been implicated in enhancing muscle differentiation (Kang et al., 2002). However, Boc mostly functions at the cell surface by binding Shh and by transducing the Shh signal (Couchet and Polleux, 2012; Yam and Charron, 2013) well-known for its ventralizing effects in the developing CNS (Ferent and Traiffort, 2015; Fuccillo et al., 2006). Nevertheless, the Boc mutant mice do not exhibit the lethal phenotypes observed in the other mutants targeting the key elements of Shh signaling including holoprosencephaly and ventralization of the neural plate (Fuccillo et al., 2006). Instead these dramatic phenotypes, the Boc mutant mice are viable and display a series of discrete phenotypes related to Shh signaling such as misguided axons (Okada et al., 2006), decrease of the cerebellum size (Izzi et al., 2011) or abnormal microcircuitry in the cerebral cortex (Harwell et al., 2012).

Here, we further investigated the contribution of Boc function in the essential process of myelination in the CNS. Significantly, we find evidence that Boc controls the myelination level of the early postnatal and adult brain. Boc is also involved in the establishment of the thickness of myelin sheaths according to the diameter of the axon, exclusively around the smallest calibre axons and, it participates in the mechanism determining the axon diameter threshold required for initiating myelination. In addition, we provide arguments indicating that the absence of functional Boc may be deleterious for the spontaneous ability of the brain to repair myelin both by preventing OL maturation and altering the response of microglia to the demyelinating events.

Materials and methods

Animals

The *Boc* knockout mouse strain (Okada et al., 2006) was received and maintained on a C57BL/6 background. Surgeries and perfusions were performed under ketamine (100 mg/kg) / xylazine (10 mg/kg) anesthesia. Adult C57BL/6 and homozygous *Boc* knockout males were used for evaluating the impact of *Boc* disruption on the oligodendroglial lineage / myelin status and on remyelination. For developmental studies, males and females were used until postnatal age P15 whereas only males were selected for the later time points. All animal studies were carried out according to the guidelines established by the European Communities Council Directive (86/806/EEC) for the care and use of laboratory animals. All experimental and surgical protocols were approved by the Regional Ethics Committee CEEA26, Ministère de L'Education Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. Animals were housed under standard conditions with access to water and food *ad libitum* on a normal 12 hr light/dark cycle.

LPC-induced focal demyelination.

The lysolecithin (LPC)-induced demyelination was as previously described (Feret et al, 2013). Briefly, demyelinating lesions were induced unilaterally by stereotaxic injections of 2 μ l of 1% LPC (Sigma) into the right corpus callosum of WT and *Boc*-deficient male animals by using a Hamilton syringe specifically dedicated for neural surgery. The injection was performed at the following coordinates (to the bregma): anteroposterior (AP) +1.3 mm, lateral +1 mm, dorsoventral (DV) -2.2 mm. Mice were sacrificed at different survival time points: 5, 10, 15 and 21 days postlesion (dpl). The brain was removed, frozen in liquid nitrogen and cryostat sections (16 μ m) were performed. 3-8 mice were used per time point for each genotype.

Organotypic slice cultures.

Slice cultures were processed as described previously (Hussain et al., 2011). Briefly, using a

McIlwain tissue chopper, 350 μm thick sagittal cerebellar slices of postnatal day 0–1 pups from each genotype were cultured on Millicell-CMTM culture inserts (Millipore) displaying a 0.4 μm pore size. Slices were maintained in culture in a six-well plates containing 1 ml of culture medium at 35°C in a 5% CO₂ atmosphere. Cultures were kept for 7 or 14 days *in vitro* (DIV) and then fixed for 1 hr with 4% paraformaldehyde (PFA) in phosphate buffer saline (PBS). Slices were blocked with 0.1M Lysine solution in PBS supplemented with gelatin and 0,25% Triton X-100 for 1 hr at room temperature, followed by an overnight incubation with the primary antibodies at 4°C. Confocal Z-stacks were acquired (9-12 slices) and only slices with intact cytoarchitecture were chosen for analysis.

Primary mixed glial cell cultures

Primary glial cell cultures were prepared from newborn mouse P1-P2 brain hemispheres derived from each genotype as described previously (Feutz et al., 2001). Briefly, meninges were removed, and cerebral hemispheres were mechanically dissociated in DMEM supplemented with 10% calf serum, penicillin (50 U/ml), and streptomycin (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (Thermo Fisher Scientific). The cell suspension was plated in a six-well plates containing 1.5 ml of cultured medium coated with 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ poly-l-lysine (Sigma). Cultures containing astrocytes, oligodendrocytes and microglia cells were then incubated in 5% CO₂ and 95% air in a humidified atmosphere (90%) at 37°C. The cultures were kept for 12 DIV. Cells were fixed for 20 min with 4% PFA in PBS, then permeabilized with 0.025% Triton X-100 for 10 min and blocked for 1 hr with the Sea Block buffer (Thermo Fisher Scientific) before an overnight incubation with the primary antibodies at 4°C.

Histological procedures.

Except for the demyelinated animals, the other mice were deeply anesthetized before perfusion with a 4% PFA/PBS solution. Brains were post-fixed with PFA for 4 h and incubated overnight in a 30% sucrose solution. Hemispheres were then freezed into a Shandon Cryomatrix and

stored at -80°C . Frontal sections (for LPC model) and sagittal sections (for basal characterization) from early postnatal and adult brains were carried out. For immunohistochemistry the primary antibodies were as follows: anti-Boc (goat polyclonal, R&D), anti-NeuN (mouse monoclonal, Millipore), anti-Calbindin D-28k (mouse monoclonal, Swant), anti-Sox2 (goat polyclonal, Santa Cruz), anti-Olig2 (Rabbit polyclonal, Millipore; mouse monoclonal, Millipore), anti-myelin basic protein (MBP) (Rabbit polyclonal, Millipore), anti-NG2 (rabbit polyclonal, Millipore), anti-Adenomatous Polyposis Coli (APC/CC1) (mouse monoclonal, Calbiochem), anti-Ki67 (mouse monoclonal; BD Pharmingen), anti-BrdU antibody (Rat monoclonal, Abcam), anti-Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) (Rabbit polyclonal, Dako; mouse monoclonal, Sigma). The isolectin GS-IB4 conjugated to Alexa Fluor® 568 (Thermo Fisher Scientific) was used for microglia detection. The secondary antibodies were: donkey anti-goat Alexa 488, anti-mouse 647, and anti-Rabbit 546 (Thermo Fisher Scientific); goat anti-rabbit cyanine 3 conjugated (Jackson ImmunoResearch); goat anti-mouse Alexa 488, anti-rabbit Alexa 633 (Thermo Fisher Scientific).

In situ hybridization experiments were performed as previously described (Ferent et al, 2013). The Boc riboprobe was kindly provided by Dr R.S. Krauss (Mount Sinai, New York, USA).

Image Acquisition and Analysis. Images were taken using the microscope analyzing system Axiovision 4.2 (Carl Zeiss, Inc.), the confocal Zeiss LSM 510-Meta Confocor 2 and Leica TCS SP8 with LAS AF software. Analyses were performed with ImageJ software. Immunofluorescent-positive cells were counted in one every other 5 sections throughout the whole demyelinated lesion per mouse and averaged for each animal. Cell counts are the result of at least 3 animals or independent cultures and are expressed per surface unit. MBP and NG2 immunofluorescence was expressed as the percentage of the studied area. The lesion surface was determined by measuring the area of the nuclear densification (correlated with myelin loss visualized by MBP or PLP staining) one every other 5 slices through the whole demyelinated

lesion per mouse. For the 21 dpl time point, the lesion surface was determined as the area of the corpus callosum devoid of small chains of cells compared to the unlesioned corpus callosum.

Electron microscopy. Three 12 week-old male mice per genotype were perfused with 2% PFA and 2% glutaraldehyde. Ultrathin slices of resin embedded, osmium post-fixed corpus callosum (related to the genu part) were examined using transmission electron microscope (1011 JEOL) equipped with a Gatan digital camera. The g ratio (the ratio between the axon diameter and fiber diameter corresponding to myelin sheath + axon diameter) was estimated by measuring the minimum and maximum axon diameter and fiber diameter for each axon using ImageJ software. At least 50 randomly chosen myelinated axons were evaluated for each animal.

RT-qPCR analysis. At least four animals per group were sacrificed by decapitation. Brains were dissected and frozen in liquid nitrogen for further processing. Total RNA was isolated by using the Trizol Technique (Thermo Fisher Scientific) and RNeasy Mini Kit (Qiagen). Reverse Transcription was performed using the High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems). Quantitative real-time PCR was carried out by using the Power SYBR-Green Master mix (Applied Biosystems) and gene expression was analyzed with the 7300 Systems SDS Software (Applied Biosystems) normalized to reference genes GAPDH and Cyclophilin A. The primers used were as follows:

GAPDH: Fwd: 5'-GTCGGTGTGAACGGATTTGG-3',

Rev: 5'-GACTCCACGACATACTCAGC-3'

CycloA: Fwd: 5'-GTCAACCCCACCGTGTTCTT-3',

Rev: 5'-CTGCTGTCTTTGGGACCTTGT-3'

MBP: Fwd: 5'-GTACAAGGACTCACACACGAGAACTAC-3',

Rev: 5'-TTGAAGAAATGGACTACTGGGTTTT-3'

Olig2: Fwd: 5'-GCAGCGAGCACCTCAAATCT-3',

Rev: 5'-GGGATGATCTAAGCTCTCGAATG-3'

Gli1: Fwd: 5'-ACAAGTGCACGTTTGAAGGCTGTC-3',

Rev: 5'-GCTGCAACCTTCTTGCTCACACAT-3'

Western blotting. The total protein isolation procedure from brain tissue was performed from the phenol-ethanol organic layer left over after the RNA and DNA isolation steps by the Trizol Reagent (Sigma), adapted from the original procedure described by the supplier. The protein extract concentration was measured using the BCA method (Thermo Fisher Scientific). Proteins (25-35 μ g) were separated using a 12% polyacrylamide gel followed by blotting onto a methanol activated PVDF membrane using a dry blotting system (Pierce G2 Fast Blotter). Blots were incubated with rabbit antibody anti-MBP (1:2000, Millipore), and with mouse antibody anti β -actin (1:200000, Sigma). Goat anti-mouse and anti-rabbit Dylight-conjugated secondary antibodies were used (Thermo Fisher Scientific) and membranes were scanned with the Odyssey InfraRed Scanner (Li-Cor). The bands of interest were quantified by measuring their integrated intensities using the Odyssey software V3.0. The densitometric values were normalized to β -actin expression.

Statistical analysis. For cell counts, the mean number of immunopositive cells was evaluated per image area to determine the density of cells/surface area. Data are expressed as means \pm S.E.M. Statistical analysis was performed with GraphPad Prism 4.0. The significance of differences between means was evaluated by the Mann-Whitney test for two independent group comparisons. The levels of significance were * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Results

Boc-expressing cells in the postnatal developing brain are mostly neurons and to a much lower extent cells of the OL lineage

Given OL heterogeneity throughout the CNS, we first analyzed Boc expression in the caudal and rostral brain, specifically in the early postnatal cerebellum and forebrain, from P0 to P30 which correspond to an intense period of oligodendrocyte progenitor (OPC) production and maturation. Quantitative RT-PCR revealed a dynamic regulation of *Boc* transcription in both structures, with a significant up-regulation starting from P8 and peaking by P15 and P30 in the cerebellum and forebrain, respectively (Fig. 1A,B). At the cellular level, Boc protein was detected as previously shown (Izzi et al., 2011) in the external granule cell layer, the site where the cerebellar granule neuron progenitors proliferate in a Shh-dependent manner and in the calbindin⁺ Purkinje cells synthesizing Shh (Fig. 1C) (Feret and Traiffort, 2015). In contrast, Boc was not detected in cells of the OL lineage expressing the transcription factor Olig2 (Fig. 1C). In the forebrain, Boc-expressing cells were observed in layers II to V of the cerebral cortex as shown in P15 animals (Fig. 1D) and most of these cells ($97.1 \pm 1.0\%$) co-expressed the marker of mature neurons, NeuN (Fig. 1F) in agreement with previously published data (Harwell et al, 2012). Nevertheless, a small fraction of Boc⁺ cells ($2.6 \pm 1.1\%$) expressed the OL lineage marker Olig2 (Fig. 1D,F). As a whole, in the cerebral cortex, Boc-expressing cells represented $58.5 \pm 4.9\%$ of the neuron population and $2.2 \pm 0.7\%$ of the OL population (Fig. 1G,H). In addition, the percentage of Boc⁺ cells expressing Olig2 further decreased representing only $1.2 \pm 0.6\%$ of the Olig2⁺ cells in the P30 cerebral cortex (not shown). In the P15 corpus callosum, we detected a small number of Boc⁺ cells. $75.7 \pm 4.3\%$ of these cells belonged to the OL lineage as indicated by the co-expression of the Olig2 marker. However, these cells represented only $14.8 \pm 2.1\%$ of the Olig2⁺ cells of the corpus callosum (Fig. 1H). As in the cortex, Boc⁺ cells became quite undetectable in the corpus callosum at P30 (not shown). Interestingly, most if not

all Boc⁺ Olig2⁺ cells were mature OLs expressing the *adenomatous polyposis coli* (APC) (Fig. 1E). Moreover, at high magnification, the Boc antibody allowed the detection of thin filaments within the corpus callosum (Fig. 1E) likely reflecting the axonal expression of Boc as previously reported by using the transgenic mouse expressing a reporter gene in the Boc locus (Harwell et al., 2012). Altogether these data indicate that during the period of early postnatal myelination, Boc displays mostly a neuronal expression while its transient expression detected in a highly restricted population of mature OLs progressively disappears at the end of this period.

Boc controls myelin production in the developing CNS

We investigated the consequences of Boc disruption on the production of myelin by comparing Boc mutant with control animals. The kinetics of myelin binding protein (MBP) transcription was first determined in the cerebellum and forebrain between P0 and P30 by using quantitative RT-PCR. In both areas, the absence of Boc transiently up-regulated *MBP* transcripts at P8 stage when myelination has barely started in the wild-type (WT) mice (Dai et al, 2015). This induction occurred after a small and transient downregulation observed at P0 in both regions, but nevertheless only significant in the forebrain (Fig. 2A,B). To evaluate whether *MBP* up-regulation resulted in a higher amount of protein, we prepared cerebellum and forebrain homogenates from P15 animals and performed Western blot analysis to detect MBP expression as an indicator of myelin contents. MBP immunoreactivity was significantly increased in both regions of the Boc mutants compared to the WT mice (Fig. 2C,D) suggesting that Boc may be a negative regulator for the production of MBP. Then, we analyzed the densities of Olig2⁺ OL lineage cells and mature APC⁺ OLs in slices from P15 animals at the level of the cerebellum and forebrain. A significantly higher density of Olig2⁺ cells was detected in the cerebellum and appeared to be related to the increase in the density of mature APC⁺ OLs as shown by the

comparable order of magnitude of both increases. In contrast, Olig2⁺ and APC⁺ cells did not differ significantly in the cerebral cortex and corpus callosum (Fig. 2E-G). These data suggest that Boc may be involved in the control of myelination in both the caudal and rostral brain. Since Boc is not detected in the OL lineage in the cerebellum, the increase in the number of mature OLs in this region appears to be the consequence of the absence of Boc in the neurons and may account for the higher level of MBP expression. A different mechanism is likely implicated in the hypermyelination observed in the forebrain.

Boc is involved in the control of OPC specification, proliferation and differentiation in the early postnatal brain

First, we used neonate forebrain slices to address OL specification in the presence and the absence of Boc (Kessar et al., 2006). At P0-P1, in both genotypes, we observed Olig2⁺ cells with high or low Sox2 expression reflecting pre-OPCs and presumably cells starting to differentiate into OPCs, respectively (Fig. 3A; Dai et al., 2015). The quantification of pre-OPCs indicated a slight but significant increase in the density of these cells in the mutant compared to the WT animals (Fig. 3A,B) suggesting that Boc negatively regulates OPC specification in the forebrain.

Then, we investigated the impact of Boc absence on OPC proliferation by using a mixed glial cell culture containing astrocytes, OPCs/OLs and microglia derived from the forebrain of P1-P2 WT and mutant pups. Cultures were maintained for 12 DIV and fixed just after a short pulse of BrdU. We detected a decreased number of Olig2⁺BrdU⁺ OPCs in the culture (Fig. 3C,D) suggesting that Boc is a positive regulator of OPC proliferation in the forebrain. To determine whether Boc may transduce Shh signal in this context, we evaluated whether the recombinant Shh protein up-regulates its main target gene, Gli1, in a Boc-dependent or independent manner. In the WT mixed glial cell culture, Shh induced a 4-fold increase in Gli1

transcription whereas in the Boc mutant, no significant Gli1 up-regulation was detected (Fig. 3E) suggesting that the Gli1 up-regulation induced by Shh in the glial cells of the postnatal forebrain is Boc-dependent.

Finally, we investigated OPC maturation by using the model of organotypic cultures of cerebellar slices. This model was previously used to demonstrate that Shh synthesized by the Purkinje cells (Traiffort et al., 1998) is the signal which stimulates the proliferation of OPCs and inhibits their differentiation when those cells up-regulate the expression of vitronectin (Bousslama-Oueghlani et al., 2012). In addition, it is appropriate to evaluate the myelination process. Therefore, we prepared organotypic slices from P0 WT and Boc $-/-$ mice, maintained them for 7 or 14 days *in vitro* (DIV) and performed MBP immunostaining. In P0-DIV7 slices, MBP signal was found increased although in a non significant manner in the Boc mutant (Fig. S1A). In contrast, slices analyzed at DIV14 displayed MBP⁺ signals occupying an area significantly much larger in the mutant than in the WT slices (Fig. 3F,G). In addition, the number of calbindin⁺ Purkinje neurons was similar in both genotypes (Fig. 3F,H) indicating that the increase in MBP was not due to an increase in the Purkinje axons. These data are in agreement with the hypothesis that Boc may transduce the inhibition of OPC differentiation previously shown to be induced by Shh (Bousslama-Oueghlani et al., 2012). In order to check whether Boc may also mediate the previously shown Shh effect on OPC proliferation in the cerebellum (Bousslama-Oueghlani et al., 2012), we immunostained the P0-7DIV slices with the cell proliferation marker Ki67 and the oligodendroglial cell marker Olig2 (Fig. S1B). The first observation was that Boc KO slices maintained for 7DIV displayed a dramatic decrease in the density of Ki67⁺ proliferating cells (Fig. S1C). This decrease was consistent with the role of Boc in the proliferation of the cerebellar granule neuron progenitors representing the main population of proliferating cells at this stage (Izzi et al., 2011). Interestingly, despite a normal density of Olig2⁺ cells, the restricted subset of Olig2⁺ Ki67⁺ proliferating OPCs was also highly

reduced in the Boc mutant (Fig. S1D,E) in agreement with the hypothesis that Boc may mediate Shh-induced proliferation of OPCs in the cerebellum as well. Altogether, these results indicate that Boc negatively regulates OPC specification in the forebrain, positively regulates OPC proliferation as shown in the first neonatal days in the forebrain and the cerebellum and finally prevents OPC differentiation as demonstrated in the early postnatal cerebellum.

Boc controls oligodendrogenesis and myelin production in the adult brain.

To further investigate the role of Boc in OL maturation and myelin formation in the adult brain, we performed immunostaining using NG2 proteoglycan and the *adenomatous polyposis coli* (APC) to label OPCs and mature OLs, respectively. While no difference in cell densities was observed in the cerebellum (Fig. 4A,B), we observed drastic changes in the corpus callosum and cerebral cortex (Fig. 4C-G). Indeed a significant decrease in OPC density was observed while mature OL density was found increased suggesting an imbalance between oligodendroglial cells which are maintained in the cell cycle and those committed into the differentiation stage. Consistent with this hypothesis, the total number of the Olig2⁺ OL lineage cells did not differ in the Boc mutant compared to the WT animals. Since the increased density of mature OLs in the forebrain could lead to an increased myelin synthesis, we quantified MBP by Western blot. We observed a significantly higher level of MBP protein in the mutant indicating that hypermyelination persists in the adult forebrain (Fig. 4H) as well as in the adult cerebellum (not shown). Altogether, these data indicate that besides its role in the early postnatal generation of oligodendroglial cells, Boc also regulates adult oligodendrogenesis both by promoting OPC proliferation and blocking their differentiation and, subsequently by controlling the level of myelination.

The absence of Boc is associated with a shift in the distribution of the caliber of myelinated axons and a thickening of the myelin sheath around small size axons

To investigate whether brain hypermyelination observed in Boc mutants was a consequence of the higher number of myelinated axon or the thickening of myelin sheath, we performed an ultrastructural electron microscopy analysis of adult corpus callosum, which contains a high percentage of unmyelinated axons (Sturrock, 1980) and a majority of small calibre axons displaying a diameter lower than 0.8 μm (Hildebrand et al., 1993) and present data). As expected, the corpus callosum of WT adult mice had myelinated and unmyelinated axons (Fig. 5A). In contrast, the same structure in the mutant displayed an apparent higher number of myelinated small diameter axons (Fig. 5B). Quantification showed that the total number of axons between the WT and mutant conditions was the same (Fig. 5C). However, the density of myelinated axons was significantly higher in the mutant at the expense of the unmyelinated ones (Fig. 5D). Interestingly, the diameters of the majority of myelinated axons ranged between 0.3 and 0.8 μm in the WT corpus callosum whereas the values were shifted to the left ranging from 0.1 to 0.5 μm in the mutant (Fig. 5E). In a consistent manner, in the population of axons displaying a diameter less than 0.8 μm , the absence of Boc led to the myelination of axons with a significantly ($p=0.001$) smaller diameter ($0.48\pm 0.02 \mu\text{m}$) compared with the WT ($0.57\pm 0.02 \mu\text{m}$). Conversely, the absence of Boc did not influence the myelination of axons displaying a diameter higher than 0.8 μm (1.01 ± 0.05 for the mutant vs 1.06 ± 0.03 for the WT) (Fig. 5F). Moreover, the analysis of the myelin sheath at a higher magnification revealed a higher thickness in the mutant than in the WT corpus callosum (Fig. 5G,H) as confirmed by the g-ratio calculation (axon diameter /total outer diameter of myelinated fiber) which is significantly decreased ($p=0.02$) again only in the smallest diameter axons of the Boc $-/-$ mice (0.739 ± 0.012) compared to the WT (0.771 ± 0.007) (Fig. 5I). As previously described (Guy et al., 1989) the g-ratio for the large diameter axons was found slightly higher than for the small ones in each

genotype (Fig. 5I). Altogether, these data show that Boc is a regulator of mechanisms controlling preferential myelination of small diameter axons in the corpus callosum. In addition, Boc may participate in the control of the optimal axonal myelination aimed at adjusting the myelin sheath thickness to the axon diameter specifically around the small diameter axons.

The absence of Boc impedes spontaneous remyelination

Previously, we reported that the adenoviral transfer of Shh into LPC-mediated demyelinated mice promotes remyelination together with decreasing the level of inflammatory glial cells (Feret et al., 2013). Therefore, we addressed the question of the possible involvement of Boc in the spontaneous regeneration of myelin. Stereotaxic injection of LPC was performed into the corpus callosum of WT and Boc $-/-$ mice and remyelination was analyzed 5, 10, 15 and 21 days post-lesion (dpl) corresponding to the steps of OPC proliferation (5 dpl), OPC differentiation (10 dpl) and new myelin production (15 and 21 dpl). At 5 dpl, Olig2⁺ staining indicated that cells from the OL lineage are mobilized into the lesion of WT animals. In contrast, only rare Olig2⁺ cells were observed in the brain lesion of the mutant (Fig. 6A). The quantification confirmed a significantly lower density of Olig2⁺ cells in the mutant compared to the control. The decrease in Olig2-expressing cells persists until the step of myelin production at 15 and 21 dpl (Fig 6B) despite a clear recovery in cell number strongly suggesting that Boc delays rather than impedes OPC mobilization (Fig. 6B). To evaluate the capacity of OPCs to differentiate in the absence of Boc, we quantified the density of Olig2⁺ APC⁺ mature OLs in both conditions. We detected a clear significant decrease in mature OL density in the lesion of the mutant (Fig. 6A) compared to control. Interestingly, mature OL density in mutant reached a plateau between 15 and 21 dpl at a level representing 40-50 % of the level observed in the WT animals (Fig. 6C) suggesting that Boc regulates OPC differentiation. We evaluated the progression of the lesion size by measuring the area of the corpus callosum in which either cell nuclei are still

concentrated or small OL chains cannot be detected. The lesion area significantly decreases from 10 to 21 dpl in the WT animals whereas it remains quite stable and significantly larger in the mutant mice (Fig. 6D). These data show that upon demyelination, Boc delays OPC mobilization and impedes the differentiation of these cells into mature OLs as well as the subsequent lesion regression.

The absence of reduction in lesion size, the delay in OPC mobilization and the defect in OL maturation observed in Boc mutant context were really similar to the phenotype observed in Shh signaling blockade during demyelination (Feret et al, 2013). To further investigate the functional link of Shh and Boc in this process, we analysed whether Boc may transduce the previously described decrease in microglia induced by the adenovirus-mediated transfer of Shh close to the demyelinated area (Feret et al., 2013). Interestingly, *in situ* hybridization experiments performed in the WT mice revealed a high up-regulation of Boc in the lesioned corpus callosum compared to the unlesioned side (Fig. 6E). At 10 dpl, around 21% of Boc⁺ cells were found to colocalize with Olig2 whereas a tiny number was detected in GFAP⁺ astrocytes. Because microglia are the most abundant cells in the lesion at this time point (not shown), the remaining Boc⁺ cells conceivably belonged to this cell population. Therefore, we stained WT and Boc^{-/-} brain slices derived from 10 dpl animals with the Ib4 isolectin notably labelling microglia. Ib4⁺ cells were significantly less numerous in the mutant mice than in the WT (Fig. 6F,G) suggesting that Boc does not mediate the decrease in microglia previously observed upon transfer of Shh close to the lesion (Feret et al., 2013). Altogether these data suggest that during the remyelination process, Boc may be a positive regulator of OPC maturation, thus mimicking Shh activity. Moreover, besides specifically regulating the mobilization of OL lineage cells, Boc does not seem to regulate the Shh-dependent inflammatory response.

Discussion

Besides being an incredible physiological process relying on the interaction of the axons and the cells which synthesize myelin - OLs in the CNS and Schwann cells in the PNS, myelination is a crucial regulator of CNS plasticity, function, and repair (Li and Richardson, 2016; Seidl, 2014; Tomassy et al., 2016). Our work shows that the transmembrane protein Boc both related to cell adhesion molecules / axonal guidance receptors and, tightly associated with the transduction of Shh signaling pathway is implicated not only in the production of the cells belonging to the OL lineage but also in the developmental and regenerating processes of myelination. Our main finding is that Boc acts as a brake to control the myelination level in the early postnatal and adult brain. Boc activity specifically targets small calibre axons by restricting the number of myelin wraps required to precisely adjust the thickness of the myelin sheath to the axon diameter, a necessary parameter for optimizing the axonal conduction. The protein also participates in the determination of the diameter threshold of axons which are myelinated. In addition, Boc is an essential element in the context of myelin repair in which it unexpectedly promotes the maturation of OPCs instead of preventing it as observed in physiological conditions. As a whole, our data identify Boc as a regulator of CNS myelination likely endowed with a dual activity in the transmission of Shh signal according to the physiological or pathological context.

In the PNS, the axonal ligand Nrg1 type III for the Schwann cell receptor ErbB2 (Nave and Salzer, 2006) is the necessary factor which initiates myelination and regulates myelin sheath thickness for axons above the normal threshold (1 μm) in the PNS (Michailov et al., 2004; Taveggia et al., 2005). The mechanisms implicated in CNS myelin regulation start to be uncovered as well. However, they appear to be likely more intricate than in the PNS may be due to the fact that axons displaying a wider calibre range can be myelinated in the CNS (Hildebrand et al., 1993). Recently, integrin signaling was found to play a key role in the

axoglial interactions that sense axon size and initiate myelination, such that loss of integrin signaling leads to a delay in CNS myelination of small-diameter axons without controlling myelin thickness (Camara et al., 2009). Interestingly, the present work reveals a different role for Boc since the protein is involved in the mechanism that allows the production of a myelin sheath whose thickness is accurately adjusted to the calibre of axons in order to reach the optimal g-ratio (Chomiak and Hu, 2009; Waxman and Bennett, 1972) specifically around the small axons. In contrast to the PNS where a single factor (Nrg1) regulates myelin thickness of all axons above the diameter threshold, it is conceivable that myelin thickness in the CNS is regulated by distinct factors according to the small or large calibre of axons. As a consequence, yet unknown factors might play a similar role for the large calibre axons in the CNS. However, the hypothesis remains to be investigated.

An additional interesting observation is that in the absence of Boc, the distribution of the diameters of the myelinated small calibre axons is shifted towards the smallest values. This is notably shown by the collapse of the number of myelinated axons in the range 0.4-0.8 μm in favour of axons in the 0.1-0.4 μm range in the Boc mutant. Previously, the engineering of nanofibers with diameters varying between 0.2 and 4.0 μm led to demonstrate that the minimum diameter threshold is 0.4 μm and that OLs show a preference for wrapping and ensheathing fibers larger than 0.5 μm with a 5-fold increase in the frequency of myelin-like segments formed by OLs in these fibers (Lee et al., 2012). By taking into account this observation, we may conceivably assume that Boc may be part of the recognition signals that determine whether myelination occurs in the smallest axons. Because Boc expression is mainly neuronal, we cannot exclude that the global shift in the diameter of myelinated axons could be due to the alteration of the axonal radial growth, a maturation process induced by OL which include changes in neurofilament and microtubule organization in the axons (Sanchez et al., 1996). In this regard, the distribution of the diameters of the non-myelinated axons in the Boc mutant

mice compared with the WT should be informative. Moreover, the expression of SMI-32, a marker of non-phosphorylated neurofilaments expressed in ‘damaged’ axons would also merit to be investigated.

In the forebrain of the adult mutant mice, the slight but significant imbalance between the densities of OPCs and mature OLs (in favour of the latter) is consistent with the higher density of myelinated axons detected at the expense of the non-myelinated ones. However, the absence of Boc may in addition likely alter the intrinsic functions of the neurons or the OLs devoid of its activity. Hypermyelination related to an increased number of myelinating cells has been previously reported in *p27^{-/-}* mice which display a cerebellar hypermyelination resulting from a reduction in the efficiency of OPC cell cycle exit, which generates more myelinating cells and thereby more myelin (Casaccia-Bonnel et al., 1997). The *p27* status would thus deserve to be investigated in the OL lineage derived from the Boc mutant. Other pathways such as the PI3K/Akt/mTor signaling and the ERK/MAP kinase have also been associated with hypermyelination. Although the modulation of these pathways by Boc cannot be excluded, the OL/myelin phenotype observed in the Boc mutant is less consistent with the phenotypes associated with the dysregulation of those pathways. Indeed, mice overexpressing the constitutively active form of the Akt kinase exhibit a dramatic increase in the amount of myelin per OL, but a normal number of OLs as well as a g-ratio decrease in large diameter axons of the corpus callosum (Narayanan et al., 2009). On the other hand, the transgenic mice exhibiting a sustained activation of ERK1/2 display significantly thicker myelin sheaths during the period of active developmental myelination that is likely related to a significant OL hypertrophy (Fyffe-Maricich et al., 2011; Ishii et al., 2012). Another mechanism deserving to be investigated to account for the Boc mutant phenotype relies on the recent demonstration that myelin wrapping of axons coincides with the increase of actin disassembly proteins. These proteins including the cofilin / gelsolin family members, are released via the competitive binding of

MBP to their binding site, which make them able to induce the disassembling of the OL actin cytoskeleton, a required step before initiation of myelin wrapping (Zuchero et al., 2015). Considering the *MBP* up-regulation observed in the early postnatal Boc mutant, we can assume that Boc might negatively regulate actin disassembly proteins by limiting *MBP* expression. Further analyses of the involvement of Boc in the myelination process include the determination of the kinetics of cofilin or gelsolin expression, the characterization of the onset of myelin formation in the early postnatal Boc mutant compared to the WT animals and the evaluation of the role of the neuronal or oligodendroglial Boc in initiating myelination in dorsal root ganglia/OL cocultures alternatively derived from the WT or Boc mutant animals.

Our data are consistent with the hypothesis that Boc may transduce Shh signal in the promotion of OPC proliferation and the inhibition of OPC differentiation in the early postnatal cerebellum (our present data) (Bousslama-Oueghlani et al., 2012). However, the statement is less evident in the forebrain. First, the proliferation / maturation imbalance that we observed in the adult forebrain is intriguingly not detectable in the forebrain of P15 animals although the mixed glial cell cultures derived from the P0 forebrain clearly indicate a lower ability of Boc -/- OPCs to proliferate likely in a Gli1-dependent manner (present data). Moreover, data reported by other groups show that Shh induces the proliferation of OPCs in cultures derived from the neonatal rat forebrain (Lelievre et al., 2006). In addition, the removal of the positive transducer of Shh signal, Smo, in the subventricular Gli1⁺ progenitors bordering the corpus callosum decreases the production of the OL lineage cells (Tong et al., 2015) whereas the disruption of Gli1 induces a precocious myelination of the corpus callosum (Samanta et al., 2015). If we consider these data altogether, a possible model might be that the Smo-dependent OPC specification / proliferation induced by Shh is likely Gli-independent while the inhibition of OPC differentiation depends on Gli. Boc may conceivably be implicated in the Gli-independent induction of OPC proliferation and Gli-dependent inhibition of OPC differentiation. Further

investigations based on the over-expression of Boc in primary OPC/OL cultures derived from the Boc KO mutant in the presence or the absence of Shh are required for supporting these hypotheses.

During myelin repair, the partial failure of OPC maturation into mature OLs and the absence of lesion regression observed in the Boc mutant are consistent with the idea that Boc may transduce Shh signal since our previous work demonstrated that Shh blockade by its physiological antagonist Hip is deleterious for the regression of the lesion (Ferent et al., 2013). Intriguingly, Boc (and consequently Shh) appeared to be endowed with opposite activities in the developmental and repairing production of OPCs/OLs and myelin. Thus, Shh signaling would not fit with the theory according which myelin regeneration is a recapitulation of the developmental process (Fancy et al., 2011). Data regarding the Wnt signaling endowed with similar dual activities led to propose models in which either high or low levels of the Wnt morphogen may be responsible for such opposite activities or alternatively canonical versus non-canonical Wnt signaling may be involved (Fancy et al., 2014; Hammond et al., 2015). The question remains fully opened for the Shh pathway especially, as we mentioned above, because Shh is well-known to induce its effects via both canonical (Gli-dependent) and non-canonical (Gli-independent) pathways (Ferent and Traiffort, 2015; Robbins et al., 2012). Moreover, Boc is recognized as a bifunctional receptor for Shh in other contexts including the transmission of the axon guiding activity of Shh which leads in embryo to the attraction of commissural neurons in the neural tube (Okada et al., 2006) but the retraction of ganglion cell axons in the retina (Fabre et al., 2010).

Although Boc phenotype is consistent with the pro-differentiating effect of Shh on OPCs in a demyelinating context, it disagrees with the decreased infiltration of microglial cells induced by Shh in the lesion, possibly reflecting the ability of Boc to transduce signals other than Shh as shown for instance by the Shh-independent activity of Boc in the induction of

myogenic differentiation (Kang et al., 2002). In agreement with this hypothesis, Boc was characterized as a class 1 Shh target gene in embryo meaning that Boc is transcriptionally repressed by Hh signaling (Tenzen et al., 2006). Interestingly, in the context of demyelination, in which we previously demonstrated the activation of the Shh target genes Gli1 and Ptc (Ferent et al., 2013) we now report the up-regulation of Boc as well. Although we cannot fully extrapolate data from embryo to adult, this observation challenges the initial theory according to which the Shh pathway is controlled by the transcriptional up-regulation of negative feedback components such as Ptc, and the concomitant down-regulation of positively acting Shh-binding proteins such as Boc/Cdon (Allen et al., 2007). Regardless of the molecular mechanism leading to the high up-regulation of Boc in microglia, this result may suppose a potentially important role of Boc in the regulation of these inflammatory cells essential for myelin repair.

As a whole, our present data implicate Boc in the regulation of the white matter during both developmental and regenerative processes. These data may assume greater significance if we consider that Boc was recently proposed as a potential modifier locus for holoprosencephaly in human populations and that holoprosencephaly has been associated with a deletion close to the chromosomal position 3q13.2 where the Boc gene is located (Seppala et al., 2014). Because myelination is accurately tuned according to a precise spatiotemporal pattern, which coincides with the appearance of cognitive and behavioural functions (Dean et al., 2016; Fields, 2008; Nagy et al., 2004) and given the importance of myelin thickness for neuronal communication, the absence of Boc should be interesting to relate with specific cognitive deficits in patients presenting with the mild (and thus viable) forms of holoprosencephaly, the most common malformation of the forebrain in humans (Roessler and Muenke, 2010). Moreover, the detection of inactivating mutations of Boc in patients presenting with a demyelinating disease should likely be considered in the therapeutic strategy used in such patients in particular when the Shh

pathway is known to contribute to the remyelinating effects of the selected treatment as recently shown for Fingolimod (Zhang et al., 2015).

REFERENCES

- Allen, B.L., Tenzen, T., and McMahon, A.P., 2007. The Hedgehog-binding proteins Gas1 and Cdo cooperate to positively regulate Shh signaling during mouse development. *Genes Dev* 21, 1244-57.
- Bengtsson, S.L., Nagy, Z., Skare, S., Forsman, L., Forssberg, H., and Ullen, F., 2005. Extensive piano practicing has regionally specific effects on white matter development. *Nat Neurosci* 8, 1148-50.
- Bousslama-Oueghlani, L., Wehrle, R., Doulazmi, M., Chen, X.R., Jaudon, F., Lemaigre-Dubreuil, Y., Rivals, I., Sotelo, C., and Dusart, I., 2012. Purkinje cell maturation participates in the control of oligodendrocyte differentiation: role of sonic hedgehog and vitronectin. *PLoS One* 7, e49015.
- Camara, J., Wang, Z., Nunes-Fonseca, C., Friedman, H.C., Grove, M., Sherman, D.L., Komiyama, N.H., Grant, S.G., Brophy, P.J., Peterson, A., and ffrench-Constant, C., 2009. Integrin-mediated axoglial interactions initiate myelination in the central nervous system. *J Cell Biol* 185, 699-712.
- Casaccia-Bonnet, P., Tikoo, R., Kiyokawa, H., Friedrich, V., Jr., Chao, M.V., and Koff, A., 1997. Oligodendrocyte precursor differentiation is perturbed in the absence of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1. *Genes Dev* 11, 2335-46.
- Chomiak, T., and Hu, B., 2009. What is the optimal value of the g-ratio for myelinated fibers in the rat CNS? A theoretical approach. *PLoS One* 4, e7754.
- Coman, I., Barbin, G., Charles, P., Zalc, B., and Lubetzki, C., 2005. Axonal signals in central nervous system myelination, demyelination and remyelination. *J Neurol Sci* 233, 67-71.
- Courchet, J., and Polleux, F., 2012. Sonic hedgehog, BDNF, and synaptic development: new players for an old game. *Neuron* 73, 1055-8.
- Dean, D.C., 3rd, O'Muircheartaigh, J., Dirks, H., Travers, B.G., Adluru, N., Alexander, A.L., and Deoni, S.C., 2016. Mapping an index of the myelin g-ratio in infants using magnetic resonance imaging. *Neuroimage* 132, 225-37.
- El Waly, B., Macchi, M., Cayre, M., and Durbec, P., 2014. Oligodendrogenesis in the normal and pathological central nervous system. *Front Neurosci* 8, 145.
- Fabre, P.J., Shimogori, T., and Charron, F., 2010. Segregation of ipsilateral retinal ganglion cell axons at the optic chiasm requires the Shh receptor Boc. *J Neurosci* 30, 266-75.
- Fancy, S.P., Chan, J.R., Baranzini, S.E., Franklin, R.J., and Rowitch, D.H., 2011. Myelin regeneration: a recapitulation of development? *Annu Rev Neurosci* 34, 21-43.
- Fancy, S.P., 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, 506-12.
- Ferent, J., and Traiffort, E., 2015. Hedgehog: Multiple Paths for Multiple Roles in Shaping the Brain and Spinal Cord. *Neuroscientist* 21, 356-71.
- Ferent, J., Zimmer, C., Durbec, P., Ruat, M., and Traiffort, E., 2013. Sonic Hedgehog signaling is a positive oligodendrocyte regulator during demyelination. *J Neurosci* 33, 1759-72.
- Feutz, A.C., Pham-Dinh, D., Allinquant, B., Mische, M., and Ghandour, M.S., 2001. An immortalized jimpy oligodendrocyte cell line: defects in cell cycle and cAMP pathway. *Glia* 34, 241-52.

- Fields, R.D., 2008. White matter in learning, cognition and psychiatric disorders. *Trends Neurosci* 31, 361-70.
- Fuccillo, M., Joyner, A.L., and Fishell, G., 2006. Morphogen to mitogen: the multiple roles of hedgehog signalling in vertebrate neural development. *Nat Rev Neurosci* 7, 772-83.
- Fyffe-Maricich, S.L., Karlo, J.C., Landreth, G.E., and Miller, R.H., 2011. The ERK2 mitogen-activated protein kinase regulates the timing of oligodendrocyte differentiation. *J Neurosci* 31, 843-50.
- Guy, J., Ellis, E.A., Kelley, K., and Hope, G.M., 1989. Spectra of G ratio, myelin sheath thickness, and axon and fiber diameter in the guinea pig optic nerve. *J Comp Neurol* 287, 446-54.
- Hammond, E., Lang, J., Maeda, Y., Pleasure, D., Angus-Hill, M., Xu, J., Horiuchi, M., Deng, W., and Guo, F., 2015. The Wnt effector transcription factor 7-like 2 positively regulates oligodendrocyte differentiation in a manner independent of Wnt/beta-catenin signaling. *J Neurosci* 35, 5007-22.
- Harwell, C.C., Parker, P.R., Gee, S.M., Okada, A., McConnell, S.K., Kreitzer, A.C., and Kriegstein, A.R., 2012. Sonic hedgehog expression in corticofugal projection neurons directs cortical microcircuit formation. *Neuron* 73, 1116-26.
- Hildebrand, C., Remahl, S., Persson, H., and Bjartmar, C., 1993. Myelinated nerve fibres in the CNS. *Prog Neurobiol* 40, 319-84.
- Hussain, R., El-Etr, M., Gaci, O., Rakotomamonjy, J., Macklin, W.B., Kumar, N., Sitruk-Ware, R., Schumacher, M., and Ghoumari, A.M., 2011. Progesterone and Nestorone facilitate axon remyelination: a role for progesterone receptors. *Endocrinology* 152, 3820-31.
- Ishii, A., Fyffe-Maricich, S.L., Furusho, M., Miller, R.H., and Bansal, R., 2012. ERK1/ERK2 MAPK signaling is required to increase myelin thickness independent of oligodendrocyte differentiation and initiation of myelination. *J Neurosci* 32, 8855-64.
- Izzi, L., Levesque, M., Morin, S., Laniel, D., Wilkes, B.C., Mille, F., Krauss, R.S., McMahon, A.P., Allen, B.L., and Charron, F., 2011. Boc and Gas1 each form distinct Shh receptor complexes with Ptch1 and are required for Shh-mediated cell proliferation. *Dev Cell* 20, 788-801.
- Kang, J.S., Mulieri, P.J., Hu, Y., Taliana, L., and Krauss, R.S., 2002. BOC, an Ig superfamily member, associates with CDO to positively regulate myogenic differentiation. *Embo J* 21, 114-24.
- Kessarlis, N., Fogarty, M., Iannarelli, P., Grist, M., Wegner, M., and Richardson, W.D., 2006. Competing waves of oligodendrocytes in the forebrain and postnatal elimination of an embryonic lineage. *Nat Neurosci* 9, 173-9.
- Lee, S., Leach, M.K., Redmond, S.A., Chong, S.Y., Mellon, S.H., Tuck, S.J., Feng, Z.Q., Corey, J.M., and Chan, J.R., 2012. A culture system to study oligodendrocyte myelination processes using engineered nanofibers. *Nat Methods* 9, 917-22.
- Lelievre, V., Ghiani, C.A., Seksenyan, A., Gressens, P., de Vellis, J., and Waschek, J.A., 2006. Growth factor-dependent actions of PACAP on oligodendrocyte progenitor proliferation. *Regul Pept* 137, 58-66.
- Li, H., and Richardson, W.D., 2016. Evolution of the CNS myelin gene regulatory program. *Brain Res* 1641, 111-21.
- Lopez Juarez, A., He, D., and Richard Lu, Q., 2016. Oligodendrocyte progenitor programming and reprogramming: Toward myelin regeneration. *Brain Res* 1638, 209-20.

- McKenzie, I.A., Ohayon, D., Li, H., de Faria, J.P., Emery, B., Tohyama, K., and Richardson, W.D., 2014. Motor skill learning requires active central myelination. *Science* 346, 318-22.
- 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, 700-3.
- Nagy, Z., Westerberg, H., and Klingberg, T., 2004. Maturation of white matter is associated with the development of cognitive functions during childhood. *J Cogn Neurosci* 16, 1227-33.
- Narayanan, S.P., Flores, A.I., Wang, F., and Macklin, W.B., 2009. Akt signals through the mammalian target of rapamycin pathway to regulate CNS myelination. *J Neurosci* 29, 6860-70.
- Nave, K.A., and Salzer, J.L., 2006. Axonal regulation of myelination by neuregulin 1. *Curr Opin Neurobiol* 16, 492-500.
- Okada, A., Charron, F., Morin, S., Shin, D.S., Wong, K., Fabre, P.J., Tessier-Lavigne, M., and McConnell, S.K., 2006. Boc is a receptor for sonic hedgehog in the guidance of commissural axons. *Nature* 444, 369-73.
- Robbins, D.J., Fei, D.L., and Riobo, N.A., 2012. The Hedgehog signal transduction network. *Sci Signal* 5, re6.
- Roessler, E., and Muenke, M., 2010. The molecular genetics of holoprosencephaly. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 154C, 52-61.
- Samanta, J., Grund, E.M., Silva, H.M., Lafaille, J.J., Fishell, G., and Salzer, J.L., 2015. Inhibition of Gli1 mobilizes endogenous neural stem cells for remyelination. *Nature* 526, 448-52.
- Sanchez, I., Hassinger, L., Paskevich, P.A., Shine, H.D., and Nixon, R.A., 1996. Oligodendroglia regulate the regional expansion of axon caliber and local accumulation of neurofilaments during development independently of myelin formation. *J Neurosci* 16, 5095-105.
- Scholz, J., Klein, M.C., Behrens, T.E., and Johansen-Berg, H., 2009. Training induces changes in white-matter architecture. *Nat Neurosci* 12, 1370-1.
- Seidl, A.H., 2014. Regulation of conduction time along axons. *Neuroscience* 276, 126-34.
- Seppala, M., Xavier, G.M., Fan, C.M., and Cobourne, M.T., 2014. Boc modifies the spectrum of holoprosencephaly in the absence of Gas1 function. *Biol Open* 3, 728-40.
- Sturrock, R.R., 1980. Myelination of the mouse corpus callosum. *Neuropathol Appl Neurobiol* 6, 415-20.
- Taveggia, C., Zanazzi, G., Petrylak, A., Yano, H., Rosenbluth, J., Einheber, S., Xu, X., Esper, R.M., Loeb, J.A., Shrager, P., Chao, M.V., Falls, D.L., Role, L., and Salzer, J.L., 2005. Neuregulin-1 type III determines the ensheathment fate of axons. *Neuron* 47, 681-94.
- Tenzen, T., Allen, B.L., Cole, F., Kang, J.S., Krauss, R.S., and McMahon, A.P., 2006. The cell surface membrane proteins Cdo and Boc are components and targets of the Hedgehog signaling pathway and feedback network in mice. *Dev Cell* 10, 647-56.
- Tomassy, G.S., Dershowitz, L.B., and Arlotta, P., 2016. Diversity Matters: A Revised Guide to Myelination. *Trends Cell Biol* 26, 135-47.
- Tong, C.K., Fuentealba, L.C., Shah, J.K., Lindquist, R.A., Ihrie, R.A., Guinto, C.D., Rodas-Rodriguez, J.L., and Alvarez-Buylla, A., 2015. A Dorsal SHH-Dependent Domain in the V-SVZ Produces Large Numbers of Oligodendroglial Lineage Cells in the Postnatal Brain. *Stem Cell Reports* 5, 461-70.

- Traiffort, E., Charytoniuk, D.A., Faure, H., and Ruat, M., 1998. Regional distribution of sonic hedgehog, patched, and smoothened mRNA in the adult rat brain. *J Neurochem* 70, 1327-1330.
- Ullen, F., 2009. Is activity regulation of late myelination a plastic mechanism in the human nervous system? *Neuron Glia Biol* 5, 29-34.
- Waxman, S.G., and Bennett, M.V., 1972. Relative conduction velocities of small myelinated and non-myelinated fibres in the central nervous system. *Nat New Biol* 238, 217-9.
- Yam, P.T., and Charron, F., 2013. Signaling mechanisms of non-conventional axon guidance cues: the Shh, BMP and Wnt morphogens. *Curr Opin Neurobiol* 23, 965-73.
- Zhang, J., Zhang, Z.G., Li, Y., Ding, X., Shang, X., Lu, M., Elias, S.B., and Chopp, M., 2015. Fingolimod treatment promotes proliferation and differentiation of oligodendrocyte progenitor cells in mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neurobiol Dis* 76, 57-66.
- Zuchero, J.B., Fu, M.M., Sloan, S.A., Ibrahim, A., Olson, A., Zaremba, A., Dugas, J.C., Wienbar, S., Caprariello, A.V., Kantor, C., Leonoudakis, D., Lariosa-Willingham, K., Kronenberg, G., Gertz, K., Soderling, S.H., Miller, R.H., and Barres, B.A., 2015. CNS myelin wrapping is driven by actin disassembly. *Dev Cell* 34, 152-67.

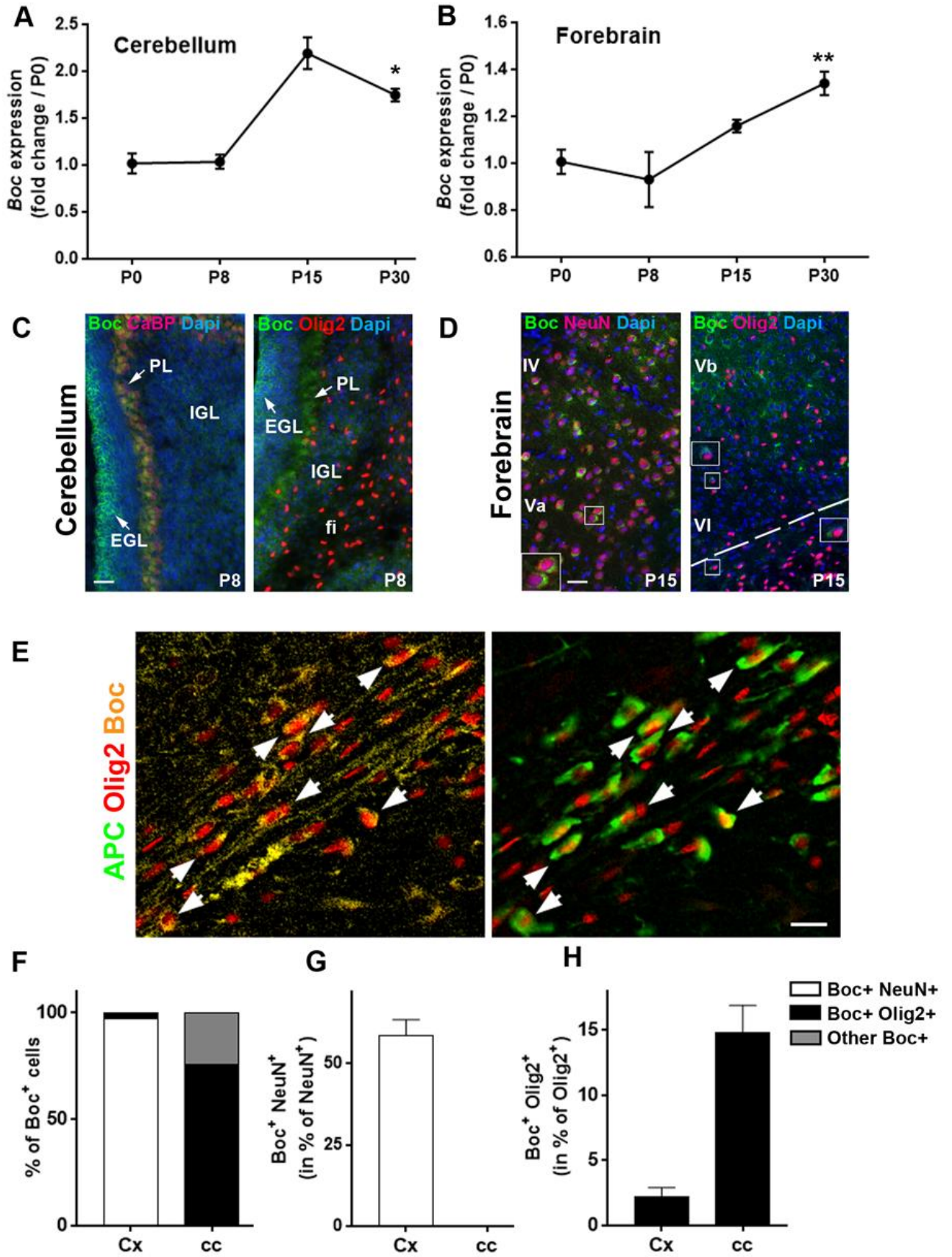


Figure 1

Figure 1. Boc-expressing cells in the postnatal developing brain are mostly neurons and to a lesser extent cells of the OL lineage. (A,B) Analysis of Boc transcript expression performed by qRT-PCR in the developing mouse cerebellum (A) and forebrain (B) during the period of myelin formation between P0 and P30. *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$. (C,D) Boc protein expression in P8 cerebellum (C) and P15 cerebral cortex and corpus callosum (D). In the developing cerebellum, Boc is mainly observed in the external granule cell layer (EGL) and is co-expressed with the calbindin protein (CaBP) in the Purkinje cells at the level of the Purkinje layer (PL). Boc⁺ oligodendroglial cells can be detected neither in the developing internal granular layer (IGL) nor in the fiber tract (fi) (C). In panel D, the cortical layers IV / Va and Vb / VI are indicated in the left and right pictures, respectively. The limit between the cerebral cortex (top) and the corpus callosum (bottom) is delineated by the white dotted line. Boc immunostaining visualized in the cerebral cortex (layers IV to VI) and corpus callosum is mainly co-localized with the mature neuronal marker NeuN and to a lower extent with the OL lineage marker Olig2 as shown in the magnified insets (D). (E) Triple immunostaining performed in the corpus callosum by using Boc (orange), Olig2 (red) and APC (green) antibodies indicating that Boc⁺ oligodendroglial cells are mature OLs expressing APC (white arrows). Remarkably, the Boc antibody also labels thin filaments throughout the corpus callosum likely corresponding to axons. (F-H) The histograms reflect the quantification of the percentage of Boc⁺ cells which co-express NeuN, Olig2 or none of these markers (F) and the percentage of NeuN⁺ neurons (G) or Olig2⁺ OPCs/OLs (H), which co-express Boc. The quantifications are derived from n=2-3 animals (4-5 slices each). Scale bars: 50 μm (B,C); 15 μm (E).

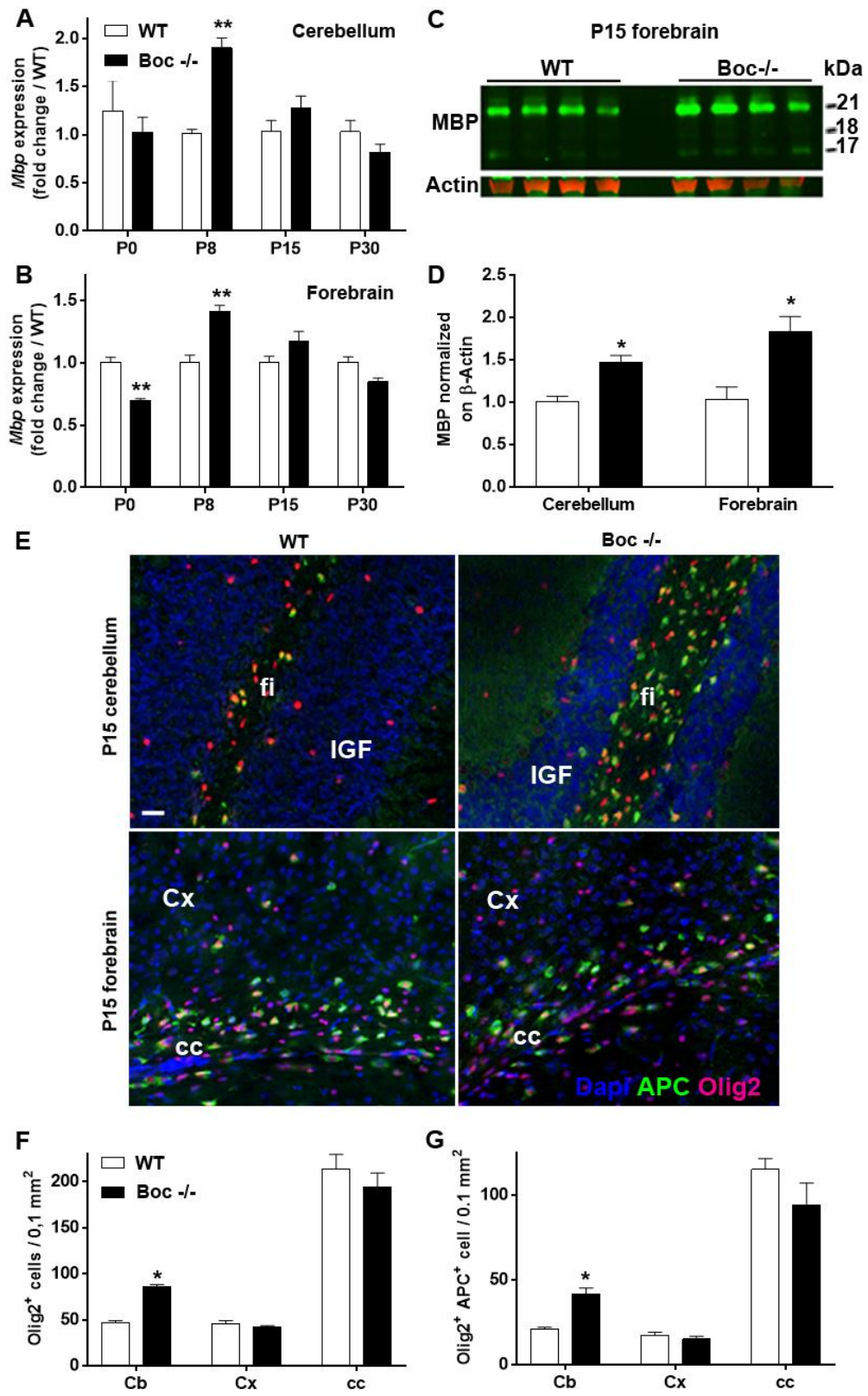


Figure 2

Figure 2. Boc KO mice display an increased production of myelin in the developing CNS.

(A,B) MBP transcript level was determined by qRT-PCR in the developing cerebellum (A) and forebrain (B) from P0 to P30 in WT and Boc^{-/-} mutant mice. (C) Western blot analysis of forebrain homogenates derived from P15 WT and Boc^{-/-} mice. (D) Quantification of MBP signal indicates that the protein is significantly increased in the cerebellum and forebrain of Boc^{-/-} animals. (E) Immunostaining performed in P15 mouse brain slices visualizes Olig2⁺/APC⁺ mature OLs in the cerebellum (top) or cerebral cortex and corpus callosum (bottom). (F,G) Quantifications of the density of Olig2⁺ OL lineage cells and Olig2⁺ APC⁺ mature OLs indicate an increase in the density of mature OLs in the caudal but not in the rostral brain. The values are the mean \pm SEM from 3 mice in each phenotype (4-5 slices per animal). *, p \leq 0.05; **,p<0.01.

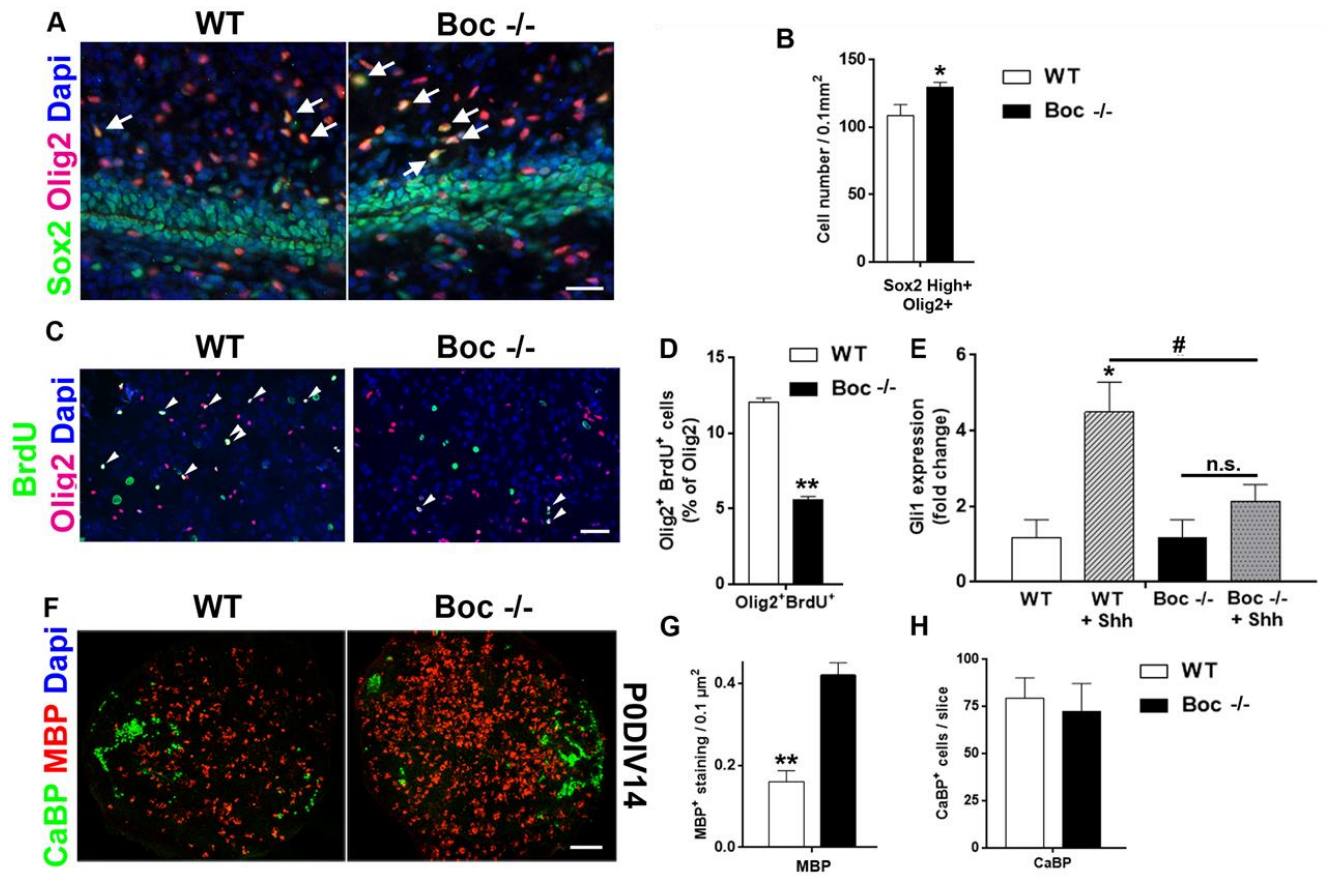


Figure 3

Figure 3. Boc is involved in the control of OPC specification, proliferation and differentiation. (A,B) Visualization of pre-OPCs generated in the dorsal forebrain of WT and Boc ^{-/-} P0 mice. The Olig2⁺ cells which highly express the Sox2 marker appear as yellow/orange cells and are indicated by white arrows (A). The histogram shows the quantification of Sox2^{High+}/Olig2⁺ cells expressed per surface unit and derived from 3-4 animals per genotype (B). (C-E) Primary mixed glial cell cultures derived from the forebrain of P0-P1 WT and Boc KO mice were cultured for 12 DIV and cell proliferation was assessed after a 2-hr incorporation of the proliferation marker BrdU (C). Olig2⁺BrdU⁺ cells (white arrowheads) were quantified and are expressed as % of the total population of Olig2⁺ cells (D). Similar cultures performed in the presence or in the absence of the recombinant Shh protein (10 nM) were evaluated for Gli1 transcription by using quantitative RT-PCR. The significant up-regulation of Gli1 induced by Shh is lost in cultures derived from the Boc mutant (E). (F-H) Visualization of MBP and Calbindin protein (CaBP) immunofluorescence detected in organotypic cultures of cerebellar slices derived from postnatal (P0-P1) WT or Boc ^{-/-} mice maintained for 14 days *in vitro* (F). The quantification of the area occupied by MBP⁺ signal is significantly higher in the mutant (G). In contrast the CaBP⁺ Purkinje cell density is not significantly different (H). Values are the mean ± SEM from at least 3 independent cultures per condition in each genotype. Scale bars: 50 μm (A,C), 200 μm (F). *, p≤0.05; **, p≤0.01; #, p<0.05.

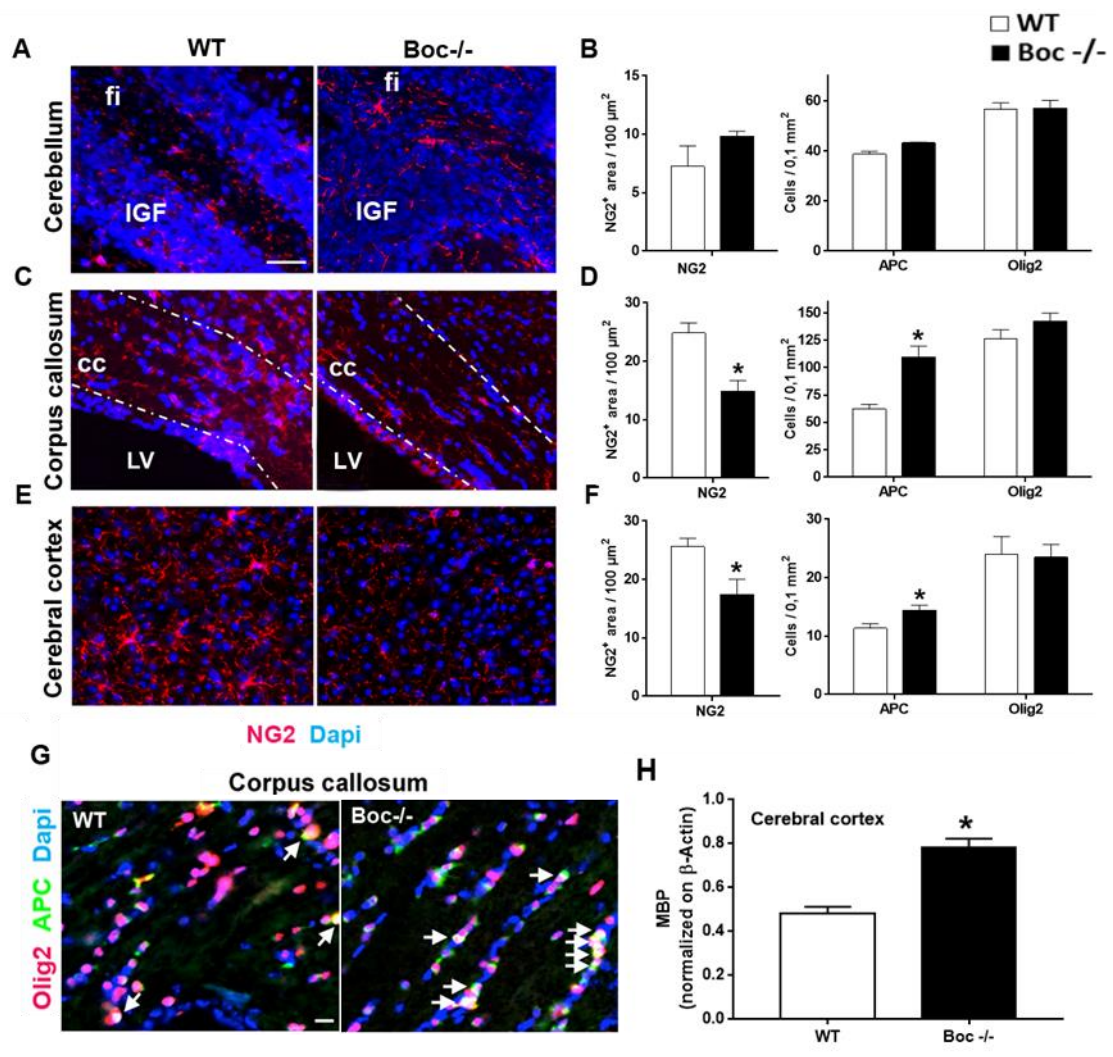


Figure 4

Figure 4. In the adult brain, the absence of Boc imbalances OPCs and mature OLs and increases myelin production in the forebrain. (A-F) Visualization of NG2⁺ (red) OPCs in the cerebellar cortex (A), corpus callosum (C) and cerebral cortex (E) derived from adult WT (left) and Boc^{-/-} (right) mice. Nuclei are labelled in blue (Dapi). The quantification of NG2⁺ stained area and Olig2⁺/APC⁺ cell density in the cerebellum (B), the corpus callosum (D) and the cerebral cortex (F) shows an imbalance between OPCs and mature OLs in the forebrain, while no difference can be detected in those cell populations in the caudal brain. The values are the mean \pm SEM derived from n=3 animals (5-7 slices per animal). (G) Illustration of Olig2⁺ OL cells (red) and APC⁺ mature OLs (green) in the corpus callosum of WT and Boc^{-/-} mice. A higher number of cells co-expressing both markers (white arrows) are detected in the absence of Boc. (H) Quantification of Western blot analysis performed on homogenates derived from the cerebral cortex of 6-month old WT and Boc^{-/-} mice by using the MBP antibody. Scale bars: 50 μ m (A,C,E), 25 μ m (G). *, p \leq 0.05.

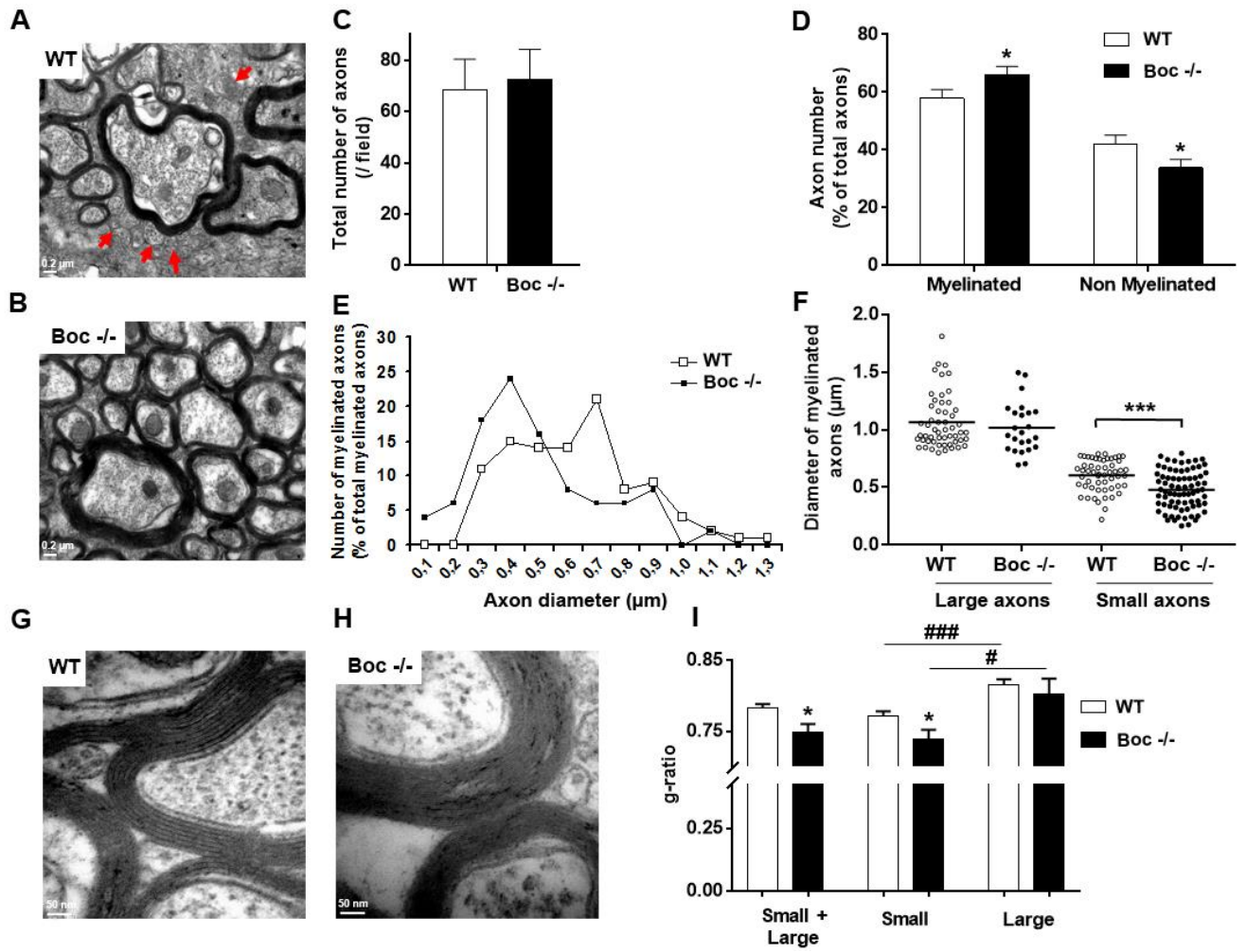


Figure 5

Figure 5. The absence of Boc increases the density of small myelinated axons and the thickness of their myelin sheath. (A,B) Visualization of coronal sections of the corpus callosum derived from WT (A) or Boc $-/-$ (B) adult mice using electron microscopy. Non myelinated small size axons indicated by red arrows are more numerous in WT than in the mutant sections. (C) The total number of axons does not significantly differ in the WT and mutant mice. (D) In the absence of Boc, the number of myelinated axons is significantly higher while the number of non-myelinated axons is lower. (E) The distribution of the diameter of myelinated axons is shifted to the left towards smaller sizes in the Boc $-/-$ mice (black dots) compared to the diameters observed in the WT animals (open dots). (F) Scatter plots of the diameter of myelinated axons larger (left) or smaller (right) than 0.8 μm in WT (open dots) and Boc $-/-$ (black dots) mice. The mean diameter of the large myelinated axons ($>0.8 \mu\text{m}$) does not differ according to the genotype of the animals. In contrast, a highly significant decrease in the mean diameter of the small myelinated axons ($<0.8 \mu\text{m}$) is observed in the mutant animals. (G,H) The visualization of the myelin sheath at a higher magnification shows a higher thickness of the sheath in the absence (H) than in the presence (G) of Boc. (I) Analysis of the g-ratio (axon diameter / axon + myelin diameter) indicates no difference according to the mouse genotype within the population of large size axons whereas a significant decrease is observed in the population of small axons in the mutant (n=3 animals/group, 4-5 sections were evaluated per animal). *, $p \leq 0.05$; ***, $p \leq 0.0001$ compared to WT. #, $p \leq 0.05$, ###, $p \leq 0.0001$ when the g-ratio of small and large axons are compared within the same genotype.

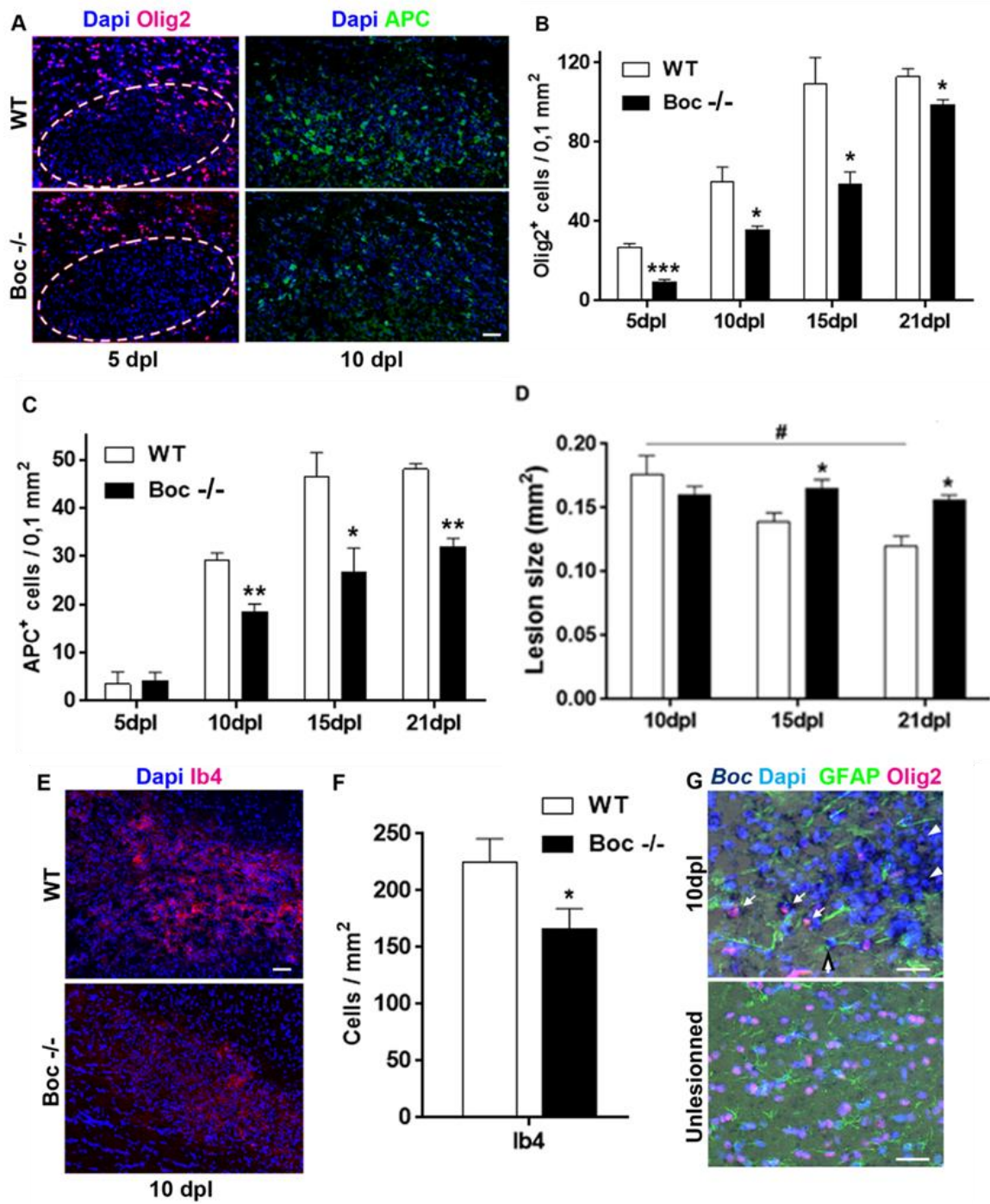


Figure 6

Figure 6. The absence of Boc delays the mobilization of OPCs, impedes the generation of mature OLs and decreases microglia upon demyelination. (A) Visualization of Olig2⁺ (left) and APC⁺ cells in the lesion after the stereotaxic injection of LPC into the corpus callosum, respectively of WT and Boc mutant mice. At 5 days post-lesion (dpl), Olig2⁺ cells (red) have already started to populate the lesion in the WT but not in the mutant animal. The lesion is indicated by the white dotted line. At 10 dpl, the density of APC⁺ mature OLs appears to be highly lower in the mutant than in the WT lesion. The nuclei are in blue (Dapi). (B,C) The histograms present the densities of Olig2⁺ OL lineage cells (B) and of APC⁺ mature OLs (C) within the lesion of WT and mutant mice at the indicated time points which correspond to the main steps of the remyelination. In the absence of Boc, the mobilization of the Olig2⁺ cells is delayed and their maturation into mature OLs appears to reach a plateau between 15 and 21 dpl. (D) The evaluation of the lesion size at 10, 15 and 21 dpl reveals that while the size of the lesion significantly decreases from 10 to 21 dpl in the WT animals, it remains quite stable and significantly larger in the mutant mice. (E) Double ISH / immunostaining in the lesion of a WT mouse brain shows that few Boc⁺ cells coexpress Olig2 (white arrows), a tiny number coexpress GFAP (black and white arrow) and many coexpress neither Olig2 nor GFAP (white arrowheads).

Supplementary Data

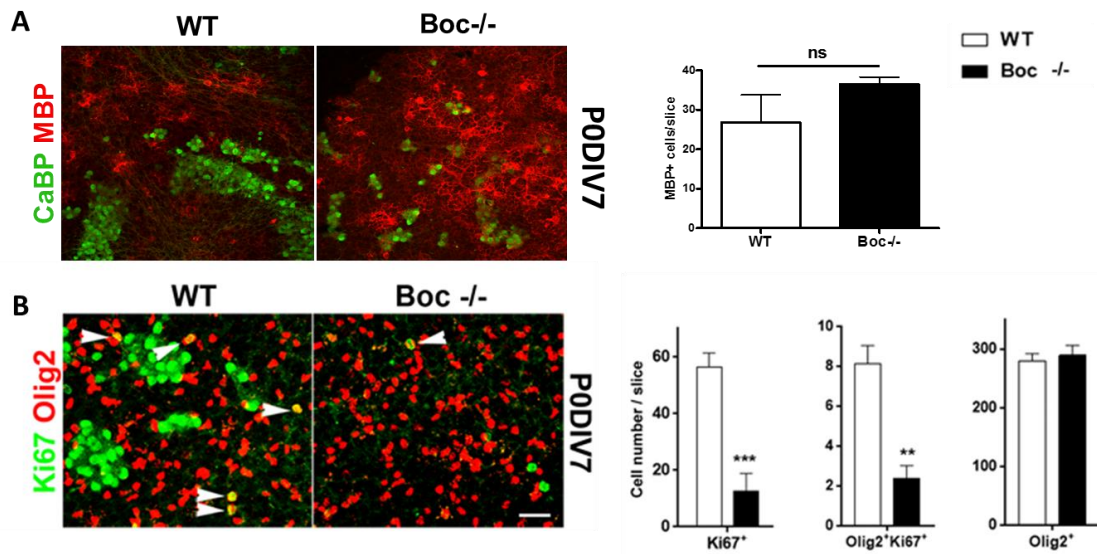


Figure S1. Boc promotes OPC proliferation and prevents maturation in the early postnatal cerebellum. (A,B) Immunofluorescence detected in organotypic cultures of cerebellar slices derived from postnatal (P0-P1) WT or Boc ^{-/-} mice and maintained for 7 days *in vitro* (DIV). (A) MBP and Calbindin protein (CaBP) staining. The quantification of the area occupied by MBP⁺ signal tends to be higher in the mutant (B) Visualization of Olig2 and Ki67 cells. The histograms show a high decrease in the density of Ki67⁺ proliferating cells as well as in the Olig2⁺/Ki67⁺ OPCs. In contrast the total number of Olig2⁺ OL lineage cells is not significantly different in the WT and Boc mutant mice. Values are the mean ± SEM from 3-6 pups for each genotype per condition. Scale bars: 50 μm *, p≤0.05; **, p≤0.01; #, p<0.05.

Review

Hedgehog: A Key Signaling in the Development of the Oligodendrocyte Lineage

Elisabeth Traiffort ^{1,*}, Mary Zakaria ¹, Yousra Laouarem ¹ and Julien Ferent ²

¹ INSERM—Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Neuroprotective, Neuroregenerative and Remyelinating Small Molecules, U1195, 80 rue du Général Leclerc, Kremlin-Bicêtre F-94276, France; mary.zakaria@inserm.fr (M.Z.); yousra.laouarem@inserm.fr (Y.L.)

² IRCM, Molecular Biology of Neural Development, 110 Pine Avenue West, Montreal, QC H2W 1R7, Canada; julien.ferent@gmail.com

* Correspondence: elisabeth.traiffort@inserm.fr; Tel.: +33 1 49 59 19 02

Academic Editors: Henk Roelink and Simon J. Conway

Received: 15 July 2016; Accepted: 31 August 2016; Published: date

Abstract: The Hedgehog morphogen aroused an enormous interest since it was characterized as an essential signal for ventral patterning of the spinal cord two decades ago. The pathway is notably implicated in the initial appearance of the progenitors of oligodendrocytes (OPCs), the glial cells of the central nervous system which after maturation are responsible for axon myelination. In accordance with the requirement for Hedgehog signaling in ventral patterning, the earliest identifiable cells in the oligodendrocyte lineage are derived from the ventral ventricular zone of the developing spinal cord and brain. Here, we present the current knowledge about the involvement of Hedgehog signaling in the strict spatial and temporal regulation which characterizes the initiation and progression of the oligodendrocyte lineage. We notably describe the ability of the Hedgehog signaling to tightly orchestrate the appearance of specific combinations of genes in concert with other pathways. We document the molecular mechanisms controlling Hedgehog temporal activity during OPC specification. The contribution of the pathway to aspects of OPC development different from their specification is also highlighted especially in the optic nerve. Finally, we report the data demonstrating that Hedgehog signaling-dependency is not a universal situation for oligodendrocyte generation as evidenced in the dorsal spinal cord in contrast to the dorsal forebrain.

Keywords: oligodendrocyte; neural tube; forebrain; optic nerve; Smoothed; Patched; Gli

1. Introduction

Oligodendrocytes (OLs) are the myelinating cells of the central nervous system (CNS). These cells are consistently found in vertebrates in which they appeared relatively late in evolution in hinge-jawed fishes [1,2]. Contrasting with the wide distribution of OLs in the mature CNS, OL progenitor cells (OPCs) originate at early stages of development in restricted sites bordering the cerebral ventricles and spinal canal before they subsequently migrate into adjacent regions. OPCs express a characteristic set of markers, including the platelet-derived growth factor receptor alpha (Pdgfra) and the neuron/glial antigen 2 (NG2) proteoglycan. Both markers are rapidly downregulated when the cells differentiate into OLs, unlike other lineage markers as the transcription factors SRY-Box (Sox) 10 and Olig2, which are expressed in both OPCs and OLs. The mature OLs can be identified by their expression of adenomatous polyposis coli (APC) and the myelin basic protein (Mbp), among others (Figure 1). Like neurons and astrocytes, OLs derive from radial glial cells (RGCs), themselves the progeny of the neuroepithelial cells constituting the primitive neuroepithelium [3]. At early stages of neurogenesis, the potential of these primary

progenitors becomes regionally restricted through the activity of organizing signals. The latter involve gradients of secreted proteins such as Hedgehog and BMP/Wnt proteins, which emanate from the ventral or dorsal regions of the developing CNS, respectively. The different signals provide positional information to nearby progenitors by upregulating specific sets of transcription factors which will then control cell fate decisions [4].

The generation of the first OPCs takes place in the ventral regions of the CNS and follows the early production of neurons. Additional sources of OPCs subsequently emerge during fetal development in the dorsal CNS and therefore support the existence of different spatiotemporal waves of OL production in the spinal cord as in the brain. The present review describes the involvement of Hedgehog proteins in the development of the OL lineage in the vertebrate spinal cord and brain from the early embryonic stages of development until the neonatal period. While the role of Hedgehog signaling in the ventral oligodendrogenesis has been thoroughly delineated during the last twenty years, the involvement of the pathway in the dorsal oligodendrogenesis was only recently reported in the forebrain and is not a universal situation as shown by the Hedgehog-independent generation of OPCs in the dorsal spinal cord.

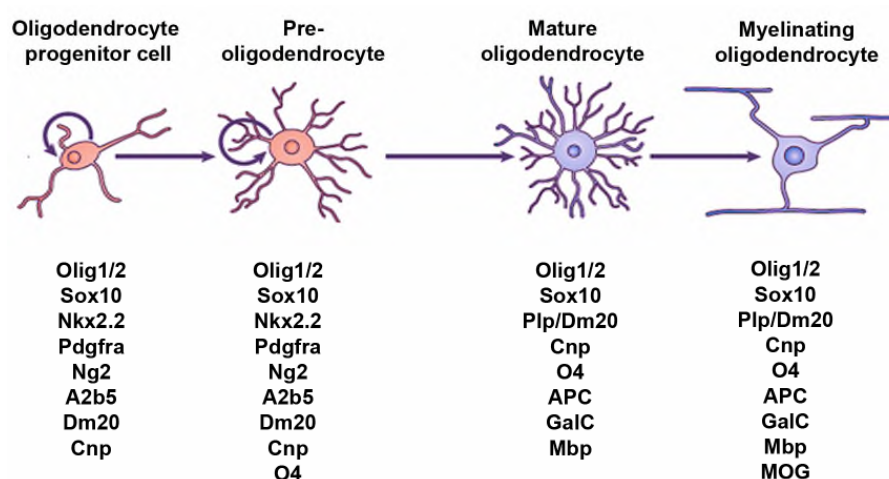


Figure 1. Schematic representation of the developmental stages of the OL lineage. The morphological (top) and antigenic (bottom) features of OPCs, pre-OLs, mature OLs and myelinating OLs are shown. The list of stage-specific markers is restricted to the markers quoted in the present review.

2. Hedgehog Signaling and the OL Lineage in the Spinal Cord

2.1. Hedgehog, a Key Signaling for OPC Specification in the Ventral Spinal Cord

In 1991, Warf and collaborators published the first results suggesting a ventral origin of OLs in the spinal cord [5]. A few years later, separate cultures of the ventral and dorsal regions of the embryonic day (E)14 rodent or E4 chick spinal cord revealed that cells able to generate OLs are restricted to the same domain of the neural tube that gives rise to motor neurons (MNs), the pMN domain [6–9] (Figure 2A). Based on this observation, two independent groups demonstrated that development of the OL lineage depends on the presence of the notochord (the mesoderm that underlies the ventral spinal cord) and/or the floorplate (the ventral-most spinal cord cell type). Consistently, the Danfourth's short tail mouse mutant lacking these structures does not display any OPCs at the ventricular surface [10], while chicken embryos possessing a second surgically introduced notochord or floorplate at an ectopic position, show ectopic production of OPCs [10,11]. Since both the notochord and floorplate comprise Sonic hedgehog (Shh)-expressing cells [12], the hypothesis of Shh involvement in the specification of OPCs was proposed. The hypothesis was confirmed by the appearance of OLs in explants of chicken or quail intermediate neural plate (which does not normally give rise to OLs) cultured in the presence of purified recombinant Shh protein. These data were the first ones to strongly support the idea that the specification of the OL lineage depends, at least initially, on ventral inducing signals, including Shh [10,11]. In agreement with this

conclusion, the analysis of transgenic mice in which Shh is ectopically expressed in the dorsal midline under the control of the Wnt-1 regulatory element, revealed the induction of numerous Pdgfra⁺ and O4⁺ oligodendroglial cells in the region adjacent to the source of ectopic Shh [13]. Moreover, the specific Shh antibody mAb5E1 led to detect Shh-expressing cells in the chicken ventral spinal cord immediately prior to and during the appearance of OPCs [14]. The time-window during which Shh is required for the specification of OPCs was evaluated by independent groups by using floorplate ablation and/or blocking Shh antibody. Slightly different results were reported since the period of Shh requirement was alternatively determined as E3–E7.5 [14] and E4.5–E5.5 [15]. The studies also led to suggest that Shh effect is likely direct since at that time, first, the progenitors have lost their competence to generate MNs or floorplate cells in response to Shh and second, the Shh receptor Patched (Ptc) is expressed by the neuroepithelial cells of the ventricular domain producing OPCs [15]. Nevertheless, the mechanisms through which Shh was involved in the emergence of spinal cord OPCs still remained to be investigated.

2.2. Hedgehog Transcriptional Targets Leading to OPC Specification in the Ventral Neuroepithelium

The finding that the genes encoding the basic helix-loop-helix transcription (HLH) factors, Olig1 and Olig2, are the first Shh-regulated genes associated with the OL lineage, constituted a substantial progress. Both genes are strongly induced in the ventricular zone (VZ) of mice ectopically expressing Shh in the dorsal neural tube at E14.5, just before the appearance of numerous O4⁺ and Pdgfra⁺ OL cells in positions adjacent to this domain. The morphogen appeared to be both necessary and sufficient for normal Olig expression. Indeed, the recombinant Shh protein induces a 10-fold upregulation of Olig1 expression when it is added into cultures of neuroepithelial cells derived from E14.5 rat embryos. Moreover, Shh null mice display a complete absence of Olig transcripts in areas classically known to express Shh in the CNS ventral midline [16]. Other investigations led to propose a model according which Shh acts first on multipotential cells to induce Olig1 and Olig2 and, second on committed OPCs co-expressing Olig1, Olig2 and the HLH proteins E2A and HEB. The latter were suggested to facilitate appropriate Olig gene function through a heterodimerization process and to contribute to the control of proliferation and differentiation in the OL lineage. However, the hypothesis still remains to be demonstrated [17].

In a similar manner, Olig gene expression and OL development also require Hedgehog signaling in the zebrafish. In the Smoothened (Smo) mutant (Smu^{b641}) where most Hedgehog signaling is absent, a complete disappearance of trunk expression of Olig2 was first observed in 24 hours post fertilization (hpf) embryos. The mutant also completely lacks spinal cord OLs expressing Plp/dm20 and most MNs consistent with the requirement of Olig2 function for both OL and MN development [18]. The characterization of a second Smo mutant (Smo^{nv122}) similarly revealed the absence of Olig2 expression in the neural tube of 48 hpf-embryos, but also the absence of Olig1 expression which is classically restricted to the OL lineage and starts from 36 hpf while Olig2 is already strongly expressed before 20 hpf [19]. Complete abolition of Olig1, Olig2 and Sox10 expression was also observed in the Dispatched1 mutant Disp^{nv108} indicating that the loss of long-range Hedgehog signaling mediated by Dispatched blocks OL development [19]. In addition, embryos treated with the Smo inhibitor cyclopamine during various time windows from 6 to 50 hpf exhibit a high to complete absence of Sox10⁺ OLs in the spinal cord. In contrast, when cyclopamine is added from 50 to 62 hpf (after the first Olig1⁺ cells can be detected), no defect in OL formation is observed despite the downregulation of Olig1 indicating that the maintenance of Olig1 expression is Hedgehog-dependant. Remarkably, overexpression of Olig1, Olig2 or both is unable to rescue the lack of OL formation in the absence of Hedgehog signaling, which suggests that the latter has additional critically important roles other than inducing Olig1 and Olig2 expression [18,19].

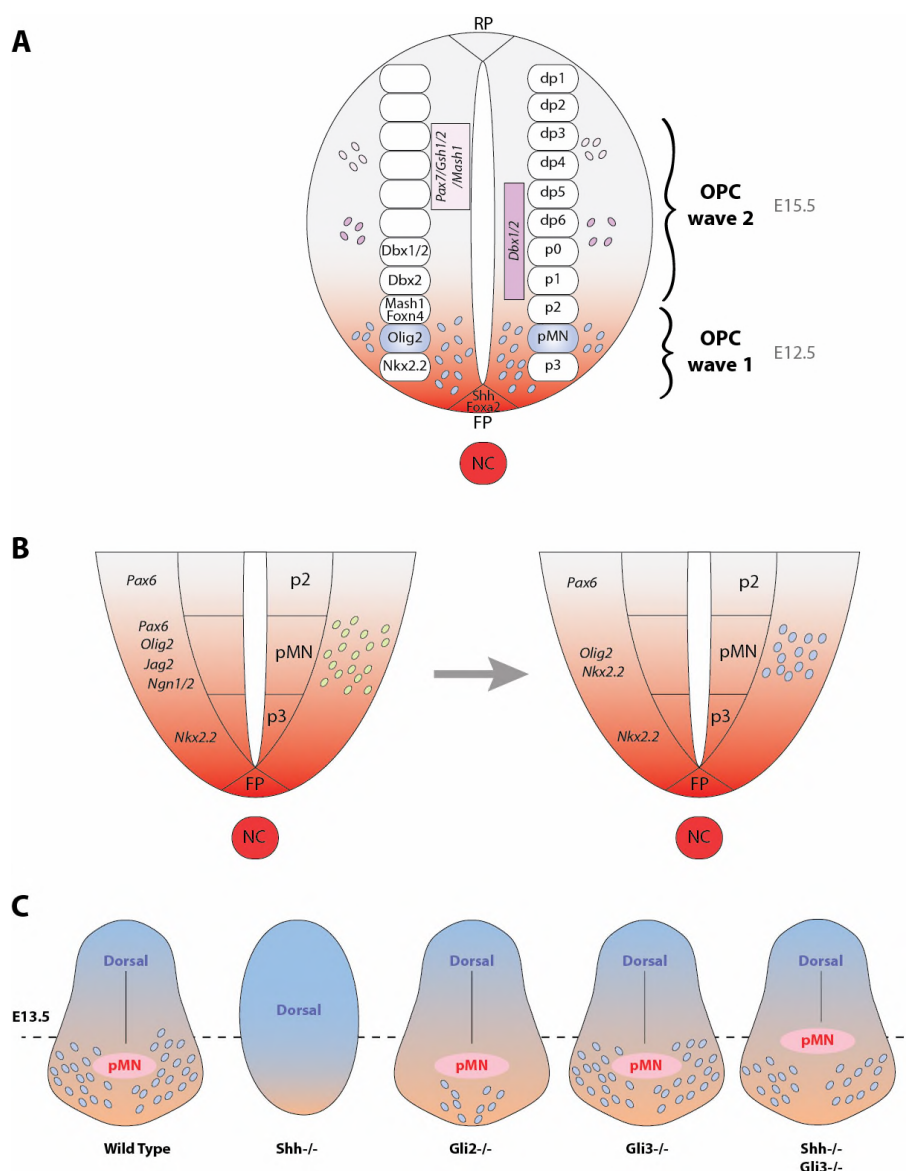


Figure 2. Hedgehog-dependent production of the OL lineage in the developing spinal cord. **(A)** Cross-sectional view of the neural tube indicating the production of the secreted Hedgehog proteins (**red**) from the notochord (NC) and the floorplate (FP). The roofplate (RP) secretes BMP and Wnt. Oligodendrocyte progenitor cells (OPCs) are produced as successive waves, which occur in mice at E12.5 and E15.5, respectively. The first wave arises from the pMN domain and the second one from progenitors expressing either Pax7/Gsh1/2/Mash1 or Dbx1/2. The ventral (p0–p3, pMN) and dorsal (dp1–6) neuroepithelial domains are indicated on the right side of the neural tube while the gene expression patterns for the different ventral progenitor domains are indicated on the left side; **(B)** Schemes of the ventral neural tube during Hedgehog-dependent MN (**left, in green**) and OL (**right, in blue**) generation from the pMN domain. At the time of OPC specification, Hedgehog signaling maintains Olig2 expression in the pMN domain whereas it promotes the dorsal extension and regression of the Nkx2.2 and Pax6 domains, respectively; **(C)** Schematized views of the neural tube in E13.5 wild-type or knockout mice indicating the distribution of OPCs derived from the pMN. OPCs (**blue**) have already invaded the ventral neural tube in the wild-type mouse. In the absence of Shh, no ventralization of the neural tube is observed and OPCs are completely absent. In the Gli2 mutant, the ventral production of OPCs is highly decreased while it is unaffected in the Gli3 mutant. Finally, the Gli3 mutation partially rescues the ventral oligodendrogenesis in the Shh mutant.

2.3. Do MNs and OLs Arise from a Common Population of Progenitor Cells in Response to Hedgehog Signaling?

The observation that nanomolar concentrations of Shh are as efficient for up-regulating Olig genes or inducing OLs as for inducing MNs from neural tube explants [10,14,16] suggested that both cell types may be derived from a common precursor. Other arguments were also consistent with this hypothesis. First, in the mouse E12.5 embryo, *Pdgfra* and Olig-expressing OPCs originate from the ventral most region of the *Pax6*⁺ domain from which MNs emerge [16]. Then, the analysis of the *Olig2*^{-/-} mutant mice [20] as well as fate mapping experiments in zebrafish spinal cord [18] showed that *Olig2* act as a transcriptional regulator in both MN and OL development.

However, the fact that OLs are generated in spinal cord explants derived from embryos older than those giving rise to MNs and therefore that OLs and MNs are not generated at the same time questioned the previous hypothesis. A first answer to this questioning was provided by the analysis of ventral neuroepithelial explants isolated at various developmental stages of chick embryos. The study showed that the OPC domain comprising *O4*⁺ and *Pdgfra*⁺ cells lies within the most ventral *Nkx2.2*-expressing domain of the neuroepithelium, and not in the adjacent domain characterized by *Pax6* expression from which MNs emerge [15]. Therefore in the chick spinal cord, OL and MN precursors appeared to not share the same transcription factors and consequently to not originate from the same site in the neuroepithelium in contrast to the data obtained in the mouse [16,21]. This was proposed to reflect a species difference in mechanisms of OPC specification in chicken and mouse.

Further investigations in the chicken neuroepithelium partially solved this apparent divergence by showing that the expression of both *Olig2* and *Nkx2.2* undergoes dynamic changes at the time of OPC specification (Figure 2B). These transcription factors are first expressed in mutually exclusive domains, but then *Nkx2.2* expression domain extends in the dorsal direction, resulting in partial overlap of both regions [22,23]. By investigating the mechanisms that initiate and control these changes, Agius and collaborators showed that Shh is sufficient to promote the coexpression of *Olig2* and *Nkx2.2* in cells of neuroepithelial explants isolated from E5 chick cervico-brachial spinal cord. Shh activity is also necessary for this coexpression since it is required to maintain *Olig2* expression in the pMN domain, to promote the dorsal extension of the *Nkx2.2* domain and to induce the regression of the *Pax6* domain that occurs between E5 and E6. Despite the existence of Shh-mediated proliferation of neuroepithelial cells at these developmental stages, cell proliferation is not the reason for the dorsal extension of the *Nkx2.2* domain as shown by the use of the DNA polymerase inhibitor, aphidicolin. Instead, the expansion and regression of *Nkx2.2* and *Pax6* domains, respectively, result from the repatterning of ventral neuroepithelial cells. In addition to the stimulation of OPC specification, Shh simultaneously restricts the ventral extension of the astrocyte progenitor domain by down regulating the neuroepithelial expression of early markers of the astrocyte lineage [24].

The most recent works, which addressed the question of the uncertain lineage relationship of MNs and OPCs, support the segregating model through which the neuroepithelial cells are intrinsically committed to generate either neurons or glial cells. Wu and collaborators reported a normal number of OPCs after conditional ablation of MN progenitors in the mouse and concluded that MNs and OLs do not share a common lineage-restricted progenitor [25]. Along the same line, in other territories of the mouse CNS such as the diencephalon, the fate mapping of the *Plp*-expressing cells indicates that the glial cells occurring at E13.5 arise from a new pool of neuroepithelial progenitors distinct from the neuronal progenitor cells [26]. Even more recently, in the zebrafish, the use of a photoconvertible Kaede fluorescent protein expressed by an *Olig2* transgene and time-lapse imaging led to the conclusion that the majority of MNs and OPCs arise from distinct progenitor cell lineages and that the MN to OL segregation results from Hedgehog-mediated recruitment of glial-fated progenitors to the pMN domain subsequent to neurogenesis. Concomitantly with MN differentiation, the neuroepithelial cells that originate dorsal to the pMN domain move ventrally

and progressively initiate Olig2 expression, characteristic of the pMN identity. Thus, OPCs acquire pMN identity after those that produce MNs. In other words, the ventral sliding of the neuroepithelium brings new cells in range of Hedgehog signals to replenish pMN progenitors that differentiate as MNs [27]. The role of progenitor recruitment from more dorsal populations to maintain the pMN domain remains nevertheless an open question in rodents and birds.

2.4. Molecular Mechanisms Associated with the Hedgehog-Dependent MN/OL Segregation

The requirement for Shh to specify OPCs, at a long time after dorsoventral neuronal patterning is completed [14,15,24,28] raised the question of how a single signaling molecule can confer chronologically distinct identities on the same set of ventral neural progenitors. The high increase in O4⁺ cells induced by the artificial rise in the concentration of Shh (25–100 nM compared to 2–25 to classically induce MNs) in the early E1.5 chick neural tube led to propose that the accumulation of the Shh protein at the surface of the ventral neural progenitors is a decisive step in the MN/OL transition [29]. This increase was accompanied by a dose-dependent reduction in the number of MNs differentiating in these cultures suggesting segregation toward an OL fate at the expense of MN production. Similar results were obtained *in vivo*, after *in-ovo* electroporation of a Shh-expressing vector at E1.5. In this experimental condition, the Nkx2.2⁺ domain of the VZ was invariably expanded dorsally in the electroporated side. In addition, a premature decrease in expression of the Ngn2 transcription factor involved in neuron differentiation (at E4 instead E5–E6) was observed in the ventral neural progenitors. The detection of a progressive increase in Shh immunoreactivity from E3 to E5 at a level overlapping with Nkx2.2⁺ cells just before OPC induction together with a high level of Ptc expression in this domain were also strong arguments for proposing the involvement of Shh accumulation in the MN/OL segregation [29].

Shh accumulation was attributed to the activity of the sulfatase (Sulf) 1, an enzyme which modulates the sulfation state of heparan sulfate proteoglycans (HSPGs) and starts to accumulate just before OPC specification. In agreement with this hypothesis, Sulf1 overexpression in E4–E4.5 chicken spinal cord dorsally extends the domain of strong Shh staining, highly upregulates Ptc1 transcripts and increases the number of Olig2⁺ cells. On the other side, the addition of Sulf1 blocking antibody at the time of neural plating led to the inhibition of Ptc1 expression usually detected as two bilateral domains in the ventral progenitor zone between E4 and E6. Similarly, OPC specification is severely affected in E12.5 Sulf1-deficient mouse embryos which display abnormal expression profiles for the Shh target genes Ptc1 and Gli1. The absence of Sulf1 expression in Olig2⁺ progenitors as well as the reduction in the number of Olig2⁺ and Sox10⁺ OPCs significantly higher in the double Sulf1^{-/-}; Shh^{+/-} mutant than in the single Sulf1^{-/-}; Shh^{+/+} mutant led to propose that Sulf1 may act in a non-cell autonomous manner and as a positive regulator of Shh. By eliminating 6O-sulfate groups on heparan sulfate chains, Sulf1 may locally lower Shh/HSPG interaction and promote Shh release from the surface of the progenitors located below the pMN domain. This may increase the amounts of the morphogen subsequently provided to neighboring Nkx2.2⁺ cells before their segregation to an OL fate [29,30]. Sulf1 investigation in the zebrafish spinal cord provided additional data which characterized Sulf1 activity as a timer able to activate a high-threshold response to Hedgehog at the critical time points of neuronal (14 hpf) and OL (36 hpf) generation as indicated by Sulf1 upregulation in the medial and lateral floorplate cells expressing Shh at these time points [31]. Other classes of glycosaminoglycans probably regulate Shh-dependent MN/OL segregation as suggested by the analysis of the keratan sulfate synthesizing enzyme GlcNAc6ST-1 mouse mutant [32].

Shh-mediated regulation of the Notch ligand Jag2 expression is also likely essential to control the timing of the MN to OL segregation. Indeed, Shh restricts Jag2 expression to the pMN domain during the period of MN generation (Figure 2B) as shown by the lack of Jag2 expression in this domain in Shh^{-/-} mice or by the dorsal expansion of Jag2 when a constitutive activation of the Shh pathway is triggered by the use of an activated version of Gli3. Actually, Jag2 activity splits the Olig2 progenitors into two different identities. It prevents a pool of Olig2-expressing progenitors from entering the neuronal differentiation pathway and at the same time, it maintains high expression

levels of the Notch effector Hes5 that in turn directly inhibits OPC generation during the neurogenic phase (Rabadan, 2012).

2.5. Local Sources of Hedgehog Proteins Contributing to OPC Specification

Although the production of Shh is present in both the notochord and floorplate, the notochord is no longer in contact with the overlying neural tube by E10.5–E11.5. An elegant study led to better evaluate the individual contribution of the floorplate to oligodendrogenesis. The selective inactivation of Shh in the floorplate was performed via mutagenesis approaches using a conditional floxed Shh mouse line and a transgenic strain expressing the Cre recombinase under the Nkx2.2 or Foxa2 cis-regulatory modules (CRMs). In both Nkx2.2^{CRM::Cre};Shh^{Flox/Flox} and Foxa2^{CRM::Cre};Shh^{Flox/Flox} mutants, Shh expression was detected in the notochord but never in the floorplate region of the ventral neural tube. The study of the mutant animals showed that floorplate-derived Shh (Shh^{FP}) is required to maintain Shh-Gli target gene and Olig2 expression in the pMN cells between E11.5 and E12.5. As expected by the loss of Olig2 expression at E12.5 in these mutants, the number of Olig2⁺ OPCs is dramatically decreased at E15.5 both in the ventral and dorsal funiculus of the developing spinal cord. During the E10.5–E12.5 time window, the phenotype of these mice is comparable to the phenotype observed in animals exhibiting Smo inactivation in Nestin⁺ neural cells indicating that the floorplate is the sole source of Hedgehog proteins required during this period. In contrast, an additional source might be involved in signaling to OPCs destined to migrate to the dorsal spinal cord between E15.5 and E18.5 given the slightly more severe phenotype observed in the dorsal funiculus of the Smo mutant during this time window [33].

In the zebrafish, several Hedgehog proteins other than Shh co-exist in the notochord and floorplate including Indian Hedgehog (Ihhb, previously known as Echidna Hedgehog) in both areas and, Tiggy winckle Hedgehog (Twhh) in the floorplate. The partial compensation of the lost Shh function by Hedgehog homologs throughout the period of MN and OPC specification was proposed accounting for the apparent normal level of Olig2 expression observed in the spinal cord of the *syu*^{-/-} mutant embryos [18,34–36]. In agreement with this hypothesis, in embryos deficient for both Shh and Twhh, spinal cord cells do not express Olig2 and consequently do not produce MNs and OLs as previously observed in embryos deficient for Smo [18,28]. Despite the presence of Olig2⁺ cells in the *syu*^{-/-} mutant, these cells are nevertheless located more ventrally than normal and do not give rise to OPCs. Thus, Shh and Twhh together appear to induce and position the Olig2⁺ precursor domain. Consistent with these data, the blocking of Hedgehog signaling by a continuous exposition to the Smo antagonist cyclopamine during various time windows including 6–36 hpf (prior to initiation of Olig2 expression), 30–36 hpf (after dorsoventral pattern was established) or 14–26 hpf (during the period of birth of most MNs) also shows that Hedgehog signaling is successively required to induce and position the Olig2⁺ precursor domain, then to maintain Olig2 expression and finally to control the balance between MN and OPC production [28].

More recently, the analysis of Ihhb loss-of-function showed that this protein is also required for OPC specification from the pMN precursors. Indeed, the Ihhb morphant fails to specify Sox10⁺ OPCs at 48 hpf. However, it displays normal Olig2 expression levels suggesting that Ihhb (in contrast to Shh) is dispensable for the maintenance of Olig2 expression. Instead, Ihhb is required for the cell cycle inhibition of the spinal precursors involved in OPC specification as indicated by the increased proliferation of neural precursors and overproduction of neurons at the expense of OPCs during the phase of oligodendrogenesis upon inhibition of Ihhb function. Interestingly, Shh cannot replace Ihhb function in OPC specification confirming that these proteins do have separate functions. The relative expression levels of Ihhb and Shh might be involved in maintaining a precise balance between the proliferation and differentiation of spinal precursors. The underlying mechanism might be that Ihhb behaves as a potent competitive inhibitor of Shh for binding to the Ptc receptor. However, more direct evidence is still needed [34].

Hedgehog expression in the floorplate is a conserved feature in human as well. A high immunoreactive Shh signal can be detected in the floorplate cells at 45 days post coitum (dpc). Shh remains restricted to this region before becoming progressively more weakly expressed at later

developmental stages. The first OPCs emerge dorsal to the floorplate at 45 dpc in two discrete regions on each side of the VZ. Later they appear in the ventral and lateral cord, and finally in dorsal regions of the presumptive white matter. Thus, human oligodendrogenesis in the spinal cord apparently displays similarities with chick, rodent or zebrafish oligodendrogenesis [37].

2.6. Involvement of the Gli Transcription Factors in OPC Specification

The involvement of the Gli zinc-finger transcription factors in Shh-mediated induction of OPCs was investigated through the analysis of the Gli2 and Gli3 mutants. In the wild-type mouse embryos, *Olig1/2* genes are expressed in the pMN domain during neurogenesis (E9.5–E10.5), then downregulated at E11.5 and upregulated again during oligodendrogenesis stages. In the Gli2 mutant, *Olig1/2* expression is maintained during the neurogenic step, but its upregulation fails at the oligodendrogenic step (Figure 2C). Therefore, Gli2 activity appears to regulate the size and duration of the *Olig1/2*⁺ oligodendrogenic domain in the ventral spinal neuroepithelium and the subsequent production of OPCs. Is Gli2 activity directly responsible for the upregulation and maintenance of *Olig* gene expression during OPC production or does it depend on the supply of Shh from the floorplate? This remains to be determined. Despite a drastic decrease of OPCs at early stages, the steady-state number of these cells in the Gli2 mutant is however quite comparable to that in wild-type littermates at late gestation stages. Gli2 is thus likely not required for the proliferation of OPCs after their initial production. Similarly, Gli2 is probably dispensable for OL differentiation and maturation in the spinal cord since OPC differentiation can be detected in the Gli2 mutant *in vivo* even though the process is reduced and delayed [38].

The non-essential role of Gli3 in ventral oligodendrogenesis was then suggested by the comparable expression profiles of *Olig/Pdgfra* or *Pdgfra/Mbp* transcripts determined at E13.5 and E17.5, respectively, in the wild-type and Gli3^{-/-} mice [39]. Such a conclusion was quite in agreement with the observation that Gli3 expression becomes restricted to the dorsal spinal cord at E9.5 before the initiation of oligodendrogenesis. However, the Gli3 null mutation was interestingly found to induce a substantial rescue of the defect observed in the Shh^{-/-} mice or in the mutant displaying a specific removal of Shh in the floorplate. Therefore, Shh is proposed to maintain *Olig2* expression in OPCs via the repression of the antagonistic Gli3 repressor activity [33,39]. In contrast, *Nkx2.2* expression being not influenced by the presence or the absence of Gli3 in embryos lacking Shh in the floorplate, Shh^{FP} is likely primarily required to induce *Nkx2.2* expression in OPCs via the Gli activators rather than via inhibition of the Gli3 repressor [33]. Finally, the suppression of OL differentiation reflected by the absence of *Mbp*⁺ *Plp*⁺ OLs in the E18.5 double Shh^{-/-}Gli3^{-/-} mutant supports the involvement of components other than Gli3 in the last steps of OPC maturation [39,40].

2.7. Sources of OPCs Outside the pMN Domain Are Hedgehog-Independent

The exchange of isotopically and isochronically defined sectors of the E2 spinal cord between quail and chick embryos led to the first description of a pool of OPCs arising in the dorsal spinal cord [41]. This finding was consistent with the generation of OPCs observed *in vitro* upon exposure of the dorsal neural tube to notochord explants or to Shh [8,14]. The existence of a second wave of OLs (Figure 2A) was then independently reported by several groups. The data supporting this hypothesis were based on the detailed expression profiles of the *Plp/dm20* marker [42,43], the existence of FGF2-responsive stem cells able to generate OLs [44], the description of a subpopulation of *Dbx*-derived OPCs three days later than the majority of OPCs generated from the pMN [45] and the report of OPCs arising at E15.5 and differing from their ventral counterparts in the requirement for *Nkx6*. These latter progenitors co-express *Pax7*, *Gsh1/2*, *Mash1* and were proposed to potentially result from a dorsal evasion of BMP signaling [46,47], in agreement with the tightly regulated balance between ventral Shh and dorsal BMP activities, which influence the position at which OPCs are specified in the neural tube [48,49]. The Shh-dependent induction of *Olig1/2* expression in the pMN domain first raised the possibility that Shh also mediates the induction of *Olig1/2* expression in the dorsal neural tube. However, OL generation from the dorsal domains appears to be independent of Shh signaling. First, the Smo antagonists, cyclopamine or KAAD-cyclopamine, do not prevent the

differentiation of the FGF2-responsive stem cells into O4⁺ Galc⁺ OLs. In the same line, Olig2⁺/Nkx2.2⁺ OPCs are induced in the presence of FGF2 in primary cultures of embryonic spinal cords derived from Shh^{-/-} mice [44]. In this mutant where most of the ventral structures including the pMN are missing, no early OPCs are produced at or before E13.5. However, a small number of Olig1/2⁺ cells start to appear in the dorsal spinal cord at E14.5. A larger number is observed by E18.5 with nevertheless a delay in OL lineage progression as indicated by the late appearance of Pdgfra and Sox10 expression at this developmental stage and by the complete absence of Mbp expression at perinatal stages [46]. Finally, dissociated spinal cord cells derived from E12.5 embryos which express an inducible GFP reporter under the Dbx1 promoter give rise to GFP⁺Sox10⁺ OL cells in the presence of cyclopamine, but not in the presence of an inhibitor of the FGF receptor [45]. Recently, the generation of a dual reporter mouse line to color code ventrally and dorsally-derived OPCs and their differentiated OL progeny led to show that 80% of OL lineage cells in the postnatal spinal cord are ventrally-derived in a Hedgehog-dependent manner. Ventral OPCs appear early and spread uniformly throughout the cord, whereas dorsal OPCs arrive later and remain mainly in the dorsal and dorsolateral funiculi. Remarkably, ventrally and dorsally-derived OPCs/OLs do not display distinct electrical properties [50].

3. Hedgehog Signaling and the OL Lineage in the Brain

The origin of OLs at more anterior levels of the neuraxis has long remained less well established than in the spinal cord. Plp/dm20⁺ cells were first described in the ventral neuroepithelium of the embryonic mouse diencephalon at E9 [51]. Then, a cluster of Pdgfra⁺ presumptive OPCs able to proliferate and migrate was reported at E14 in the ventral forebrain of the rat embryo [9]. Like the developing spinal cord, the developing brain exhibits signaling centers, including the ventral center and cortical hem which constitute a source of Hedgehog and BMP/Wnt proteins, respectively (Figure 3A). Therefore, as previously done in the spinal cord, the implication of Hedgehog signaling in OPC generation was progressively investigated at the different caudo-rostral levels of the developing brain.

3.1. Hedgehog-Dependent Generation of OPCs in the Hindbrain and Midbrain

As previously observed in the spinal cord, the ventral VZ is the site where the first OPCs are detected in the chick metencephalon, the embryonic part of the hindbrain that differentiates into the pons and the cerebellum [52,53]. In this region, O4⁺ cells are present rostrally in bilateral ventricular foci adjacent to the ventral midline at stage 26 (E5). Subsequently, OPCs populate lateral and dorsal regions in a rostral to caudal manner. At stage 30 (E6), these cells reach rostrally the area of the presumptive lateral pons whereas they dispersed caudally at the transitional area between the lateral pons and the cerebellar anlagen. OPCs are then detected in the dorsal parenchyma (cerebellar anlagen) by stage 32 (E7.5) and in the entire metencephalon by stage 34 (E8). Thus, the avian metencephalon is characterized by a rostro-caudal and a ventro-dorsal pattern of OPC appearance [52]. The ventral VZ is not the unique source of OPCs detected in this brain region, since additional discrete ventricular domains are detected in more lateral and dorsal locations that subsequently develop O4⁺ cells. In those domains, OPCs appear several stages later after those in the ventral VZ and in vitro studies suggest that approximately 20% of OPCs are induced during these later stages [52].

Interestingly, all these OPC domains are correlated with the transient expression of Shh in adjacent tissue suggesting that Shh signaling may regulate the spatial restriction of OPC appearance. In agreement with this hypothesis, Shh signaling is first required for the proper development of the earliest OPCs in the chick metencephalon since the injection of mAb5E1-producing hybridomas at stage 19 led to a dramatic decrease of OPCs throughout the tissue. In contrast, exposure to the neutralizing antibody at stage 23 inhibited the subsequent appearance of O4⁺ cells in the lateral and dorsal VZ but not in the ventral midline suggesting that the former zones contribute to the dorsal pool of OPCs. Dissociated cells derived from the metencephalon of embryos at stage 20, 24 or 26 and then cultured in the presence of mAb5E1 led to a reduction of O4⁺ cells by 92, 80 and 19%,

respectively, indicating that the initial appearance and survival of most OPCs become independent of Shh signaling between stage 24 and 26 in vitro. In purified cultures of OPCs, Shh promotes cell survival and proliferation, which suggests that the morphogen can act directly on these cells. Finally, the spatial restriction of OPC appearance can be disrupted by the addition of exogenous Shh [52].

Similarly, in the rodent hindbrain, OLs are first generated from ventral progenitor domains while a subset of OPCs also derives from the dorsal hindbrain in a region located immediately dorsal to the *Dbx2* expression domain co-expressing *Pax3*, *Pax7* and *Gsh1* [47]. The specification of ventral hindbrain OPCs was more accurately analyzed and showed to have a similarity with the ventral spinal cord OPCs with respect to their dependence on Shh signaling and requirement for *Olig1/2*, the expression of which extends until the second rhombomere of the hindbrain [16,54]. However, Vallstedt and collaborators revealed crucial differences in the intrinsic programs that control *Olig1/2* expression in the rodent ventral spinal cord and anterior hindbrain. Indeed, *Nkx6* proteins mediate opposing effects on the generation of OPCs in both regions since they are required for OPC generation in the ventral spinal cord while they instead suppress OPC production in the ventral anterior hindbrain. This differential regulation appeared to be tightly linked to the expression of *Nkx2.2*. Consistent with this hypothesis, *Olig2*⁺ cells are generated dorsal to the *Nkx2.2* domain in the spinal cord whereas in the anterior hindbrain where they are first detected at E12.5, these cells co-express *Nkx2.2* indicating that activation of *Olig1/2* expression at different positions of the developing neural tube is regulated by distinct genetic programs [47].

In the zebrafish, the homozygous *Smo* mutant completely lacks hindbrain OLs expressing *Plp/dm20* [18]. In addition to the expression of *Olig2*, *Nkx2.2a* expression also depends on Hedgehog signaling in the zebrafish hindbrain as shown by the complete absence of *Nkx2.2a* transcripts in this region in the same mutant. Interestingly, the homozygous histone deacetylase 1 (*Hdac1*) mutant also displays a complete absence of *Olig2*⁺ and *Sox10*⁺ cells at 50 hpf, but on the contrary an upregulation of *Nkx2.2a* expression. As the double *Smo*;*Hdac1* mutant also fails to express *Nkx2.2a* in the ventral hindbrain, *Nkx2.2a* expression seems to require Hedgehog signaling irrespective of whether embryos are deficient in *Hdac1* function or not. Thus, *Hdac1* likely facilitates Hedgehog-mediated expression of *Olig2* in the ventral hindbrain and represses the expression of *Nkx2.2a* in the ventral neural progenitors en route to the production of *Sox10*⁺ OPCs [55]. An additional unexpected target of Shh signaling during OPC specification in the zebrafish hindbrain is *Disrupted-in-schizophrenia1* (*Disc1*). In agreement with this observation, cyclopamine blocks *Disc1* expression in *Olig2*⁺ midline progenitor cells and also mimics the effect of *Disc1* knockdown on OPC specification. Interestingly, these data led to suggest for the first time that altered Shh signaling may be a potential important developmental factor in the pathobiology of mental illnesses [56].

The development of OPCs in the chicken midbrain or mesencephalon has also been examined. It starts ventrally at around E6 when some *Olig2*⁺ cells emerge from the *Nkx2.2*⁺ neuroepithelial cells in ventrolateral positions. At around E11, *Olig2*⁺ OPCs then emerge from the VZ and subventricular zone (SVZ) of the dorsal midbrain. Unlike *Olig2* staining, *Nkx2.2* expression is not detected in the VZ/SVZ, but in *Olig2*⁺ cells migrating away from their origin. These *Olig2*⁺ *Nkx2.2*⁺ cells coexpress the OL markers *Pdgfra* and *Sox10* and a small number continues to cycle during the migration process. In both the ventral and dorsal VZ of the midbrain, Shh is expressed in the vicinity of *Olig2*⁺ OPCs consistent with the possible Shh involvement in the generation of these cells [57]. Moreover, a small region of the mesencephalic neuroepithelium called the parabasal band, was recently proposed to be the source of most OPCs present in the cerebellum [58]. Hedgehog implication in the specification of this main population of OPCs remains to be precisely addressed. However, insight on the molecular mechanisms underlying OL development in this brain area was provided by a recent study showing that during early postnatal development, Shh stimulates the proliferation of *Olig2*⁺ OPCs and downregulates their differentiation. Thus, Shh may prevent cerebellum OPC from exiting the cell cycle and inhibit the effects of factors promoting their differentiation. In agreement with this hypothesis, by the end of the first postnatal week, Purkinje cells downregulate Shh and produce vitronectin which induces OL maturation [59].

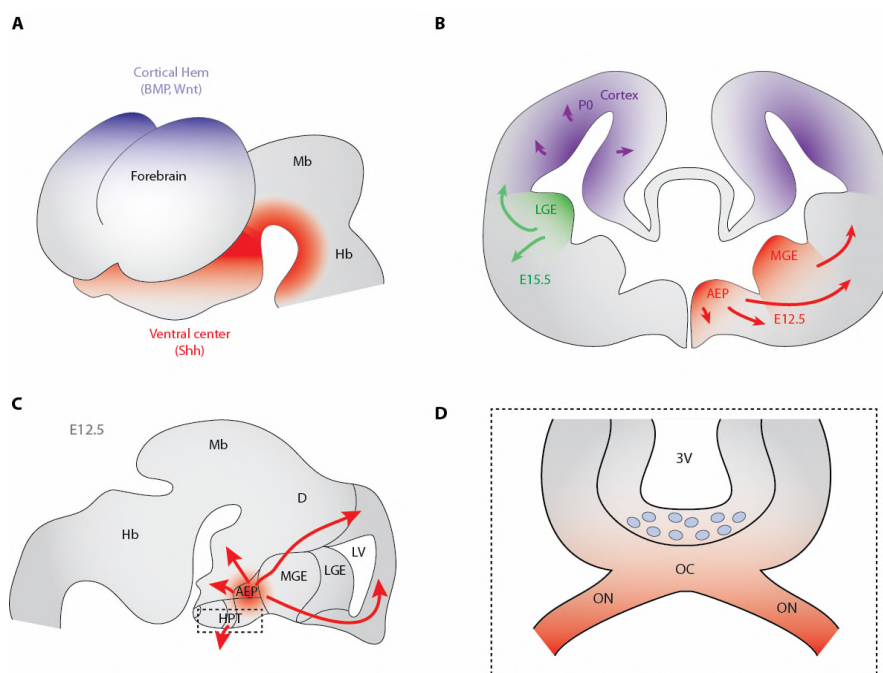


Figure 3. Hedgehog-dependent generation of the OL lineage cells in the brain. (A) Scheme visualizing the ventral (red) and dorsal (blue) organizing centers of the forebrain which secrete Hedgehog and BMP/Wnt, respectively; (B) Cross-sectional view of the mouse telencephalon indicating the regions of the ventricular zone where the different waves of OPCs are generated. The earliest wave (E12.5, red) arises from *Nkx2.1*-expressing precursors, which appear in the anterior entopeduncular area (AEP) and medial ganglionic eminence (MGE) and then migrate into all parts of the telencephalon. The second wave derives from *Gsh2*⁺ precursors located in the lateral ganglionic eminence (LGE, green) at E15.5. The last wave emerges from *Emx1*-expressing cortical precursors (blue) around birth; (C) Sagittal view of the brain indicating the position of the developing hypothalamus which also generates OPCs in E12.5 mouse embryo; (D) Coronal view of the hypothalamic region indicated by the boxed area in (C). The localization of the *Shh* protein (red) transported through the optic nerves (ON) towards the optic chiasm (oc) is shown. The OPCs (blue) generated in the floor of the third ventricle (3V) in a Hedgehog-dependent manner at E12.5 in mice are aimed at colonizing the optic nerves. D, diencephalon; Hb, hindbrain; LV, lateral ventricle; Mb, midbrain.

3.2. Hedgehog-Dependent Production of OPCs in the Ventral Telencephalon

At the end of the 1990s, several publications started to investigate OPC genesis in the forebrain. Precursor cells derived from E15 rat striatum either cultured *in vitro* or transplanted into the eye were shown to have a greater capacity to generate OPCs than precursors from the neocortex [60,61]. Moreover, histological evidence for a ventral source of OLs in the rodent and chick forebrain was reported by establishing the expression profiles of the *Plp/dm20* and *Pdgfra* OPC markers, respectively [42,62]. Since a region of the ventral forebrain was appearing to be specialized for the generation of OPCs, several groups were incited to further define the location of this region and started to explore more accurately its establishment. The data which are presented below support the idea that in the ventral telencephalon, as previously shown in the developing ventral spinal cord and caudal brain, *Shh* is likely one of the factors which are important for the generation of OPCs with nevertheless a higher level of complexity [54,63–65].

The first argument was the localization of the *Pdgfra* expression domain within a region of the anterior hypothalamic neuroepithelium that co-express *Shh* and *Ptc* from E13.5 to E17 in the rat. These expression profiles suggested that *Pdgfra*⁺ progenitors, before spreading to the forebrain into

areas where Shh is not expressed (such as the cerebral cortex), are exposed and respond to Shh. Loss- and gain-of-function experiments supported this hypothesis. The Nkx2.1 null mutant mice which lack the telencephalic Shh expression domain display no Pdgfra⁺ OPCs in the forebrain VZ. In contrast, early OL markers are not lost in areas of the Nkx2.1 mutant forebrain where Shh persists such as the zona limitans intrathalamica and the amygdaloid region [63]. Consistent data were obtained in the zebrafish with a lower level of Olig2 expression in the brain of the syu^{-/-} mutant embryos, which are deficient for Shh [18]. In vivo gain-of-function experiments using the ectopic expression of Shh in the telencephalic neuroepithelium of E9.5 mouse embryos led to the production of a majority of OLs at the expense of neurons. Interestingly, in P21 postnatal mice, Shh-infected cells express myelin markers in the white matter but rarely in the grey matter, suggesting that while Shh can direct cells to an OL fate, local cues are involved in allowing these cells to adopt a mature OL phenotype. In addition, in favor of the role of Shh in OPC production in the ventral telencephalon was the observation that in vivo Shh gain-of-function can partially rescue the failure of OL development in the Nkx2.1 mutants and notably induce Olig2 and Pdgfra⁺ expression ectopically in the dorsal cortical regions in the mutant as in the wild-type animals [63].

Complementary culture systems revealed nevertheless a higher level of complexity for the Shh-dependent generation of OPCs in the forebrain. As expected, the Smo antagonist cyclopamine inhibits OPC development in cultures of mouse ventral telencephalon. However, OPCs were found to develop in cultures of Nkx2.1^{-/-} basal forebrain which lack Shh expression. Even more surprising was the ability of cyclopamine to block OPC generation in those cultures. Similar results were obtained when different regions of the telencephalon including the median ganglionic eminence (MGE), the lateral ganglionic eminence (LGE) and the cortex were cultured as either explants (from E13.5 embryos) or dissociated cells (from E17.5 embryos). All regions were qualitatively similar in their ability to generate OPCs regardless the embryo genotype thus suggesting that Shh is apparently not required for OPC production in vitro [63,65]. Several hypotheses were proposed to account for these results including the presence of Shh and Ihh in the cultures. However, the reasons for Shh-independent generation of OPCs in vitro remained nothing less than surprising.

3.3. Cooperation between Shh and Fibroblast Growth Factors in the Generation of Ventral Telencephalon OPCs

The revisiting of Shh-dependency of forebrain OPC production allowed the identification of a population of Pdgf-responding precursors (PRPs) isolated from E14 mouse MGE and able to respond to Shh signaling. In concert with Pdgf signaling, Shh induces proliferation and/or survival of these cells. In addition, these precursors are able to generate neurospheres which give rise both to neurons and OPCs suggesting that a common precursor can generate these two cell types in the ventral forebrain. The self-renewal of these precursors is cooperatively increased in the presence of both Pdgf and Fgf2. This effect being reduced by the presence of cyclopamine, the self-renewal of PRPs was finally proposed to depend on the effective activation of Shh signaling by both Pdgf and Fgf2 [66]. In the same line, Shh and Fgf2 induce E13.5 mouse neocortical precursors to express the transcription factor Olig2 and to generate OPCs in culture. These shared activities for inducing OPCs involve overlapping intracellular signals. Indeed, the induction of Olig2 by Shh or Fgf2 is strongly inhibited by specific inhibitors of MEK / MAPK or PI3K pathways indicating that these pathways are crucial for the first step of OPC specification. However, only Fgf2 is able to increase MAPK activity. Since Shh effect is strongly inhibited by both cyclopamine and a specific inhibitor of the FGF receptor tyrosine kinase, Shh effect likely depends on Fgf activity for maintaining a basal level of phosphorylated MAPK [67]. The conditional deletion of Fgf receptors (Fgfr) 1 and 2 in the mouse embryonic forebrain then revealed that in vivo Fgf signaling through the cooperation between both receptors is required for the initial generation of OPCs in the ventral forebrain. Since the failure of OPC generation in the Fgfr mutants occurs without loss of Shh signaling and the pharmacological inhibition of either Fgfr or Hedgehog signaling in parallel cultures strongly inhibits OPC generation, it was concluded that Fgfrs cooperate with Shh to generate OPCs [68]. Crosstalk between Shh and Fgf signaling pathways is not restricted to the rodent forebrain, since in the zebrafish, Fgf16 which is required for OL development notably in the forebrain, is induced by the Hedgehog signaling [69].

However, a notable difference might exist in human since FGF2 was there proposed to inhibit the transition of pre-OPCs to OPCs by repressing SHH-dependent co-expression of OLIG2 and NKX2.2 [70].

3.4. OPC Production is Gli2-Independent in the Forebrain

The role of the Gli2 transcription factor in Shh-mediated induction of OPCs was investigated in the mouse forebrain. In contrast to the spinal cord, OL development in the forebrain remains unaffected by Gli2 mutation despite Gli2 expression in this brain area [38]. At E12.5, Shh expression is mainly detected in the mantle zone of the MGE, anterior entopeduncular area (AEP) and hypothalamus both in the wild-type (Figure 3B, C) and the Gli2 mutant embryos with nevertheless a slight difference in the hypothalamus where Shh expression is restricted to the midline in the mutant likely due to the loss of some ventral tissue. No obvious difference is detected in the number or distribution pattern of Olig2⁺ and Pdgfra⁺ OPCs. The latter are highly detected in the VZ of MGE and to a lesser extent in the LGE. A few migratory OPCs are also observed in the mantle of the MGE. At E14.5, numerous Olig2⁺ and Pdgfra⁺ OPCs are found in the striatal and septal regions in both phenotypes with some OPCs already spreading dorsally into the neocortex. If Gli2 activity thus appears to be dispensable for Shh expression in the ventral telencephalon and OPC specification in the forebrain, it remains nevertheless unclear whether Gli2 can play a role in the terminal differentiation of OLs. The apparent unaltered generation of OPCs in the Gli2 mutant forebrain was proposed to be consistent with the possible redundant functions of Gli1 and Gli2 in regulating Shh expression [71] and thus oligodendrogenesis in the forebrain [38].

3.5. The Dorsally-Derived Third Wave of OPC Production in the Telencephalon Depends on Shh

Numerous questions remained unanswered in the forebrain such as the existence of a single homogenous population of OPCs or the involvement of Shh in the generation of all OLs. The finding that competitive waves of OLs exist in the forebrain corresponded to an important progress in our understanding of OPC production in this brain area. By using a Cre-lox fate mapping approach in transgenic mice expressing the Cre recombinase under the control of Nkx2.1, Gsh2 and Emx1, Kessaris and collaborators showed that the first OPCs originate in the AEP and MGE in the ventral forebrain at E12.5. From these regions, they populate the entire embryonic telencephalon including the cerebral cortex just before the appearance of a second wave of OPCs from the LGE at E15.5. A last wave finally arises within the perinatal cortex (Figure 3B). The destruction of one of these populations surprisingly induces the remaining cells to take over and compensate for the lost population [72]. Consistent with the much expanded cortex in the mammalian, the dorsal wave of OPC production exists in rodents but not in birds where all OLs in the cortex were found to arise from ventrally-derived, migratory OPCs [73]. The dual reporter mouse line previously described in the context of the spinal cord and which allowed tracing ventrally and dorsally-derived OPCs and their progeny, led to show that only 20% of OLs in the postnatal corpus callosum are ventrally-derived. This pattern is thus different from the observation done in the developing spinal cord, where most OPCs arise from the ventral VZ under the influence of Hedgehog signaling, whereas a minority is generated from the dorsal VZ in a Hedgehog-independent manner [50].

The hypothesis that ventral OPC appearance depends on Hedgehog signaling while dorsal OPC do not (as previously proposed in the spinal cord but possibly not in more caudal regions of the brain) was questioned by several publications in the telencephalon. For instance, Smo removal in the neural progenitors which express the ubiquitous marker Nestin as soon as E12.5, leads to OL deficiency in the early postnatal telencephalon suggesting Smo involvement in the generation of pallial-derived OLs [74]. Moreover, *in vitro* data reported that neonatal purified cortical OPC cultures are able to respond to Shh which induces a dose-dependent increase of thymidine incorporation in these progenitors [75]. More recent data now provide the demonstration that a dorsal Shh-dependent domain in the SVZ produces large numbers of OLs in the neonatal brain [76]. This domain borders the developing corpus callosum and transiently expresses the Shh target gene Gli1 and the transcription factor Pax6. The use of adenoviral lineage tracing to label dorsal RGCs

expressing Gli1 in neonates led to detect 28 days later, fluorescent cells expressing Olig2, Sox10 and APC (a marker of mature OLs). In addition, the genetic ablation of Smo or in contrast, the expression of the constitutively active Smo M2 receptor in dorsal RGCs resulted in a high reduction or increase, respectively, in the production of OPCs/OLs in the corpus callosum [76]. In parallel and in an unexpected manner, the Gli1 null mice were reported to start myelination in the corpus callosum earlier than the wild-type animals suggesting that Gli1 delays the onset of myelination [77]. This apparent discrepancy will obviously have to be clarified. Interestingly, in adulthood, the ectopic activation of Smo in the dorsal SVZ or the delivery of Shh into the lateral ventricle still promotes oligodendrogenesis in the corpus callosum. In that case, the Shh protein detected in the SVZ is likely produced by various areas of the ventral forebrain and transported through projecting axons or the cerebrospinal fluid [76,78].

In human at midgestation, OPCs originate both in the ventral telencephalon and in the cortical SVZ [79,80]. The OL lineage cells can be detected by markers similar to those used in other vertebrates. The human fetal RGCs isolated from the cortical SVZ are also able to generate OLs in vitro and the production of these cells is enhanced by Shh [79,81,82]. However, the inhibition of endogenous Shh signaling with the Smo antagonist cyclopamine does not reduce the density of Olig2⁺ cells suggesting the existence of an additional Shh-independent mechanism for human OL generation at least in vitro [82].

3.6. Antagonistic Activities of Shh and BMP on the Transcriptome of Telencephalon OPCs

A tightly regulated balance between Shh and BMP has been reported for OPC differentiation in the spinal cord where BMP represses Shh-target genes Olig2 and Nkx2.2 [48]. In a similar manner, investigation of the effects of those morphogens was performed on A2B5⁺ OPCs prepared from rat neonatal cortices. In the presence of Shh and BMP4, A2B5⁺ OPCs give rise to O4⁺ late OPCs and GFAP⁺ astrocytes, respectively. These effects are associated with morphological changes including the appearance of multiple thin processes and rounding up of the soma for Shh-treated precursors and, few thick cytoplasmic expansions together with an enlargement and flattening of the cell body for BMP4-treated cells. Shh also induces the occurrence of electron-dense aggregates distributed along the nuclear periphery whereas BMP4-treated cells retain a dispersed and homogeneously distributed euchromatin. These opposite effects on chromatin compaction were proposed to be likely mediated by a differential regulation of histone acetylation. Hdac1 and 2 appear to repress astrocytic genes during Shh-induced OL differentiation, but to be dispensable for BMP4-induced astroglialogenesis. In OPCs, Hdac activity would thus be responsible for the repression of other lineage genes. Moreover, an interesting heat map representation of gene expression profiles revealed that the progression from OPC to more mature OLs requires fewer transcriptional changes than the conversion to astrocytes since 1200 and 14000 genes are regulated by Shh and BMP4, respectively [83].

3.7. Shh-Dependent Generation of OPCs in the Optic Nerve

In the optic nerve, OPCs are derived from cells located in the diencephalon, especially in the floor of the third ventricle directly dorsal to the optic chiasm (Figure 3C,D). These cells or their progeny populate the optic nerve before becoming differentiating and myelinating OLs [53,84]. The mechanism of the specification of optic nerve OPCs remained unclear until 2006 when Gao and collaborators demonstrated that the appearance of chick OPCs is temporally correlated with and dependent on retinal axon projection to the brain in vitro and in vivo [85]. The observation that the arrival of retinal axons to the forebrain occurs at stages 27–29 (E5–E6) concomitantly with the initial appearance of OPCs incited to perform co-cultures of dorsal spinal cord and retina explants. These cultures indicated that signals derived from the developing retina are competent to induce OPCs in a responsive tissue. One of the molecular cues expressed by retinal axons is Shh. Its expression is correlated spatially and temporally with the axonal growth of the optic nerve towards the optic chiasm. Shh is synthesized in the retinal ganglion cells which are the source of the protein which is then transported via the retinal axons. The Ptc receptor is also strongly expressed in the floor of the

third ventricle at the time of OPC specification. These expression profiles as well as the complete inhibition of the OPC inductive activity of retinal conditioned medium by either cyclopamine or the specific Shh antibody mAb5E1 led to propose that the axonal induction of OPCs depends on Shh. In a consistent manner, *in vivo* injection of cyclopamine at embryonic stage 19 (E2) and analysis at stage 31 (E7) when O4⁺ cells are clearly detectable at the ventral midline of the third ventricle, revealed a dramatic reduction in these cells. The treatment of explants isolated at stage 27 (E5) also led to a decrease in OPCs indicating that OPC induction depends on continued Shh signaling. However, although Shh is likely required for the appearance of optic nerve OPCs, it is probably not sufficient for the commitment of neural epithelial cells to the OL lineage [85].

The distribution of Shh signaling components at later stages of development notably when OPCs colonize the optic nerve suggested that the pathway may contribute to other aspects of OPC development such as their proliferation or migration. In the mouse, scattered precursors are first detected in the proximal end of the nerve at E14.5. They reach the distal end at E16.5 and are homogeneously distributed along the entire nerve by E17.5 [86]. During this period, Shh is still expressed by the retinal ganglion cells and transported along their axons [87–89]. The ventral portion of the third ventricle of E14.5 mouse embryos expresses high levels of Gli1 transcripts which are maintained in the committed OPCs therefore still competent to respond to Shh signaling. The colonization of the optic nerve by OPCs occurs when the majority of the retinal ganglion cell axons have already reached the forebrain. This process is under the control of several growth factors and axon guidance molecules notably promoting OPC mobility along the optic nerve, while BMPs prevent OPCs from invading the neural retina [90]. Cultures of optic nerve explants from E16.5 mouse embryos led to demonstrate that Shh induces the proliferation of optic nerve OPCs and acts as a chemoattractant for their migration. OPC migration is blocked by the specific mAb5E1 Shh antibody. Once they have colonised the optic nerve, OPCs lose their chemoattractive but not their proliferative response to Shh. Shh-dependency of OPC migration was also shown in E4.5 chick embryo by *in ovo* interference with Shh signaling. How newly generated OPCs are not retained in the floor of the third ventricle where Shh protein is also present remains however an open question [91].

The possible involvement of other components of Shh signaling was then addressed notably by the investigation of the role of the multiligand receptor megalin, a member of the low-density lipoprotein receptor family. An interesting observation is that the expression of megalin, Ptc and Gli1 seems to parallel the OPC colonization of the optic nerve from the chiasm to the retina. In the optic nerve, megalin is exclusively expressed in astrocytes at the time when OPCs colonize this structure, whereas Ptc and Gli1 are found in Olig2⁺ cells. The capacity of megalin neutralizing antibodies to block the effects of Shh on the migration and proliferation of optic nerve OPCs suggests that megalin takes part in these effects. The proposed mechanism is that Shh is internalized via the multiligand receptor before being released by astrocytes to promote the migration and proliferation of OPCs. Megalin might thus control the level of Shh available for OPCs along a defined gradient during the colonization of the optic nerve [92].

4. Conclusions

The data accumulated over the years on the role of Hedgehog signaling in the genesis of the OL lineage clearly demonstrates that the pathway, among others, occupies an important position in this developmental process. Hedgehog signaling involvement in OPC production is conserved across vertebrates including human and regards the whole CNS. Despite that, several questions remain notably in the brain where OPC production exhibits a level of complexity higher than in the spinal cord due to the diversity of the cerebral structures. Interestingly, whatever the region of the CNS which is considered, the ventrally (spinal cord) or dorsally (forebrain)-derived OL population that predominates appears to be generated in a Hedgehog-dependent manner. Therefore, a better understanding of the crosstalks existing between Hedgehog signaling and other signaling pathways as well as the identification of the Hedgehog pathway components which transduce Hedgehog

signals should improve our knowledge of the molecular mechanisms which are involved in OPC development and ultimately open new perspectives in myelin diseases.

Acknowledgments: The review received the financial support of the French Multiple Sclerosis Foundation (ARSEP) to E.T. (RAK14147LLA).

Author Contributions: E.T. and J.F. contributed to the redaction of the manuscript and the conception of the figures. All authors commented on the manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interests.

References

1. Hartline, D.K.; Colman, D.R. Rapid conduction and the evolution of giant axons and myelinated fibers. *Curr. Biol.* **2007**, *17*, R29–R35.
2. Zalc, B.; Goujet, D.; Colman, D. The origin of the myelination program in vertebrates. *Curr. Biol.* **2008**, *18*, R511–R512.
3. Rowitch, D.H.; Kriegstein, A.R. Developmental genetics of vertebrate glial-cell specification. *Nature* **2010**, *468*, 214–222.
4. Jessell, T.M. Neuronal specification in the spinal cord: Inductive signals and transcriptional codes. *Nat. Rev. Genet.* **2000**, *1*, 20–29.
5. Warf, B.C.; Fok-Seang, J.; Miller, R.H. Evidence for the ventral origin of oligodendrocyte precursors in the rat spinal cord. *J. Neurosci.* **1991**, *11*, 2477–2488.
6. Ono, K.; Bansal, R.; Payne, J.; Rutishauser, U.; Miller, R.H. Early development and dispersal of oligodendrocyte precursors in the embryonic chick spinal cord. *Development* **1995**, *121*, 1743–1754.
7. Timsit, S.; Martinez, S.; Allinquant, B.; Peyron, F.; Puelles, L.; Zalc, B. Oligodendrocytes originate in a restricted zone of the embryonic ventral neural tube defined by DM-20 mRNA expression. *J. Neurosci.* **1995**, *15*, 1012–1024.
8. Trousse, F.; Giess, M.C.; Soula, C.; Ghandour, S.; Duprat, A.M.; Cochard, P. Notochord and floor plate stimulate oligodendrocyte differentiation in cultures of the chick dorsal neural tube. *J. Neurosci. Res.* **1995**, *41*, 552–560.
9. Pringle, N.P.; Richardson, W.D. A singularity of pdgf alpha-receptor expression in the dorsoventral axis of the neural tube may define the origin of the oligodendrocyte lineage. *Development* **1993**, *117*, 525–533.
10. Pringle, N.P.; Yu, W.P.; Guthrie, S.; Roelink, H.; Lumsden, A.; Peterson, A.C.; Richardson, W.D. Determination of neuroepithelial cell fate: Induction of the oligodendrocyte lineage by ventral midline cells and sonic hedgehog. *Dev. Biol.* **1996**, *177*, 30–42.
11. Poncet, C.; Soula, C.; Trousse, F.; Kan, P.; Hirsinger, E.; Pourquie, O.; Duprat, A.M.; Cochard, P. Induction of oligodendrocyte progenitors in the trunk neural tube by ventralizing signals: Effects of notochord and floor plate grafts, and of sonic hedgehog. *Mech. Dev.* **1996**, *60*, 13–32.
12. Marti, E.; Takada, R.; Bumcrot, D.A.; Sasaki, H.; McMahon, A.P. Distribution of sonic hedgehog peptides in the developing chick and mouse embryo. *Development* **1995**, *121*, 2537–2547.
13. Rowitch, D.H.; S-Jacques, B.; Lee, S.M.; Flax, J.D.; Snyder, E.Y.; McMahon, A.P. Sonic hedgehog regulates proliferation and inhibits differentiation of CNS precursor cells. *J. Neurosci.* **1999**, *19*, 8954–8965.
14. Orentas, D.M.; Hayes, J.E.; Dyer, K.L.; Miller, R.H. Sonic hedgehog signaling is required during the appearance of spinal cord oligodendrocyte precursors. *Development* **1999**, *126*, 2419–2429.
15. Soula, C.; Danesin, C.; Kan, P.; Grob, M.; Poncet, C.; Cochard, P. Distinct sites of origin of oligodendrocytes and somatic motoneurons in the chick spinal cord: Oligodendrocytes arise from Nkx2.2-expressing progenitors by a shh-dependent mechanism. *Development* **2001**, *128*, 1369–1379.
16. Lu, Q.R.; Yuk, D.; Alberta, J.A.; Zhu, Z.; Pawlitzky, I.; Chan, J.; McMahon, A.P.; Stiles, C.D.; Rowitch, D.H. Sonic hedgehog—Regulated oligodendrocyte lineage genes encoding BHLH proteins in the mammalian central nervous system. *Neuron* **2000**, *25*, 317–329.
17. Sussman, C.R.; Davies, J.E.; Miller, R.H. Extracellular and intracellular regulation of oligodendrocyte development: Roles of sonic hedgehog and expression of E proteins. *Glia* **2002**, *40*, 55–64.
18. Park, H.C.; Mehta, A.; Richardson, J.S.; Appel, B. Olig2 is required for zebrafish primary motor neuron and oligodendrocyte development. *Dev. Biol.* **2002**, *248*, 356–368.

19. Schebesta, M.; Serluca, F.C. Olig1 expression identifies developing oligodendrocytes in zebrafish and requires hedgehog and notch signaling. *Dev. Dyn.* **2009**, *238*, 887–898.
20. Takebayashi, H.; Nabeshima, Y.; Yoshida, S.; Chisaka, O.; Ikenaka, K. The basic helix-loop-helix factor Olig2 is essential for the development of motoneuron and oligodendrocyte lineages. *Curr. Biol.* **2002**, *12*, 1157–1163.
21. Sun, T.; Pringle, N.P.; Hardy, A.P.; Richardson, W.D.; Smith, H.K. Pax6 influences the time and site of origin of Glial precursors in the ventral neural tube. *Mol. Cell. Neurosci.* **1998**, *12*, 228–239.
22. Fu, H.; Qi, Y.; Tan, M.; Cai, J.; Takebayashi, H.; Nakafuku, M.; Richardson, W.; Qiu, M. Dual origin of spinal oligodendrocyte progenitors and evidence for the cooperative role of Olig2 and Nkx2.2 in the control of oligodendrocyte differentiation. *Development* **2002**, *129*, 681–693.
23. Zhou, Q.; Choi, G.; Anderson, D.J. The BHLH transcription factor Olig2 promotes oligodendrocyte differentiation in collaboration with Nkx2.2. *Neuron* **2001**, *31*, 791–807.
24. Agius, E.; Soukkarieh, C.; Danesin, C.; Kan, P.; Takebayashi, H.; Soula, C.; Cochard, P. Converse control of oligodendrocyte and astrocyte lineage development by sonic hedgehog in the chick spinal cord. *Dev. Biol.* **2004**, *270*, 308–321.
25. Wu, S.; Wu, Y.; Capocchi, M.R. Motoneurons and oligodendrocytes are sequentially generated from neural stem cells but do not appear to share common lineage-restricted progenitors in vivo. *Development* **2006**, *133*, 581–590.
26. Delaunay, D.; Heydon, K.; Cumano, A.; Schwab, M.H.; Thomas, J.L.; Suter, U.; Nave, K.A.; Zalc, B.; Spassky, N. Early neuronal and glial fate restriction of embryonic neural stem cells. *J. Neurosci.* **2008**, *28*, 2551–2562.
27. Ravanelli, A.M.; Appel, B. Motor neurons and oligodendrocytes arise from distinct cell lineages by progenitor recruitment. *Genes Dev.* **2015**, *29*, 2504–2515.
28. Park, H.C.; Shin, J.; Appel, B. Spatial and temporal regulation of ventral spinal cord precursor specification by hedgehog signaling. *Development* **2004**, *131*, 5959–5969.
29. Danesin, C.; Agius, E.; Escalas, N.; Ai, X.; Emerson, C.; Cochard, P.; Soula, C. Ventral neural progenitors switch toward an oligodendroglial fate in response to increased sonic hedgehog (shh) activity: Involvement of sulfatase 1 in modulating shh signaling in the ventral spinal cord. *J. Neurosci.* **2006**, *26*, 5037–5048.
30. Touahri, Y.; Escalas, N.; Benazeraf, B.; Cochard, P.; Danesin, C.; Soula, C. Sulfatase 1 promotes the motor neuron-to-oligodendrocyte fate switch by activating shh signaling in Olig2 progenitors of the embryonic ventral spinal cord. *J. Neurosci.* **2012**, *32*, 18018–18034.
31. Al Oustah, A.; Danesin, C.; Khouri-Farah, N.; Farreny, M.A.; Escalas, N.; Cochard, P.; Glise, B.; Soula, C. Dynamics of sonic hedgehog signaling in the ventral spinal cord are controlled by intrinsic changes in source cells requiring sulfatase 1. *Development* **2014**, *141*, 1392–1403.
32. Hashimoto, H.; Ishino, Y.; Jiang, W.; Yoshimura, T.; Takeda-Uchimura, Y.; Uchimura, K.; Kadomatsu, K.; Ikenaka, K. Keratan sulfate regulates the switch from motor neuron to oligodendrocyte generation during development of the mouse spinal cord. *Neurochem. Res.* **2016**, *41*, 450–462.
33. Yu, K.; McGlynn, S.; Matisse, M.P. Floor plate-derived sonic hedgehog regulates glial and ependymal cell fates in the developing spinal cord. *Development* **2013**, *140*, 1594–1604.
34. Chung, A.Y.; Kim, S.; Kim, E.; Kim, D.; Jeong, I.; Cha, Y.R.; Bae, Y.K.; Park, S.W.; Lee, J.; Park, H.C. Indian hedgehog B function is required for the specification of oligodendrocyte progenitor cells in the zebrafish CNS. *J. Neurosci.* **2013**, *33*, 1728–1733.
35. Ekker, S.C.; Ungar, A.R.; Greenstein, P.; von Kessler, D.P.; Porter, J.A.; Moon, R.T.; Beachy, P.A. Patterning activities of vertebrate hedgehog proteins in the developing eye and brain. *Curr. Biol.* **1995**, *5*, 944–955.
36. Krauss, S.; Concordet, J.P.; Ingham, P.W. A functionally conserved homolog of the drosophila segment polarity gene hh is expressed in tissues with polarizing activity in zebrafish embryos. *Cell* **1993**, *75*, 1431–1444.
37. Hajihosseini, M.; Tham, T.N.; Dubois-Dalq, M. Origin of oligodendrocytes within the human spinal cord. *J. Neurosci.* **1996**, *16*, 7981–7994.
38. Qi, Y.; Tan, M.; Hui, C.C.; Qiu, M. Gli2 is required for normal shh signaling and oligodendrocyte development in the spinal cord. *Mol. Cell. Neurosci.* **2003**, *23*, 440–450.
39. Tan, M.; Hu, X.; Qi, Y.; Park, J.; Cai, J.; Qiu, M. Gli3 mutation rescues the generation, but not the differentiation, of oligodendrocytes in shh mutants. *Brain Res.* **2006**, *1067*, 158–163.

40. Oh, S.; Huang, X.; Chiang, C. Specific requirements of sonic hedgehog signaling during oligodendrocyte development. *Dev. Dyn.* **2005**, *234*, 489–496.
41. Cameron-Curry, P.; Le Douarin, N.M. Oligodendrocyte precursors originate from both the dorsal and the ventral parts of the spinal cord. *Neuron* **1995**, *15*, 1299–1310.
42. Spassky, N.; Goujet-Zalc, C.; Parmantier, E.; Olivier, C.; Martinez, S.; Ivanova, A.; Ikenaka, K.; Macklin, W.; Cerruti, I.; Zalc, B.; et al. Multiple restricted origin of oligodendrocytes. *J. Neurosci.* **1998**, *18*, 8331–8343.
43. Spassky, N.; Olivier, C.; Perez-Villegas, E.; Goujet-Zalc, C.; Martinez, S.; Thomas, J.; Zalc, B. Single or multiple oligodendroglial lineages: A controversy. *Glia* **2000**, *29*, 143–148.
44. Chandran, S.; Compston, A.; Jauniaux, E.; Gilson, J.; Blakemore, W.; Svendsen, C. Differential generation of oligodendrocytes from human and rodent embryonic spinal cord neural precursors. *Glia* **2004**, *47*, 314–324.
45. Fogarty, M.; Richardson, W.D.; Kessar, N. A subset of oligodendrocytes generated from radial glia in the dorsal spinal cord. *Development* **2005**, *132*, 1951–1959.
46. Cai, J.; Qi, Y.; Hu, X.; Tan, M.; Liu, Z.; Zhang, J.; Li, Q.; Sander, M.; Qiu, M. Generation of oligodendrocyte precursor cells from mouse dorsal spinal cord independent of Nkx6 regulation and shh signaling. *Neuron* **2005**, *45*, 41–53.
47. Vallstedt, A.; Klos, J.M.; Ericson, J. Multiple dorsoventral origins of oligodendrocyte generation in the spinal cord and hindbrain. *Neuron* **2005**, *45*, 55–67.
48. Mekki-Dauriac, S.; Agius, E.; Kan, P.; Cochard, P. Bone morphogenetic proteins negatively control oligodendrocyte precursor specification in the chick spinal cord. *Development* **2002**, *129*, 5117–5130.
49. Miller, R.H.; Dinsio, K.; Wang, R.; Geertman, R.; Maier, C.E.; Hall, A.K. Patterning of spinal cord oligodendrocyte development by dorsally derived BMP4. *J. Neurosci. Res.* **2004**, *76*, 9–19.
50. Tripathi, R.B.; Clarke, L.E.; Burzomato, V.; Kessar, N.; Anderson, P.N.; Attwell, D.; Richardson, W.D. Dorsally and ventrally derived oligodendrocytes have similar electrical properties but myelinate preferred tracts. *J. Neurosci.* **2011**, *31*, 6809–6819.
51. Timsit, S.G.; Bally-Cuif, L.; Colman, D.R.; Zalc, B. Dm-20 mRNA is expressed during the embryonic development of the nervous system of the mouse. *J. Neurochem.* **1992**, *58*, 1172–1175.
52. Davies, J.E.; Miller, R.H. Local sonic hedgehog signaling regulates oligodendrocyte precursor appearance in multiple ventricular zone domains in the chick metencephalon. *Dev. Biol.* **2001**, *233*, 513–525.
53. Ono, K.; Fujisawa, H.; Hirano, S.; Norita, M.; Tsumori, T.; Yasui, Y. Early development of the oligodendrocyte in the embryonic chick metencephalon. *J. Neurosci. Res.* **1997**, *48*, 212–225.
54. Alberta, J.A.; Park, S.K.; Mora, J.; Yuk, D.; Pawlitzky, I.; Iannarelli, P.; Vartanian, T.; Stiles, C.D.; Rowitch, D.H. Sonic hedgehog is required during an early phase of oligodendrocyte development in mammalian brain. *Mol. Cell. Neurosci.* **2001**, *18*, 434–441.
55. Cunliffe, V.T.; Casaccia-Bonnel, P. Histone deacetylase 1 is essential for oligodendrocyte specification in the zebrafish CNS. *Mech. Dev.* **2006**, *123*, 24–30.
56. Boyd, P.J.; Cunliffe, V.T.; Roy, S.; Wood, J.D. Sonic hedgehog functions upstream of disrupted-in-schizophrenia 1 (DISC1): Implications for mental illness. *Biol. Open* **2015**, *4*, 1336–1343.
57. Fu, H.; Cai, J.; Rutledge, M.; Hu, X.; Qiu, M. Oligodendrocytes can be generated from the local ventricular and subventricular zones of embryonic chicken midbrain. *Brain Res.* **2003**, *143*, 161–165.
58. Mecklenburg, N.; Garcia-Lopez, R.; Puelles, E.; Sotelo, C.; Martinez, S. Cerebellar oligodendroglial cells have a mesencephalic origin. *Glia* **2011**, *59*, 1946–1957.
59. Bouslama-Oueghlani, L.; Wehrle, R.; Doulazmi, M.; Chen, X.R.; Jaudon, F.; Lemaigre-Dubreuil, Y.; Rivals, I.; Sotelo, C.; Dusart, I. Purkinje cell maturation participates in the control of oligodendrocyte differentiation: Role of sonic hedgehog and vitronectin. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e49015.
60. Birling, M.C.; Price, J. A study of the potential of the embryonic rat telencephalon to generate oligodendrocytes. *Dev. Biol.* **1998**, *193*, 100–113.
61. Kalman, M.; Tuba, A. Differences in myelination between spinal cord and cortical tissue transplanted intraocularly in rats. *Int. J. Dev. Neurosci.* **1998**, *16*, 115–121.
62. Perez Villegas, E.M.; Olivier, C.; Spassky, N.; Poncet, C.; Cochard, P.; Zalc, B.; Thomas, J.L.; Martinez, S. Early specification of oligodendrocytes in the chick embryonic brain. *Dev. Biol.* **1999**, *216*, 98–113.
63. Nery, S.; Wichterle, H.; Fishell, G. Sonic hedgehog contributes to oligodendrocyte specification in the mammalian forebrain. *Development* **2001**, *128*, 527–540.

64. Qi, Y.; Stapp, D.; Qiu, M. Origin and molecular specification of oligodendrocytes in the telencephalon. *Trends Neurosci.* **2002**, *25*, 223–225.
65. Tekki-Kessarar, N.; Woodruff, R.; Hall, A.C.; Gaffield, W.; Kimura, S.; Stiles, C.D.; Rowitch, D.H.; Richardson, W.D. Hedgehog-dependent oligodendrocyte lineage specification in the telencephalon. *Development* **2001**, *128*, 2545–2554.
66. Chojnacki, A.; Weiss, S. Isolation of a novel platelet-derived growth factor-responsive precursor from the embryonic ventral forebrain. *J. Neurosci.* **2004**, *24*, 10888–10899.
67. Kessarar, N.; Jamen, F.; Rubin, L.L.; Richardson, W.D. Cooperation between sonic hedgehog and fibroblast growth factor/MAPK signalling pathways in neocortical precursors. *Development* **2004**, *131*, 1289–1298.
68. Furusho, M.; Kaga, Y.; Ishii, A.; Hebert, J.M.; Bansal, R. Fibroblast growth factor signaling is required for the generation of oligodendrocyte progenitors from the embryonic forebrain. *J. Neurosci.* **2011**, *31*, 5055–5066.
69. Miyake, A.; Chitose, T.; Kamei, E.; Murakami, A.; Nakayama, Y.; Konishi, M.; Itoh, N. Fgf16 is required for specification of gabaergic neurons and oligodendrocytes in the zebrafish forebrain. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e110836.
70. Hu, B.Y.; Du, Z.W.; Li, X.J.; Ayala, M.; Zhang, S.C. Human oligodendrocytes from embryonic stem cells: Conserved shh signaling networks and divergent fgf effects. *Development* **2009**, *136*, 1443–1452.
71. Bai, C.B.; Joyner, A.L. Gli1 can rescue the in vivo function of Gli2. *Development* **2001**, *128*, 5161–5172.
72. Kessarar, N.; Fogarty, M.; Iannarelli, P.; Grist, M.; Wegner, M.; Richardson, W.D. Competing waves of oligodendrocytes in the forebrain and postnatal elimination of an embryonic lineage. *Nat. Neurosci.* **2006**, *9*, 173–179.
73. Olivier, C.; Cobos, I.; Perez Villegas, E.M.; Spassky, N.; Zalc, B.; Martinez, S.; Thomas, J.L. Monofocal origin of telencephalic oligodendrocytes in the anterior entopeduncular area of the chick embryo. *Development* **2001**, *128*, 1757–1769.
74. Machold, R.; Hayashi, S.; Rutlin, M.; Muzumdar, M.D.; Nery, S.; Corbin, J.G.; Gritli-Linde, A.; Dellovade, T.; Porter, J.A.; Rubin, L.L.; et al. Sonic hedgehog is required for progenitor cell maintenance in telencephalic stem cell niches. *Neuron* **2003**, *39*, 937–950.
75. Lelievre, V.; Ghiani, C.A.; Seksenyan, A.; Gressens, P.; de Vellis, J.; Waschek, J.A. Growth factor-dependent actions of pacap on oligodendrocyte progenitor proliferation. *Regul. Pept.* **2006**, *137*, 58–66.
76. Tong, C.K.; Fuentealba, L.C.; Shah, J.K.; Lindquist, R.A.; Ihrie, R.A.; Guinto, C.D.; Rodas-Rodriguez, J.L.; Alvarez-Buylla, A. A dorsal shh-dependent domain in the V-SVZ produces large numbers of oligodendroglial lineage cells in the postnatal brain. *Stem Cell Rep.* **2015**, *5*, 461–470.
77. Samanta, J.; Grund, E.M.; Silva, H.M.; Lafaille, J.J.; Fishell, G.; Salzer, J.L. Inhibition of Gli1 mobilizes endogenous neural stem cells for remyelination. *Nature* **2015**, *526*, 448–452.
78. Loulier, K.; Ruat, M.; Traiffort, E. Increase of proliferating oligodendroglial progenitors in the adult mouse brain upon sonic hedgehog delivery in the lateral ventricle. *J. Neurochem.* **2006**, *98*, 530–542.
79. Jakovcevski, I.; Filipovic, R.; Mo, Z.; Rakic, S.; Zecevic, N. Oligodendrocyte development and the onset of myelination in the human fetal brain. *Front. Neuroanat.* **2009**, *3*, 5.
80. Rakic, S.; Zecevic, N. Early oligodendrocyte progenitor cells in the human fetal telencephalon. *Glia* **2003**, *41*, 117–127.
81. Mo, Z.; Zecevic, N. Human fetal radial glia cells generate oligodendrocytes in vitro. *Glia* **2009**, *57*, 490–498.
82. Ortega, J.A.; Radonjic, N.V.; Zecevic, N. Sonic hedgehog promotes generation and maintenance of human forebrain Olig2 progenitors. *Front. Cell. Neurosci.* **2013**, *7*, 254.
83. Wu, M.; Hernandez, M.; Shen, S.; Sabo, J.K.; Kelkar, D.; Wang, J.; O'Leary, R.; Phillips, G.R.; Cate, H.S.; Casaccia, P. Differential modulation of the oligodendrocyte transcriptome by sonic hedgehog and bone morphogenetic protein 4 via opposing effects on histone acetylation. *J. Neurosci.* **2012**, *32*, 6651–6664.
84. Small, R.K.; Riddle, P.; Noble, M. Evidence for migration of oligodendrocyte—Type-2 astrocyte progenitor cells into the developing rat optic nerve. *Nature* **1987**, *328*, 155–157.
85. Gao, L.; Miller, R.H. Specification of optic nerve oligodendrocyte precursors by retinal ganglion cell axons. *J. Neurosci.* **2006**, *26*, 7619–7628.
86. Spassky, N.; de Castro, F.; Le Bras, B.; Heydon, K.; Queraud-LeSaux, F.; Bloch-Gallego, E.; Chedotal, A.; Zalc, B.; Thomas, J.L. Directional guidance of oligodendroglial migration by class 3 semaphorins and netrin-1. *J. Neurosci.* **2002**, *22*, 5992–6004.

87. Dakubo, G.D.; Wang, Y.P.; Mazerolle, C.; Campsall, K.; McMahon, A.P.; Wallace, V.A. Retinal ganglion cell-derived sonic hedgehog signaling is required for optic disc and stalk neuroepithelial cell development. *Development* **2003**, *130*, 2967–2980.
88. Wallace, V.A.; Raff, M.C. A role for sonic hedgehog in axon-to-astrocyte signalling in the rodent optic nerve. *Development* **1999**, *126*, 2901–2909.
89. Traiffort, E.; Moya, K.L.; Faure, H.; Hassig, R.; Ruat, M. High expression and anterograde axonal transport of aminoterminal sonic hedgehog in the adult hamster brain. *Eur. J. Neurosci.* **2001**, *14*, 839–850.
90. Gao, L.; Macklin, W.; Gerson, J.; Miller, R.H. Intrinsic and extrinsic inhibition of oligodendrocyte development by rat retina. *Dev. Biol.* **2006**, *290*, 277–286.
91. Merchan, P.; Bribian, A.; Sanchez-Camacho, C.; Lezameta, M.; Bovolenta, P.; de Castro, F. Sonic hedgehog promotes the migration and proliferation of optic nerve oligodendrocyte precursors. *Mol. Cell. Neurosci.* **2007**, *36*, 355–368.
92. Ortega, M.C.; Cases, O.; Merchan, P.; Kozyraki, R.; Clemente, D.; de Castro, F. Megalin mediates the influence of sonic hedgehog on oligodendrocyte precursor cell migration and proliferation during development. *Glia* **2012**, *60*, 851–866.



© 2016 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC-BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Discussion et perspectives...

Tout au long du 20^{ème} siècle, les neurosciences ont fait d'énormes progrès dans la compréhension du système nerveux (SN) notamment en raison de l'évolution des techniques de microscopie et d'histologie. Le développement de l'électrophysiologie en patch- ou voltage-clamp a permis d'accéder aux phénomènes électriques et électrochimiques qui se produisent notamment dans les neurones. Aujourd'hui les nouvelles techniques d'imagerie comme le scanner, l'IRM, l'IRM fonctionnelle, la TEP et l'EEG, permettent d'étudier d'une manière plus sensible le SN dans son ensemble, en particulier les atteintes de la matière blanche avec l'IRM de tenseur de diffusion (DTI) (Dennis and Thompson, 2013). Ces techniques servent au diagnostic et au suivi de la progression des maladies neurodégénératives dans le temps. Plus récemment, elles ont aussi été utilisées pour mettre en évidence des changements microstructuraux du cerveau humain dans l'optique de recherches plus fondamentales (Chang et al., 2017; Zhang et al., 2016). C'est en particulier le cas de l'IRM de tenseur de diffusion ou IRM pondérée en diffusion qui permet de mesurer la mobilité des molécules d'eau notamment modifiée par la présence des fibres nerveuses. Grâce à ses propriétés physiques, l'IRM de tenseur de diffusion a permis jusqu'à un certain point la caractérisation anatomique de la substance blanche incluant le calibre des axones, la densité des fibres et la myélinisation (Chen et al., 2017; Qiu et al., 2015). Grâce à cette approche fut mise en évidence l'existence d'une plasticité de la substance blanche lors de tâches d'apprentissage complexes (Bengtsson et al., 2005; Scholz et al., 2009).

Mon projet de thèse s'intègre dans ce contexte puisqu'il vise à caractériser le rôle d'une molécule transmembranaire reliée aux molécules d'adhésion de la superfamille des immunoglobulines, Boc, dans les processus de myélinisation et remyélinisation. Deux caractéristiques étaient initialement en faveur d'un rôle potentiel de cette protéine dans la mise en place, le maintien, la plasticité et la régénération de la myéline : d'une part sa proximité structurale vis-à-vis de la classe des molécules d'adhésion classiquement considérées comme potentiellement importantes pour la communication cellulaire notamment celle qui doit s'établir entre l'axone et la cellule myélinisante, et d'autre part le fait que l'une des principales fonctions de Boc consiste à transmettre le signal du morphogène Sonic Hedgehog (Shh) lui-même impliqué dans la production des cellules du lignage oligodendrocytaire et de la myéline en conditions physiologiques et pathologiques (pour Revue, Traiffort et al., 2016).

Partant de ces constatations, nous avons mis à profit la disponibilité de la souris Boc KO qui a été construite en ciblant le locus Boc avec une cassette comportant deux gènes 'rapporteur', la β -galactosidase et la phosphatase alcaline placentaire humaine permettant de marquer les corps cellulaires dans le cas de la β -galactosidase et les membranes et l'axone dans le cas de la

phosphatase alcaline placentaire) (Okada et al., 2006).

1. Boc et la complexité de la signalisation Sonic Hedgehog

Depuis la découverte du gène de polarité segmentaire Hedgehog chez la drosophile (Nusslein-Volhard and Wieschaus, 1980), un nombre considérable de protéines capables de réguler les signaux induits par les protéines sécrétées Hedgehog ont été identifiées et ont permis d'établir des modèles de signalisation particulièrement complexes. A la diversité des protéines capables de lier Hedgehog à la surface de la cellule pour permettre sa sécrétion, transmettre son activité à l'intérieur de la cellule réceptrice ou encore rétro-contrôler son activité se sont ajoutées de multiples cascades de signalisation intracellulaires permettant la transmission soit d'effets rapides (de l'ordre de la minute) notamment requis lors du guidage des axones et ne faisant pas appel à la transcription de gènes, soit d'effets beaucoup plus lents et faisant appel à la transcription de gènes notamment rencontrée dans les processus de spécification, prolifération ou différenciation cellulaire (pour Revue (Briscoe and Therond, 2013; Ferent and Traiffort, 2015)).

Boc fait partie des protéines capables de lier les protéines Hedgehog à la surface de la cellule et apporte elle-même un niveau de complexité supplémentaire à cette voie de signalisation. En effet, Boc joue alternativement un rôle de régulateur positif ou négatif de la signalisation Hedgehog, elle a la capacité d'interagir avec d'autres récepteurs (en particulier Cdo) et de participer à la transmission des signaux Hedgehog par différentes cascades de signalisation intracellulaires (canoniques ou non canoniques). Boc est dans la majorité des cas, un régulateur positif de la voie Shh en particulier dans l'induction de la prolifération des cellules granulaires du cervelet (Izzi et al., 2011) ou le guidage des axones commissuraux (Okada et al., 2006) ou rétiniens (Fabre et al., 2010), mais la protéine est aussi capable d'agir comme un régulateur négatif des signaux Hedgehog par exemple en séquestrant le ligand à la surface des cellules qui le produisent en particulier dans les follicules de l'ovaire de drosophile afin de contrôler l'effet prolifératif induit par les protéines Hedgehog sur les cellules souches locales (Hartman et al., 2010). Cette inhibition non autonome a également été montrée après surexpression de Boc/ Cdo dans le tube neural du poulet (Tenzen et al., 2006) mais aussi chez le mutant Boc de poisson zèbre (uml) qui a permis de mettre en évidence la capacité de Boc à limiter l'effet prolifératif des protéines Hedgehog sur les chondrocytes spécifiquement impliqués dans la formation de la mâchoire (Bergeron et al., 2011).

Dans le contexte de la régulation du lignage oligodendrocytaire, les données obtenues au cours de cette thèse sont en faveur d'un rôle de régulateur positif de Boc sur les effets induits par Shh. C'est en particulier le cas dans le cervelet où les expériences de cultures organotypiques indiquent que Boc contrôle positivement la prolifération des OPCs aux dépens de leur différenciation mimant parfaitement l'effet décrit pour Shh lui-même (Bousslama-Oueghlani et al., 2012). Cependant, la situation est un peu plus compliquée dans le cerveau antérieur parce que les effets de la signalisation Shh sur le lignage oligodendrocytaire ont été analysés globalement sans distinguer les différentes étapes de spécification, prolifération et différenciation des OPCs. Les données que nous avons obtenues à la période périnatale (*in vitro* ou sur coupes de tissu cérébral) indiquent que Boc bloque la spécification et induit la prolifération des OPCs aux dépens de leur différenciation en OLs matures. Des données obtenues par d'autres équipes ont montré que des concentrations croissantes de la protéine Shh recombinante augmentent le niveau d'incorporation de la thymidine tritiée dans des cultures d'OPCs issus du cortex néonatal de rat (Lelievre et al., 2006) indiquant le rôle positif de Shh sur la prolifération des OPCs. Par ailleurs, l'inhibition de la différenciation des OPCs en culture par la cyclopamine, un antagoniste de Smo, suggère que Shh favorise aussi la différenciation des OPCs (Falcon et al., 2015).

En considérant l'ensemble de ces données, il apparaît que Boc pourrait transmettre l'activité proliférative de Shh. A l'inverse, l'activité de Boc et Shh ne semblent pas cohérentes dans le cas de la différenciation des OPCs à moins de considérer Boc comme un régulateur négatif de la voie. Il faudrait alors supposer que le même co-récepteur, Boc, soit capable de réguler l'activité de la voie Shh de façon opposée sur les mêmes progéniteurs et dans un même espace temporel, ce qui est difficile à concevoir. De plus, la diminution de la transcription de Gli1 dans le cerveau antérieur des mutants Boc est en faveur d'un rôle plutôt positif (Figure S1).

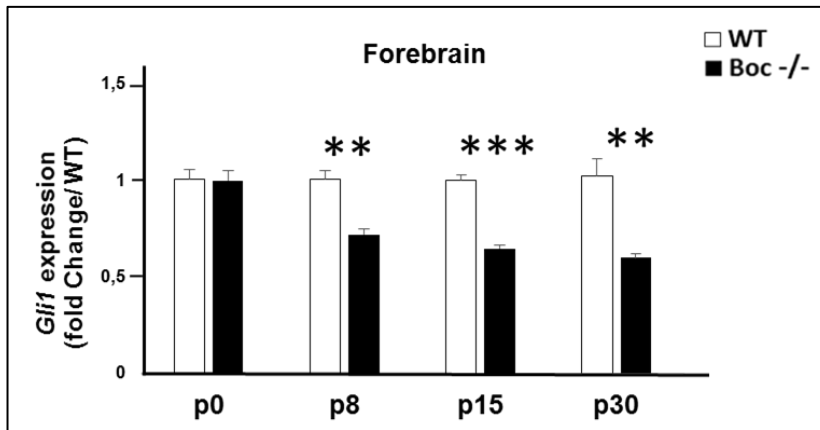


Figure S1: Expression de Gli1 dans le cerveau antérieur postnatal.

Transcription de Gli1 déterminée par qRT-PCR dans le cerveau antérieur en développement des souris WT et Boc^{-/-} de P0 à P30.

D'autres données viennent gêner la compréhension des mécanismes impliqués dans le processus d'oligodendrogenèse et de myélinisation dans le cerveau antérieur. Ainsi, l'inactivation du facteur de transcription Gli1 induit la myélinisation précoce du corps calleux suggérant que la signalisation Shh canonique (Gli1-dépendante) est un inhibiteur de la différenciation des OPCs (Samanta et al., 2015). D'un autre côté, l'inactivation du régulateur positif de la voie Smo dans les cellules de la glie radiale conduit à l'effondrement du nombre d'OLs matures néo-générés dans le corps calleux et le cortex cérébral suggérant vraisemblablement que Smo participe positivement à la spécification et/ou la prolifération des OPCs dans la zone sous-ventriculaire dorsale (Tong et al., 2015). Si Boc et Smo participent l'un et l'autre à l'effet de spécification induit par Shh, cet effet serait alors indépendant de Gli1 étant donné le phénotype observé chez les animaux Gli1 KO (Samanta et al., 2015). Des expériences qui permettront d'analyser l'activité de Shh sur la prolifération et la différenciation des OPCs en présence et en l'absence de Boc sont en cours pour tenter d'améliorer la compréhension de ces processus.

Parmi les protéines capables d'interagir avec Boc, Cdo est celle sur laquelle nous allons nous arrêter plus particulièrement. De nombreux travaux ont montré que Cdo et son frère, Boc, peuvent être co-exprimés dans plusieurs régions du SNC embryonnaire (Mulieri et al., 2002) et au cours du développement post-natal précoce notamment dans le cervelet (Izzi et al., 2011). A l'inverse, l'expression isolée de Boc est également observée par exemple dans les axones commissuraux du tube neural (Okada et al., 2006). Dans ce travail de thèse, l'expression de Cdo n'a pas été analysée. Cependant, une publication récente vient d'étudier le rôle de Cdo dans le lignage oligodendrocytaire *in vitro* dans des cultures d'OPCs purifiés à partir du cortex de rats nouveaux-nés (Wang and Almazan, 2016). Plusieurs arguments nous permettent de penser que

contrairement à ce qui a été précédemment démontré, Boc et Cdo dans le lignage oligodendrocytaire ne sont pas des co-récepteurs de Shh régulant ensemble les cellules de ce lignage. La différence majeure entre les deux protéines est tout d'abord que Boc (mais pas Cdo) est exprimé dans les neurones. Par ailleurs, dans les cultures mixtes de cellules gliales dérivées du cerveau antérieur de souriceaux âgés de 1 ou 2 jours, nous avons identifié la co-expression de Boc avec les marqueurs Olig2, GFAP et Iba1 indiquant que dans ces cultures, Boc est présent non seulement dans le lignage oligodendrocytaire, mais aussi dans les astrocytes et dans la microglie *in vitro* (Figure S2). De plus, nos données dans le cerveau des souris sauvages âgées de 15 jours indiquent que la majorité des cellules du lignage oligodendrocytaire qui expriment Boc sont des OLs matures APC⁺.

Les travaux de Wang et collaborateurs réalisés sur des cultures isolées à partir du cerveau de rat (et non de souris) indiquent que contrairement à Boc, Cdo est majoritairement exprimé dans les OPCs et n'est présent ni dans les astrocytes, ni dans la microglie *in vitro* (Wang and Almazan, 2016). Par ailleurs, nos résultats suggèrent que Boc régule positivement la prolifération et négativement la différenciation des OPCs, alors que Wang et collaborateurs en utilisant des ARN interférents montrent que Cdo favorise la différenciation des OPCs *in vitro* (Wang and Almazan, 2016). Des expériences de surexpression de Boc dans les cultures d'OPCs/OLs purifiés permettront de vérifier l'hypothèse émise à partir de l'analyse du mutant à savoir que Boc induit une augmentation de la prolifération et une diminution de la différenciation des OPCs.

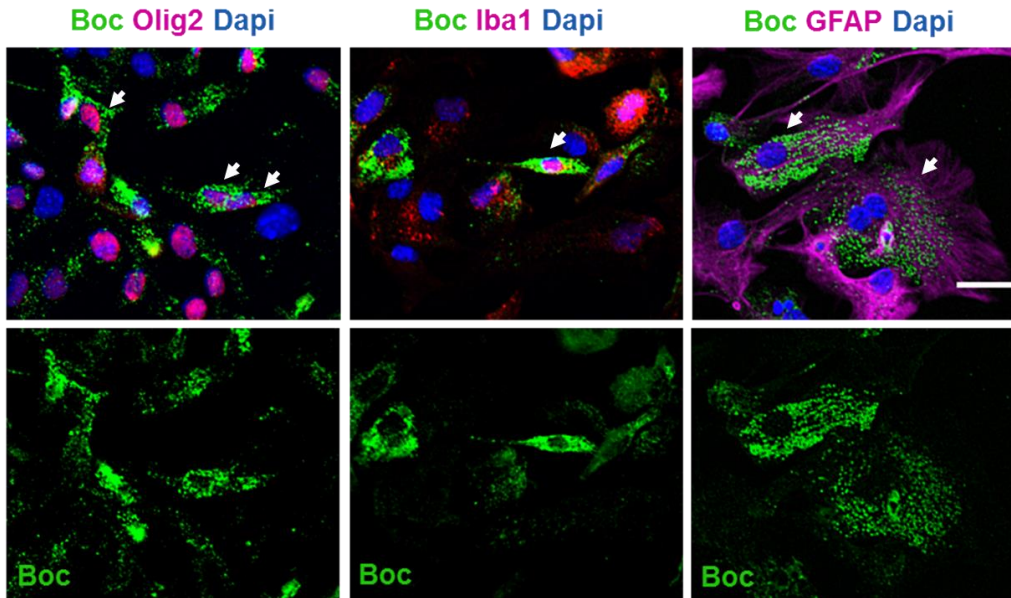


Figure S2: Caractérisation de Boc dans les cellules gliales *in vitro*.

Immunofluorescence réalisée sur des cultures primaires mixtes gliales de cerveau antérieur de souris WT P1-P2 montrant l'expression de Boc (flèches) dans les oligodendrocytes Olig2+, la microglie Iba1+ et les astrocytes GFAP+.

2. L'influence de Boc sur la distribution des différentes populations oligodendrocytaires

Notre analyse de l'expression de Boc au cours de la période post-natale précoce montre que la protéine est présente dans une sous-population réduite de cellules du lignage oligodendrocytaire à l'âge post-natal P15 dans le cortex cérébral et le corps calleux, mais qu'elle est absente du cervelet y compris à un âge plus précoce (P8) où l'on ne détecte pas de cellules oligodendrocytaires exprimant Boc. Cette différence entre le cervelet et le cerveau antérieur n'est donc sans doute pas due au fait que le processus de myélinisation débute plus précocement dans le cervelet que dans le cerveau antérieur. A l'inverse, la différence observée pourrait être liée à l'hétérogénéité récemment démontrée au sein de ce lignage (Marques et al., 2016). Ainsi, une analyse de séquençage de fragments d'ARN après immunoprécipitation de la chromatine sur cellules uniques a été effectuée sur plus de 5000 cellules oligodendrocytaires issues de 10 régions du SNC de souris juvéniles ou adultes. Les données obtenues montrent que des sous-types d'OLs matures apparaissent de manière région-spécifique au cours de la maturation post-

natale des OPCs et que chaque région cérébrale semble optimiser ses circuits locaux en établissant des combinaisons spécifiques d'OLs matures (Marques et al., 2016).

L'hétérogénéité des OLs pourrait aussi être à l'origine des différences régionales que nous avons détectées dans le mutant Boc. A la période périnatale, le cervelet et le cerveau antérieur des animaux mutants présentent l'un et l'autre une diminution de la prolifération des OPCs montrée respectivement dans les cultures organotypiques de tranches de cervelet et dans les cultures primaires de cellules gliales mixtes dérivées du cerveau antérieur. Cependant, plus tardivement, une augmentation de la densité des OLs matures est détectée dans le cervelet du mutant Boc à P15, mais pas dans le cerveau antérieur. A l'inverse, chez l'adulte, l'augmentation de la densité des OLs matures n'est plus détectable dans le cervelet, mais elle apparaît dans le cerveau antérieur. Cette dynamique particulière de l'activité de Boc apparemment dépendante du temps et de la région peut être liée à l'existence de populations d'OLs à des stades de maturation intermédiaires dotés de fonctions spécifiques et transitoires à un moment donné. Ces OLs à des stades intermédiaires vraisemblablement important pour l'établissement de circuits régionaux spécifiques disparaîtraient ensuite. L'existence de ces stades transitoires d'OLs pourrait également expliquer la disparition de l'expression de Boc dans les OLs (mais pas dans les neurones) du cortex et du corps calleux à l'issue de la principale période de myélinisation vers P30 chez la souris.

De façon intéressante, d'autres facteurs impactent de façon différentielle la myélinisation en fonction de la région du SNC considérée. C'est en particulier le cas de la protéine liant la sérine thréonine protéine kinase mTor, Raptor, dont l'ablation induite dans les cellules du lignage oligodendrocytaire conduit à une réduction de la protéine MBP dans la moelle épinière et dans le corps calleux au stade P14, alors que seule la moelle épinière présente une absence complète de MBP à l'âge adulte (Bercery et al., 2014). Une différence régionale a aussi été montrée dans le cas de l'ablation de la kinase Fyn appartenant à la famille des Src kinases qui conduit à une hypomyélinisation dans le cerveau antérieur mais pas dans la moelle épinière (Sperber et al., 2001). Yam et collaborateurs ont montré que dans le tube neural, l'activité de guidage des axones commissuraux induite par Shh via Boc dépend de l'activation des membres de la famille des Src kinases (Yam et al., 2009). L'activité médiée par Boc dans le processus de myélinisation ne fait vraisemblablement pas appel à la Src kinase Fyn étant donné la discordance des phénotypes observés dans les mutants Fyn et Boc.

3. Le rôle unique de Boc dans le contrôle de la myélinisation des petits axones du SNC

Comme nous l'avons déjà mentionné, le développement du lignage oligodendrocytaire comme l'initiation de l'enroulement de la gaine de myéline, son épaisseur et la longueur des segments de myéline entre deux nœuds de Ranvier sont étroitement contrôlés aussi bien temporellement que spatialement (Baumann and Pham-Dinh, 2001; Trapp et al., 1997) par des signaux neuronaux et oligodendrocytaires (Emery, 2010; Hughes and Appel, 2016)

Les données obtenues au cours de cette thèse permettent de proposer Boc comme un élément majoritairement axonal agissant comme un frein à la myélinisation des axones présentant les plus faibles diamètres et comme un régulateur de l'épaisseur de la gaine de myéline pour cette même population d'axones. Cette découverte est originale si l'on considère que dans le SNC, l'identité et le rôle des signaux participant à la régulation de la production de la gaine de myéline sont encore largement méconnus.

La contribution de la Neuréguline, très impliquée dans le processus de myélinisation dans le SNP, n'est pas très claire dans le SNC. Ainsi, bien que les souris *Nrg1* hétérozygotes présentent une épaisseur des gaines de myéline réduite dans le corps calleux (Taveggia et al., 2008), une myélinisation normale apparaît dans les animaux dont le gène *Nrg1* a été excisé dans le SNC (Brinkmann et al., 2008). Ces données suggèrent que d'autres signaux doivent contribuer à l'interaction entre l'OL et l'axone. Par ailleurs, la voie médiée par *Nrg1* joue vraisemblablement des rôles différents selon que l'on considère le développement, le maintien ou la plasticité de la myéline du SNC ou du SNP. *Nrg1* a aussi été proposé comme un interrupteur moléculaire dans la détermination du type de myélinisation adaptée à un circuit neuronal donné (Brinkmann et al., 2008).

D'autres facteurs impliqués dans la myélinisation du SNC commencent à être identifiés. C'est le cas de la molécule d'adhésion cellulaire, l'intégrine $\beta 1$, qui détecte la taille de l'axone et initie la myélinisation de telle manière que la perte de fonction de la voie de l'intégrine $\beta 1$ conduit à un retard de myélinisation des axones de petit diamètre sans modification de l'épaisseur de la gaine de myéline (Camara et al., 2009). De la même façon, l'invalidation de la protéine de polarité Scribble induit une diminution du nombre des axones myélinisés de tout diamètre dans la moelle épinière à la période post-natale précoce, mais chez l'adulte, seul le nombre des axones myélinisés de petit diamètre ($<0.7 \mu\text{m}$) est réduit suggérant que les déficits causés par la perte

de Scribble ne persistent que dans cette sous-population d'axones. Dans ce mutant, de façon inattendue, une hypermyélinisation paradoxale est observée pour l'ensemble des axones (Jarjour et al., 2015). L'inactivation de Boc ne mime aucun de ces deux phénotypes. Cependant on peut noter que la cible commune à ces trois mutants est la population des axones de petit diamètre qui sont myélinisés plus tardivement que les axones de grand diamètre (Hildebrand et al., 1993). Dans le cas des animaux dépourvus de l'intégrine $\beta 1$ et de la protéine Scribble qui sont l'une et l'autre exprimées dans les OLs, l'initiation de la myélinisation ne se fait que si les axones ont un diamètre supérieur au seuil classiquement reconnu pour que les axones soient myélinisés dans le SNC. Par conséquent, l'intégrine $\beta 1$ et Scribble sont nécessaires à la myélinisation des petits axones. A l'inverse, la protéine Boc, essentiellement neuronale, est un frein à la myélinisation des axones de taille comprise entre 0.4 et 0.8 μm suggérant l'existence de mécanismes de contrôle vraisemblablement plus précis qu'initialement imaginés.

Il sera intéressant de déterminer si le mécanisme moléculaire associé à l'activité de Boc repose sur la régulation de l'une des voies connues pour induire une hypermyélinisation à savoir l'inhibition de l'inhibiteur de kinase cycline-dépendant p27 (Casaccia-Bonnet et al., 1997), ou l'activation des voies PI3K/Akt/mTor (Goebbels et al., 2010) et ERK/MAP kinase (Fyffe-Maricich et al., 2011; Jeffries et al., 2016). Le phénotype associé au blocage de p27 met en jeu une production accrue d'OLs matures à l'inverse de l'activation des deux autres voies qui ne modifie pas le nombre de cellules myélinisantes, mais conduit à une production accrue de myéline par OL ou à une hypertrophie des OLs. Enfin, on peut supposer que Boc pourrait interférer avec le mécanisme qui conduit les prolongements émis par les OLs à s'enrouler autour de l'axone. Boc pourrait ainsi empêcher l'induction de la production de la MBP qui conduit à la libération des protéines Gelsolin ou Cofilin, qui permettant le désassemblage des filaments d'actine nécessaire à l'initiation de l'enroulement de la gaine autour de l'axone (Zuchero et al., 2015). Cette hypothèse est cohérente avec l'induction de la transcription de la MBP que nous avons détectée dans le cerveau du mutant Boc à P8.

L'analyse des conséquences de l'absence de Boc sur l'initiation de la myélinisation est en cours dans des co-cultures de ganglions de la racine dorsale de la moelle épinière (DRGs) et d'OLs alternativement dérivés d'animaux sauvages ou mutants pour Boc. Ces expériences permettront également de déterminer les rôles respectifs de l'expression de Boc dans les OLs et dans les axones. Bien que les DRGs ne soient pas la cible habituelle des OLs, ces cellules conduisent en culture à des axones de taille comparable à ceux majoritairement présents dans le corps calleux et qui peuvent être myélinisés par les OLs. Nos expériences préliminaires

suggèrent que Boc soit exprimé dans les DRGS. Nous comparerons également l'initiation de la myélinisation sur les coupes de cerveau des animaux sauvages et mutants à l'âge post-natal P8 au niveau du corps calleux à l'aide d'immuno-marquages MBP/PLP et NF200 pour visualiser respectivement les gaines en formation et les axones à la période où les premières gaines de myéline se forment dans le corps calleux.

Par ailleurs, nous déterminerons si l'hypermyélinisation est due à une augmentation du nombre de tours ou à un changement de périodicité de l'enroulement. Afin d'exclure la possibilité d'un effet de l'absence de Boc sur la croissance axonale radiale, nous déterminerons la distribution du diamètre des axones non myélinisés en plus de celui des axones myélinisés. Enfin, nous mesurerons la longueur des segments de myéline entre deux nœuds de Ranvier en immuno-marquant la protéine associée à la contactine (Caspr). Dans le SNC, plusieurs arguments laissent penser que le nombre de gaines de myéline formées ainsi que l'épaisseur de la gaine sont régulées de manière indépendante. Les souris dépourvues de ERK1/2 ont un défaut d'épaisseur de la gaine mais pas de l'initiation de l'enroulement de la myéline autour de l'axone 2 (Ishii et al., 2012) alors que l'inverse est observé dans le mutant dépourvu de l'activité β 1-intégrine (Camara et al., 2009).

4. Boc et la théorie de la « récapitulation » du processus développemental au cours de la réparation de la myéline

Nos résultats suggèrent un rôle différent de Boc au cours du développement de la myéline et pendant la remyélinisation puisque Boc apparaît comme un frein à la myélinisation développementale, mais un facteur nécessaire à la remyélinisation. Par conséquent, la signalisation médiée par Boc ne suit pas la théorie établie il y a plus d'une dizaine d'années selon laquelle la remyélinisation est une récapitulation du processus développemental de myélinisation (Fancy et al., 2011a). A l'heure actuelle, d'autres voies de signalisation se révèlent ne pas répondre à cette théorie. C'est notamment le cas de la signalisation Wnt/ β -caténine, une voie initialement considérée comme capable de valider la théorie de la récapitulation par son activité inhibitrice de la maturation des OPCs à la fois au cours du développement et de la régénération de la myéline. Cependant, progressivement des discordances sont apparues avec la démonstration d'un effet positif de la voie Wnt sur la transcription des gènes de myéline au cours du développement (pour revue, (Xie et al., 2014)). Afin d'expliquer ces discordances, plusieurs modèles ont été proposés. L'un d'eux suggère qu'un niveau élevé de la signalisation Wnt canonique (β -caténin-dépendante) inhibe la différenciation des OPCs alors qu'une activité modérée de cette voie induit la différenciation des OPCs au cours du développement et du processus régénératif (Fancy et al., 2014; Guo et al., 2015; Xie et al., 2014). Un modèle alternatif est que Tcf4, le facteur de transcription clé de la voie Wnt canonique pourrait induire la différenciation des OPCs de façon indépendante de cette voie (Fancy et al., 2009; Hammond et al., 2015). Le compromis final à toutes ces données est qu'un faible niveau d'activité de la voie Wnt/ β -caténine médiée par Tcf4 induirait la transition entre le stade OPCs et le stade OLS matures pendant le développement, tandis que dans les conditions pathologiques, l'élévation importante de l'activité Wnt inhiberait cette transition peut-être par la mise en jeu d'une voie non canonique.

La mise en jeu de voies canoniques et non-canoniques dans le contexte de la signalisation médiée par Boc est envisageable pour expliquer les actions opposées de Boc sur la maturation des OPCS au cours du développement et au niveau d'une lésion. L'hypothèse nécessite néanmoins des investigations plus approfondies. Par ailleurs, il est important de noter qu'au cours du développement, l'axone subit des changements dynamiques propres à cette période et n'existant pas au niveau de l'axone mature (Franklin and Hinks, 1999; Mason et al., 2001b)(Franklin and Hinks, 1999; Mason et al., 2001a). De même, les OLS produits dans le

cerveau adulte n'ont pas les mêmes propriétés que ceux issus de la période post-natale précoce (Li and Richardson, 2016; Tomassy et al., 2016; Young et al., 2013). Une autre différence majeure entre le développement et la régénération est liée au microenvironnement lésionnel qui contient les astrocytes réactifs et la microglie activée. La transcription de Boc semble particulièrement importante dans les cellules microgliales de la lésion comme précédemment montré pour un autre récepteur clé de la voie, Smo (Ferent et al., 2013). Le phénotype des cellules microgliales pro-inflammatoires (microglie de type M1) ou anti-inflammatoires (microglie de type M2) présentes dans la lésion des animaux sauvages et mutants devra être déterminé en utilisant des marqueurs spécifiques (Miron et al., 2013). Enfin, alors que Boc et Shh semblent l'un et l'autre promouvoir la différenciation des OPCs en OLs matures au cours de la remyélinisation, Boc semble réguler la microglie de façon opposée à Shh (ce manuscrit et Ferent et al., 2013) suggérant que Boc pourrait transmettre l'activité de Shh dans le lignage oligodendrocytaire, mais pas dans la microglie. L'investigation du rôle de Boc dans cette population cellulaire méritera aussi d'être réalisée.

Conclusion

La voie de signalisation Sonic Hedgehog a fait l'objet de certaines publications récentes rapportant le rôle de cette voie non seulement dans le contrôle des progéniteurs oligodendrocytaires (Tong et al., 2015 ; Samanta et al., 2015), mais également dans la réparation de la myéline après démyélinisation (Seifert et al., 2005 ; Wang et al., 2008 ; Bambakidis et al., 2009 ; Ferent et al., 2013 ; Samanta et al., 2015). Cette thèse constitue la première caractérisation d'un co-récepteur de la signalisation Hedgehog impliqué dans le processus régénératif associé aux pathologies démyélinisantes.

En conclusion, l'activité de la protéine Boc dans les processus de myélinisation et remyélinisation pourrait être vraisemblablement importante à considérer dans le futur dans des contextes pathologiques chez l'Homme allant de certaines formes de malformations développementales aux pathologies démyélinisantes.

Bibliographie

- Aggarwal, S., Yurlova, L., Simons, M., 2011. Central nervous system myelin: structure, synthesis and assembly. *Trends Cell Biol* 21, 585-93, doi:10.1016/j.tcb.2011.06.004.
- Agius, E., Soukkaieh, C., Danesin, C., Kan, P., Takebayashi, H., Soula, C., Cochard, P., 2004. Converse control of oligodendrocyte and astrocyte lineage development by Sonic hedgehog in the chick spinal cord. *Dev Biol* 270, 308-21, doi:10.1016/j.ydbio.2004.02.015.
- Aglyamova, G. V., Agarwala, S., 2007. Gene expression analysis of the hedgehog signaling cascade in the chick midbrain and spinal cord. *Dev Dyn* 236, 1363-73, doi:10.1002/dvdy.21146.
- Aguirre, A., Gallo, V., 2004. Postnatal neurogenesis and gliogenesis in the olfactory bulb from NG2-expressing progenitors of the subventricular zone. *J Neurosci* 24, 10530-41, doi:10.1523/JNEUROSCI.3572-04.2004.
- Aguirre, A., Gallo, V., 2007. Reduced EGFR signaling in progenitor cells of the adult subventricular zone attenuates oligodendrogenesis after demyelination. *Neuron Glia Biol* 3, 209-20, doi:10.1017/S1740925X08000082.
- Al Oustah, A., Danesin, C., Khouri-Farah, N., Farreny, M. A., Escalas, N., Cochard, P., Glise, B., Soula, C., 2014. Dynamics of sonic hedgehog signaling in the ventral spinal cord are controlled by intrinsic changes in source cells requiring sulfatase 1. *Development* 141, 1392-403, doi:10.1242/dev.101717.
- Alberta, J. A., Park, S. K., Mora, J., Yuk, D., Pawlitzky, I., Iannarelli, P., Vartanian, T., Stiles, C. D., Rowitch, D. H., 2001. Sonic hedgehog is required during an early phase of oligodendrocyte development in mammalian brain. *Mol Cell Neurosci* 18, 434-41, doi:10.1006/mcne.2001.1026.
- Allen, B. L., Song, J. Y., Izzi, L., Althaus, I. W., Kang, J. S., Charron, F., Krauss, R. S., McMahon, A. P., 2011. Overlapping roles and collective requirement for the coreceptors GAS1, CDO, and BOC in SHH pathway function. *Dev Cell* 20, 775-87, doi:10.1016/j.devcel.2011.04.018.
- Alvarez-Buylla, A., Ihrle, R. A., 2014. Sonic hedgehog signaling in the postnatal brain. *Semin Cell Dev Biol* 33, 105-11, doi:10.1016/j.semcdb.2014.05.008.
- Alvarez-Buylla, A., Kohwi, M., Nguyen, T. M., Merkle, F. T., 2008. The heterogeneity of adult neural stem cells and the emerging complexity of their niche. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 73, 357-65, doi:10.1101/sqb.2008.73.019.
- Alvarez, J. I., Dodelet-Devillers, A., Kebir, H., Ifergan, I., Fabre, P. J., Terouz, S., Sabbagh, M., Wosik, K., Bourbonniere, L., Bernard, M., van Horssen, J., de Vries, H. E., Charron, F., Prat, A., 2011. The Hedgehog pathway promotes blood-brain barrier integrity and CNS immune quiescence. *Science* 334, 1727-31, doi:10.1126/science.1206936.
- Angot, E., Loulier, K., Nguyen-Ba-Charvet, K. T., Gadeau, A. P., Ruat, M., Traffort, E., 2008. Chemoattractive activity of sonic hedgehog in the adult subventricular zone modulates the number of neural precursors reaching the olfactory bulb. *Stem Cells* 26, 2311-20, doi:10.1634/stemcells.2008-0297.
- Ara, J., See, J., Mamontov, P., Hahn, A., Bannerman, P., Pleasure, D., Grinspan, J. B., 2008. Bone morphogenetic proteins 4, 6, and 7 are up-regulated in mouse spinal cord during experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci Res* 86, 125-35, doi:10.1002/jnr.21462.
- Argaw, A. T., Asp, L., Zhang, J., Navrazhina, K., Pham, T., Mariani, J. N., Mahase, S., Dutta, D. J., Seto, J., Kramer, E. G., Ferrara, N., Sofroniew, M. V., John, G. R., 2012. Astrocyte-derived VEGF-A drives blood-brain barrier disruption in CNS inflammatory disease. *J Clin Invest* 122, 2454-68, doi:10.1172/JCI60842.
- Armstrong, M. T., Lee, D. Y., Armstrong, P. B., 2000. Regulation of proliferation of the fetal myocardium. *Dev Dyn* 219, 226-36, doi:10.1002/1097-0177(2000)9999:9999<::AID-DVDY1049>3.0.CO;2-0.
- Armstrong, R. C., Harvath, L., Dubois-Dalcq, M. E., 1990. Type 1 astrocytes and oligodendrocyte-type 2 astrocyte glial progenitors migrate toward distinct molecules. *J Neurosci Res* 27, 400-7, doi:10.1002/jnr.490270319.

- Arnett, H. A., Mason, J., Marino, M., Suzuki, K., Matsushima, G. K., Ting, J. P., 2001. TNF alpha promotes proliferation of oligodendrocyte progenitors and remyelination. *Nat Neurosci* 4, 1116-22, doi:10.1038/nn738.
- Arnett, H. A., Fancy, S. P., Alberta, J. A., Zhao, C., Plant, S. R., Kaing, S., Raine, C. S., Rowitch, D. H., Franklin, R. J., Stiles, C. D., 2004. bHLH transcription factor Olig1 is required to repair demyelinated lesions in the CNS. *Science* 306, 2111-5, doi:10.1126/science.1103709.
- Ascherio, A., Munger, K., 2008. Epidemiology of multiple sclerosis: from risk factors to prevention. *Semin Neurol* 28, 17-28, doi:10.1055/s-2007-1019126.
- Bae, G. U., Domene, S., Roessler, E., Schachter, K., Kang, J. S., Muenke, M., Krauss, R. S., 2011. Mutations in CDON, encoding a hedgehog receptor, result in holoprosencephaly and defective interactions with other hedgehog receptors. *Am J Hum Genet* 89, 231-40, doi:10.1016/j.ajhg.2011.07.001.
- Bae, G. U., Kim, B. G., Lee, H. J., Oh, J. E., Lee, S. J., Zhang, W., Krauss, R. S., Kang, J. S., 2009. Cdo binds Abl to promote p38alpha/beta mitogen-activated protein kinase activity and myogenic differentiation. *Mol Cell Biol* 29, 4130-43, doi:10.1128/MCB.00199-09.
- Balordi, F., Fishell, G., 2007. Mosaic removal of hedgehog signaling in the adult SVZ reveals that the residual wild-type stem cells have a limited capacity for self-renewal. *J Neurosci* 27, 14248-59, doi:10.1523/JNEUROSCI.4531-07.2007.
- Bambakidis, N. C., Miller, R. H., 2004. Transplantation of oligodendrocyte precursors and sonic hedgehog results in improved function and white matter sparing in the spinal cords of adult rats after contusion. *Spine J* 4, 16-26.
- Bambakidis, N. C., Horn, E. M., Nakaji, P., Theodore, N., Bless, E., Dellovade, T., Ma, C., Wang, X., Preul, M. C., Coons, S. W., Spetzler, R. F., Sonntag, V. K., 2009. Endogenous stem cell proliferation induced by intravenous hedgehog agonist administration after contusion in the adult rat spinal cord. *J Neurosurg Spine* 10, 171-6, doi:10.3171/2008.10.SPI08231.
- Banerjee, S. B., Rajendran, R., Dias, B. G., Ladiwala, U., Tole, S., Vaidya, V. A., 2005. Recruitment of the Sonic hedgehog signalling cascade in electroconvulsive seizure-mediated regulation of adult rat hippocampal neurogenesis. *Eur J Neurosci* 22, 1570-80, doi:10.1111/j.1460-9568.2005.04317.x.
- Barnes, E. A., Kong, M., Ollendorff, V., Donoghue, D. J., 2001. Patched1 interacts with cyclin B1 to regulate cell cycle progression. *EMBO J* 20, 2214-23, doi:10.1093/emboj/20.9.2214.
- Baron, W., Hoekstra, D., 2010. On the biogenesis of myelin membranes: sorting, trafficking and cell polarity. *FEBS Lett* 584, 1760-70, doi:10.1016/j.febslet.2009.10.085.
- Barzi, M., Kostrz, D., Menendez, A., Pons, S., 2011. Sonic Hedgehog-induced proliferation requires specific Galpha inhibitory proteins. *J Biol Chem* 286, 8067-74, doi:10.1074/jbc.M110.178772.
- Bauman, T. M., Kasper, L. H., 2004. Novel approaches and cutting edge immunotherapies in multiple sclerosis. *Front Biosci* 9, 2302-22.
- Baumann, N., Pham-Dinh, D., 2001. Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol Rev* 81, 871-927.
- Baxter, A. G., 2007. The origin and application of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nat Rev Immunol* 7, 904-12, doi:10.1038/nri2190.
- Belgacem, Y. H., Borodinsky, L. N., 2011. Sonic hedgehog signaling is decoded by calcium spike activity in the developing spinal cord. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 4482-7, doi:10.1073/pnas.1018217108.
- Bengtsson, S. L., Ehrsson, H. H., Forssberg, H., Ullen, F., 2005. Effector-independent voluntary timing: behavioural and neuroimaging evidence. *Eur J Neurosci* 22, 3255-65, doi:10.1111/j.1460-9568.2005.04517.x.
- Bercury, K. K., Dai, J., Sachs, H. H., Ahrendsen, J. T., Wood, T. L., Macklin, W. B., 2014. Conditional ablation of raptor or rictor has differential impact on oligodendrocyte differentiation and CNS myelination. *J Neurosci* 34, 4466-80, doi:10.1523/JNEUROSCI.4314-13.2014.

- Bergeron, S. A., Tyurina, O. V., Miller, E., Bagas, A., Karlstrom, R. O., 2011. Brother of cdo (umleitung) is cell-autonomously required for Hedgehog-mediated ventral CNS patterning in the zebrafish. *Development* 138, 75-85, doi:10.1242/dev.057950.
- Berry, M., Hubbard, P., Butt, A. M., 2002. Cytology and lineage of NG2-positive glia. *J Neurocytol* 31, 457-67.
- Beug, S. T., Parks, R. J., McBride, H. M., Wallace, V. A., 2011. Processing-dependent trafficking of Sonic hedgehog to the regulated secretory pathway in neurons. *Mol Cell Neurosci* 46, 583-96, doi:10.1016/j.mcn.2010.12.009.
- Bidet, M., Joubert, O., Lacombe, B., Ciantar, M., Nehme, R., Mollat, P., Bretillon, L., Faure, H., Bittman, R., Ruat, M., Mus-Veteau, I., 2011. The hedgehog receptor patched is involved in cholesterol transport. *PLoS One* 6, e23834.
- Bielecki, B., Mattern, C., Ghomari, A. M., Javaid, S., Smietanka, K., Abi Ghanem, C., Mhaouty-Kodja, S., Ghandour, M. S., Baulieu, E. E., Franklin, R. J., Schumacher, M., Traiffort, E., 2016. Unexpected central role of the androgen receptor in the spontaneous regeneration of myelin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, 14829-14834, doi:10.1073/pnas.1614826113.
- Bijlsma, M. F., Spek, C. A., Zivkovic, D., van de Water, S., Rezaee, F., Peppelenbosch, M. P., 2006. Repression of smoothed by patched-dependent (pro-)vitamin D3 secretion. *PLoS Biol* 4, e232, doi:10.1371/journal.pbio.0040232.
- Biname, F., Sakry, D., Dimou, L., Jolivel, V., Trotter, J., 2013. NG2 regulates directional migration of oligodendrocyte precursor cells via Rho GTPases and polarity complex proteins. *J Neurosci* 33, 10858-74, doi:10.1523/JNEUROSCI.5010-12.2013.
- Birey, F., Kloc, M., Chavali, M., Hussein, I., Wilson, M., Christoffel, D. J., Chen, T., Frohman, M. A., Robinson, J. K., Russo, S. J., Maffei, A., Aguirre, A., 2015. Genetic and Stress-Induced Loss of NG2 Glia Triggers Emergence of Depressive-like Behaviors through Reduced Secretion of FGF2. *Neuron* 88, 941-56, doi:10.1016/j.neuron.2015.10.046.
- Birgbauer, E., Rao, T. S., Webb, M., 2004. Lysolecithin induces demyelination in vitro in a cerebellar slice culture system. *J Neurosci Res* 78, 157-66, doi:10.1002/jnr.20248.
- Bizzozero, O. A., McGarry, J. F., Lees, M. B., 1987. Autoacylation of myelin proteolipid protein with acyl coenzyme A. *J Biol Chem* 262, 13550-7.
- Blakemore, W. F., 1974. Pattern of remyelination in the CNS. *Nature* 249, 577-8.
- Blakemore, W. F., 1981. Remyelination in the CNS. *Prog Clin Biol Res* 59A, 105-9.
- Blakemore, W. F., Franklin, R. J., 2008. Remyelination in experimental models of toxin-induced demyelination. *Curr Top Microbiol Immunol* 318, 193-212.
- Bogazzi, F., Hudson, L. D., Nikodem, V. M., 1994. A novel heterodimerization partner for thyroid hormone receptor. Peroxisome proliferator-activated receptor. *J Biol Chem* 269, 11683-6.
- Boslama-Oueghlani, L., Wehrle, R., Doulazmi, M., Chen, X. R., Jaudon, F., Lemaigre-Dubreuil, Y., Rivals, I., Sotelo, C., Dusart, I., 2012. Purkinje cell maturation participates in the control of oligodendrocyte differentiation: role of sonic hedgehog and vitronectin. *PLoS One* 7, e49015, doi:10.1371/journal.pone.0049015.
- Bradl, M., Lassmann, H., 2010. Oligodendrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 119, 37-53, doi:10.1007/s00401-009-0601-5.
- Brambilla, R., Morton, P. D., Ashbaugh, J. J., Karmally, S., Lambertsen, K. L., Bethea, J. R., 2014. Astrocytes play a key role in EAE pathophysiology by orchestrating in the CNS the inflammatory response of resident and peripheral immune cells and by suppressing remyelination. *Glia* 62, 452-67, doi:10.1002/glia.22616.
- Brennan, D., Chen, X., Cheng, L., Mahoney, M., Riobo, N. A., 2012. Noncanonical Hedgehog signaling. *Vitam Horm* 88, 55-72, doi:10.1016/B978-0-12-394622-5.00003-1.

- Brex, P. A., Ciccarelli, O., O'Riordan, J. I., Sailer, M., Thompson, A. J., Miller, D. H., 2002. A longitudinal study of abnormalities on MRI and disability from multiple sclerosis. *N Engl J Med* 346, 158-64, doi:10.1056/NEJMoa011341.
- Brinkmann, B. G., Agarwal, A., Sereda, M. W., Garratt, A. N., Muller, T., Wende, H., Stassart, R. M., Nawaz, S., Humml, C., Velanac, V., Radyushkin, K., Goebbels, S., Fischer, T. M., Franklin, R. J., Lai, C., Ehrenreich, H., Birchmeier, C., Schwab, M. H., Nave, K. A., 2008. Neuregulin-1/ErbB signaling serves distinct functions in myelination of the peripheral and central nervous system. *Neuron* 59, 581-95, doi:10.1016/j.neuron.2008.06.028.
- Briscoe, J., Therond, P. P., 2013. The mechanisms of Hedgehog signalling and its roles in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14, 416-29, doi:10.1038/nrm3598.
- Briscoe, J., Pierani, A., Jessell, T. M., Ericson, J., 2000. A homeodomain protein code specifies progenitor cell identity and neuronal fate in the ventral neural tube. *Cell* 101, 435-45.
- Briscoe, J., Sussel, L., Serup, P., Hartigan-O'Connor, D., Jessell, T. M., Rubenstein, J. L., Ericson, J., 1999. Homeobox gene *Nkx2.2* and specification of neuronal identity by graded Sonic hedgehog signalling. *Nature* 398, 622-7, doi:10.1038/19315.
- Brownlee, W. J., Hardy, T. A., Fazekas, F., Miller, D. H., 2016. Diagnosis of multiple sclerosis: progress and challenges. *Lancet*, doi:10.1016/S0140-6736(16)30959-X.
- Buglino, J. A., Resh, M. D., 2008. What is a palmitoylacyltransferase with specificity for N-palmitoylation of Sonic Hedgehog. *J Biol Chem* 283, 22076-88, doi:10.1074/jbc.M803901200.
- Bunge, M. B., Bunge, R. P., Ris, H., 1961. Ultrastructural study of remyelination in an experimental lesion in adult cat spinal cord. *J Biophys Biochem Cytol* 10, 67-94.
- Byrne, E. F., Sircar, R., Miller, P. S., Hedger, G., Luchetti, G., Nachtergaele, S., Tully, M. D., Mydock-McGrane, L., Covey, D. F., Rambo, R. P., Sansom, M. S., Newstead, S., Rohatgi, R., Siebold, C., 2016. Structural basis of Smoothed regulation by its extracellular domains. *Nature* 535, 517-22, doi:10.1038/nature18934.
- Cai, J., Qi, Y., Hu, X., Tan, M., Liu, Z., Zhang, J., Li, Q., Sander, M., Qiu, M., 2005. Generation of oligodendrocyte precursor cells from mouse dorsal spinal cord independent of *Nkx6* regulation and *Shh* signaling. *Neuron* 45, 41-53, doi:10.1016/j.neuron.2004.12.028.
- Calabrese, M., Magliozzi, R., Ciccarelli, O., Geurts, J. J., Reynolds, R., Martin, R., 2015a. Exploring the origins of grey matter damage in multiple sclerosis. *Nat Rev Neurosci* 16, 147-58, doi:10.1038/nrn3900.
- Calabrese, M., Reynolds, R., Magliozzi, R., Castellaro, M., Morra, A., Scalfari, A., Farina, G., Romualdi, C., Gajofatto, A., Pitteri, M., Benedetti, M. D., Monaco, S., 2015b. Regional Distribution and Evolution of Gray Matter Damage in Different Populations of Multiple Sclerosis Patients. *PLoS One* 10, e0135428, doi:10.1371/journal.pone.0135428.
- Calza, L., Giardino, L., Pozza, M., Bettelli, C., Micera, A., Aloe, L., 1998. Proliferation and phenotype regulation in the subventricular zone during experimental allergic encephalomyelitis: in vivo evidence of a role for nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 3209-14.
- Camara, J., Wang, Z., Nunes-Fonseca, C., Friedman, H. C., Grove, M., Sherman, D. L., Komiyama, N. H., Grant, S. G., Brophy, P. J., Peterson, A., French-Constant, C., 2009. Integrin-mediated axoglial interactions initiate myelination in the central nervous system. *J Cell Biol* 185, 699-712, doi:10.1083/jcb.200807010.
- Cammer, W., Zhang, H., 1999. Maturation of oligodendrocytes is more sensitive to TNF alpha than is survival of precursors and immature oligodendrocytes. *J Neuroimmunol* 97, 37-42.
- Cantarella, C., Cayre, M., Magalon, K., Durbec, P., 2008. Intranasal HB-EGF administration favors adult SVZ cell mobilization to demyelinated lesions in mouse corpus callosum. *Dev Neurobiol* 68, 223-36, doi:10.1002/dneu.20588.
- Carroll, W. M., Jennings, A. R., 1994. Early recruitment of oligodendrocyte precursors in CNS demyelination. *Brain* 117 (Pt 3), 563-78.

- Casaccia-Bonnet, P., Tikoo, R., Kiyokawa, H., Friedrich, V., Jr., Chao, M. V., Koff, A., 1997. Oligodendrocyte precursor differentiation is perturbed in the absence of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1. *Genes Dev* 11, 2335-46.
- Casali, A., 2010. Self-induced patched receptor down-regulation modulates cell sensitivity to the hedgehog morphogen gradient. *Sci Signal* 3, ra63, doi:10.1126/scisignal.2001059.
- Castelfranco, A. M., Hartline, D. K., 2015. The evolution of vertebrate and invertebrate myelin: a theoretical computational study. *J Comput Neurosci* 38, 521-38, doi:10.1007/s10827-015-0552-x.
- Cayre, M., Courtes, S., Martineau, F., Giordano, M., Arnaud, K., Zamaron, A., Durbec, P., 2013. Netrin 1 contributes to vascular remodeling in the subventricular zone and promotes progenitor emigration after demyelination. *Development* 140, 3107-17, doi:10.1242/dev.092999.
- Chamoun, Z., Mann, R. K., Nellen, D., von Kessler, D. P., Bellotto, M., Beachy, P. A., Basler, K., 2001. Skinny hedgehog, an acyltransferase required for palmitoylation and activity of the hedgehog signal. *Science* 293, 2080-4, doi:10.1126/science.1064437.
- Chan, J. R., Watkins, T. A., Cosgaya, J. M., Zhang, C., Chen, L., Reichardt, L. F., Shooter, E. M., Barres, B. A., 2004. NGF controls axonal receptivity to myelination by Schwann cells or oligodendrocytes. *Neuron* 43, 183-91, doi:10.1016/j.neuron.2004.06.024.
- Chang, E. H., Argyelan, M., Aggarwal, M., Chandon, T. S., Karlsgodt, K. H., Mori, S., Malhotra, A. K., 2017. Diffusion tensor imaging measures of white matter compared to myelin basic protein immunofluorescence in tissue cleared intact brains. *Data Brief* 10, 438-443, doi:10.1016/j.dib.2016.12.018.
- Chapouly, C., Tadesse Argaw, A., Horng, S., Castro, K., Zhang, J., Asp, L., Loo, H., Laitman, B. M., Mariani, J. N., Straus Farber, R., Zaslavsky, E., Nudelman, G., Raine, C. S., John, G. R., 2015. Astrocytic TYMP and VEGFA drive blood-brain barrier opening in inflammatory central nervous system lesions. *Brain* 138, 1548-67, doi:10.1093/brain/awv077.
- Charles, P., Hernandez, M. P., Stankoff, B., Aigrot, M. S., Colin, C., Rougon, G., Zalc, B., Lubetzki, C., 2000. Negative regulation of central nervous system myelination by polysialylated-neural cell adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 7585-90, doi:10.1073/pnas.100076197.
- Charron, F., Stein, E., Jeong, J., McMahon, A. P., Tessier-Lavigne, M., 2003. The morphogen sonic hedgehog is an axonal chemoattractant that collaborates with netrin-1 in midline axon guidance. *Cell* 113, 11-23.
- Charytoniuk, D., Traiffort, E., Hantraye, P., Hermel, J. M., Galdes, A., Ruat, M., 2002. Intrastratial sonic hedgehog injection increases Patched transcript levels in the adult rat subventricular zone. *Eur J Neurosci* 16, 2351-7.
- Chaudhary, P., Marracci, G., Galipeau, D., Pocius, E., Morris, B., Bourdette, D., 2015. Lipoic acid reduces inflammation in a mouse focal cortical experimental autoimmune encephalomyelitis model. *J Neuroimmunol* 289, 68-74, doi:10.1016/j.jneuroim.2015.10.011.
- Chen, J., Zhou, C., Zhu, L., Yan, X., Wang, Y., Chen, X., Fang, S., 2017. Magnetic resonance diffusion tensor imaging for occult lesion detection in multiple sclerosis. *Exp Ther Med* 13, 91-96, doi:10.3892/etm.2016.3950.
- Chen, M. H., Li, Y. J., Kawakami, T., Xu, S. M., Chuang, P. T., 2004. Palmitoylation is required for the production of a soluble multimeric Hedgehog protein complex and long-range signaling in vertebrates. *Genes Dev* 18, 641-59, doi:10.1101/gad.1185804.
- Chen, Y., Wu, H., Wang, S., Koito, H., Li, J., Ye, F., Hoang, J., Escobar, S. S., Gow, A., Arnett, H. A., Trapp, B. D., Karandikar, N. J., Hsieh, J., Lu, Q. R., 2009. The oligodendrocyte-specific G protein-coupled receptor GPR17 is a cell-intrinsic timer of myelination. *Nat Neurosci* 12, 1398-406, doi:10.1038/nn.2410.

- Chinchilla, P., Xiao, L., Kazanietz, M. G., Riobo, N. A., 2010. Hedgehog proteins activate pro-angiogenic responses in endothelial cells through non-canonical signaling pathways. *Cell Cycle* 9, 570-79, doi:10.4161/cc.9.3.10591.
- Chuang, P. T., Kawcak, T., McMahon, A. P., 2003. Feedback control of mammalian Hedgehog signaling by the Hedgehog-binding protein, Hip1, modulates Fgf signaling during branching morphogenesis of the lung. *Genes Dev* 17, 342-7, doi:10.1101/gad.1026303.
- Cohen, R. I., Marmur, R., Norton, W. T., Mehler, M. F., Kessler, J. A., 1996. Nerve growth factor and neurotrophin-3 differentially regulate the proliferation and survival of developing rat brain oligodendrocytes. *J Neurosci* 16, 6433-42.
- Colak, D., Mori, T., Brill, M. S., Pfeifer, A., Falk, S., Deng, C., Monteiro, R., Mummery, C., Sommer, L., Gotz, M., 2008. Adult neurogenesis requires Smad4-mediated bone morphogenic protein signaling in stem cells. *J Neurosci* 28, 434-46, doi:10.1523/JNEUROSCI.4374-07.2008.
- Colton, C. A., 2009. Heterogeneity of microglial activation in the innate immune response in the brain. *J Neuroimmune Pharmacol* 4, 399-418, doi:10.1007/s11481-009-9164-4.
- Compston, A., Coles, A., 2008. Multiple sclerosis. *Lancet* 372, 1502-17, doi:10.1016/S0140-6736(08)61620-7.
- Compston, D. A., Batchelor, J. R., McDonald, W. I., 1976. B-lymphocyte alloantigens associated with multiple sclerosis. *Lancet* 2, 1261-5.
- Confavreux, C., Vukusic, S., 2006. Accumulation of irreversible disability in multiple sclerosis: from epidemiology to treatment. *Clin Neurol Neurosurg* 108, 327-32, doi:10.1016/j.clineuro.2005.11.018.
- Connor, R. M., Allen, C. L., Devine, C. A., Claxton, C., Key, B., 2005. BOC, brother of CDO, is a dorsoventral axon-guidance molecule in the embryonic vertebrate brain. *J Comp Neurol* 485, 32-42, doi:10.1002/cne.20503.
- Corbit, K. C., Aanstad, P., Singla, V., Norman, A. R., Stainier, D. Y., Reiter, J. F., 2005. Vertebrate Smoothed functions at the primary cilium. *Nature* 437, 1018-21, doi:10.1038/nature04117.
- Corrales, J. D., Rocco, G. L., Blaess, S., Guo, Q., Joyner, A. L., 2004. Spatial pattern of sonic hedgehog signaling through Gli genes during cerebellum development. *Development* 131, 5581-90, doi:10.1242/dev.01438.
- Coulombe, J., Traiffort, E., Loulier, K., Faure, H., Ruat, M., 2004. Hedgehog interacting protein in the mature brain: membrane-associated and soluble forms. *Mol Cell Neurosci* 25, 323-33, doi:10.1016/j.mcn.2003.10.024.
- Crawford, A. H., Tripathi, R. B., Foerster, S., McKenzie, I., Kougioumtzidou, E., Grist, M., Richardson, W. D., Franklin, R. J., 2016. Pre-Existing Mature Oligodendrocytes Do Not Contribute to Remyelination following Toxin-Induced Spinal Cord Demyelination. *Am J Pathol* 186, 511-6, doi:10.1016/j.ajpath.2015.11.005.
- Currier, D. G., Polk, R. C., Reeves, R. H., 2012. A Sonic hedgehog (Shh) response deficit in trisomic cells may be a common denominator for multiple features of Down syndrome. *Prog Brain Res* 197, 223-36, doi:10.1016/B978-0-444-54299-1.00011-X.
- Czopka, T., Ffrench-Constant, C., Lyons, D. A., 2013. Individual oligodendrocytes have only a few hours in which to generate new myelin sheaths in vivo. *Dev Cell* 25, 599-609, doi:10.1016/j.devcel.2013.05.013.
- D'Angelo, G., Matusek, T., Pizette, S., Therond, P. P., 2015. Endocytosis of Hedgehog through dispatched regulates long-range signaling. *Dev Cell* 32, 290-303, doi:10.1016/j.devcel.2014.12.004.
- Dahmane, N., Ruiz i Altaba, A., 1999. Sonic hedgehog regulates the growth and patterning of the cerebellum. *Development* 126, 3089-100.

- Dai, J., Bercury, K. K., Ahrendsen, J. T., Macklin, W. B., 2015. Olig1 function is required for oligodendrocyte differentiation in the mouse brain. *J Neurosci* 35, 4386-402, doi:10.1523/JNEUROSCI.4962-14.2015.
- Danesin, C., Agius, E., Escalas, N., Ai, X., Emerson, C., Cochard, P., Soula, C., 2006. Ventral neural progenitors switch toward an oligodendroglial fate in response to increased Sonic hedgehog (Shh) activity: involvement of Sulfatase 1 in modulating Shh signaling in the ventral spinal cord. *J Neurosci* 26, 5037-48, doi:10.1523/JNEUROSCI.0715-06.2006.
- Das, I., Park, J. M., Shin, J. H., Jeon, S. K., Lorenzi, H., Linden, D. J., Worley, P. F., Reeves, R. H., 2013. Hedgehog agonist therapy corrects structural and cognitive deficits in a Down syndrome mouse model. *Sci Transl Med* 5, 201ra120, doi:10.1126/scitranslmed.3005983.
- Davies, J. E., Miller, R. H., 2001. Local sonic hedgehog signaling regulates oligodendrocyte precursor appearance in multiple ventricular zone domains in the chick metencephalon. *Dev Biol* 233, 513-25, doi:10.1006/dbio.2001.0224.
- Dawson, M. R., Polito, A., Levine, J. M., Reynolds, R., 2003. NG2-expressing glial progenitor cells: an abundant and widespread population of cycling cells in the adult rat CNS. *Mol Cell Neurosci* 24, 476-88.
- de Faria, O., Jr., Cui, Q. L., Bin, J. M., Bull, S. J., Kennedy, T. E., Bar-Or, A., Antel, J. P., Colman, D. R., Dhaunchak, A. S., 2012. Regulation of miRNA 219 and miRNA Clusters 338 and 17-92 in Oligodendrocytes. *Front Genet* 3, 46, doi:10.3389/fgene.2012.00046.
- de Lucas, A. G., Schuhmacher, A. J., Oteo, M., Romero, E., Camara, J. A., de Martino, A., Arroyo, A. G., Morcillo, M. A., Squatrito, M., Martinez-Torrecedrada, J. L., Mulero, F., 2016. Targeting MT1-MMP as an ImmunoPET-Based Strategy for Imaging Gliomas. *PLoS One* 11, e0158634, doi:10.1371/journal.pone.0158634.
- Delbue, S., Comar, M., Ferrante, P., 2016. Natalizumab treatment of multiple sclerosis: new insights. *Immunotherapy*, doi:10.2217/imt-2016-0113.
- Dell'Acqua, M. L., Lorenzini, L., D'Intino, G., Sivilia, S., Pasqualetti, P., Panetta, V., Paradisi, M., Filippi, M. M., Baiguera, C., Pizzi, M., Giardino, L., Rossini, P. M., Calza, L., 2012. Functional and molecular evidence of myelin- and neuroprotection by thyroid hormone administration in experimental allergic encephalomyelitis. *Neuropathol Appl Neurobiol* 38, 454-70, doi:10.1111/j.1365-2990.2011.01228.x.
- Denef, N., Neubuser, D., Perez, L., Cohen, S. M., 2000. Hedgehog induces opposite changes in turnover and subcellular localization of patched and smoothed. *Cell* 102, 521-31.
- Denic, A., Johnson, A. J., Bieber, A. J., Warrington, A. E., Rodriguez, M., Pirko, I., 2011. The relevance of animal models in multiple sclerosis research. *Pathophysiology* 18, 21-9, doi:10.1016/j.pathophys.2010.04.004.
- Denney, L., Kok, W. L., Cole, S. L., Sanderson, S., McMichael, A. J., Ho, L. P., 2012. Activation of invariant NKT cells in early phase of experimental autoimmune encephalomyelitis results in differentiation of Ly6Chi inflammatory monocyte to M2 macrophages and improved outcome. *J Immunol* 189, 551-7, doi:10.4049/jimmunol.1103608.
- Dennis, E. L., Thompson, P. M., 2013. Typical and atypical brain development: a review of neuroimaging studies. *Dialogues Clin Neurosci* 15, 359-84.
- Derfuss, T., 2012. Personalized medicine in multiple sclerosis: hope or reality? *BMC Med* 10, 116, doi:10.1186/1741-7015-10-116.
- Dessaud, E., Yang, L. L., Hill, K., Cox, B., Ulloa, F., Ribeiro, A., Mynett, A., Novitch, B. G., Briscoe, J., 2007. Interpretation of the sonic hedgehog morphogen gradient by a temporal adaptation mechanism. *Nature* 450, 717-20, doi:10.1038/nature06347.

- Dessaud, E., Ribes, V., Balaskas, N., Yang, L. L., Pierani, A., Kicheva, A., Novitsch, B. G., Briscoe, J., Sasai, N., 2010. Dynamic assignment and maintenance of positional identity in the ventral neural tube by the morphogen sonic hedgehog. *PLoS Biol* 8, e1000382, doi:10.1371/journal.pbio.1000382.
- Deverman, B. E., Patterson, P. H., 2012. Exogenous leukemia inhibitory factor stimulates oligodendrocyte progenitor cell proliferation and enhances hippocampal remyelination. *J Neurosci* 32, 2100-9, doi:10.1523/JNEUROSCI.3803-11.2012.
- Dimou, L., Simon, C., Kirchhoff, F., Takebayashi, H., Gotz, M., 2008. Progeny of Olig2-expressing progenitors in the gray and white matter of the adult mouse cerebral cortex. *J Neurosci* 28, 10434-42, doi:10.1523/JNEUROSCI.2831-08.2008.
- Doetsch, F., Alvarez-Buylla, A., 1996. Network of tangential pathways for neuronal migration in adult mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 14895-900.
- Doetsch, F., Garcia-Verdugo, J. M., Alvarez-Buylla, A., 1997. Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci* 17, 5046-61.
- Dolati, S., Babaloo, Z., Jadidi-Niaragh, F., Ayromlou, H., Sadreddini, S., Yousefi, M., 2016. Multiple sclerosis: Therapeutic applications of advancing drug delivery systems. *Biomed Pharmacother* 86, 343-353, doi:10.1016/j.biopha.2016.12.010.
- Dugas, J. C., Cuellar, T. L., Scholze, A., Ason, B., Ibrahim, A., Emery, B., Zamanian, J. L., Foo, L. C., McManus, M. T., Barres, B. A., 2010. Dicer1 and miR-219 Are required for normal oligodendrocyte differentiation and myelination. *Neuron* 65, 597-611, doi:10.1016/j.neuron.2010.01.027.
- Duncan, I. D., Brower, A., Kondo, Y., Curlee, J. F., Jr., Schultz, R. D., 2009. Extensive remyelination of the CNS leads to functional recovery. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 6832-6, doi:10.1073/pnas.0812500106.
- Dusart, I., Marty, S., Peschanski, M., 1992. Demyelination, and remyelination by Schwann cells and oligodendrocytes after kainate-induced neuronal depletion in the central nervous system. *Neuroscience* 51, 137-48.
- Eaton, S., 2008. Multiple roles for lipids in the Hedgehog signalling pathway. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 437-45, doi:10.1038/nrm2414.
- Echelard, Y., Epstein, D. J., St-Jacques, B., Shen, L., Mohler, J., McMahon, J. A., McMahon, A. P., 1993. Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell* 75, 1417-30.
- Ekker, S. C., McGrew, L. L., Lai, C. J., Lee, J. J., von Kessler, D. P., Moon, R. T., Beachy, P. A., 1995. Distinct expression and shared activities of members of the hedgehog gene family of *Xenopus laevis*. *Development* 121, 2337-47.
- El-Etr, M., Rame, M., Boucher, C., Ghomari, A. M., Kumar, N., Liere, P., Pianos, A., Schumacher, M., Sitruk-Ware, R., 2015. Progesterone and nestorone promote myelin regeneration in chronic demyelinating lesions of corpus callosum and cerebral cortex. *Glia* 63, 104-17, doi:10.1002/glia.22736.
- Emery, B., 2010. Regulation of oligodendrocyte differentiation and myelination. *Science* 330, 779-82, doi:10.1126/science.1190927.
- Emery, B., Agalliu, D., Cahoy, J. D., Watkins, T. A., Dugas, J. C., Mulinyawe, S. B., Ibrahim, A., Ligon, K. L., Rowitch, D. H., Barres, B. A., 2009. Myelin gene regulatory factor is a critical transcriptional regulator required for CNS myelination. *Cell* 138, 172-85, doi:10.1016/j.cell.2009.04.031.
- Engel, U., Wolswijk, G., 1996. Oligodendrocyte-type-2 astrocyte (O-2A) progenitor cells derived from adult rat spinal cord: in vitro characteristics and response to PDGF, bFGF and NT-3. *Glia* 16, 16-26, doi:10.1002/(SICI)1098-1136(199601)16:1<16::AID-GLIA3>3.0.CO;2-9.

- Ericson, J., Briscoe, J., Rashbass, P., van Heyningen, V., Jessell, T. M., 1997. Graded sonic hedgehog signaling and the specification of cell fate in the ventral neural tube. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 62, 451-66.
- Eyo, U. B., Dailey, M. E., 2013. Microglia: key elements in neural development, plasticity, and pathology. *J Neuroimmune Pharmacol* 8, 494-509, doi:10.1007/s11481-013-9434-z.
- Fabre, P. J., Shimogori, T., Charron, F., 2010. Segregation of ipsilateral retinal ganglion cell axons at the optic chiasm requires the Shh receptor. *J Neurosci* 30, 266-75, doi:10.1523/JNEUROSCI.3778-09.2010.
- Falcon, M. I., Riley, J. D., Jirsa, V., McIntosh, A. R., Shereen, A. D., Chen, E. E., Solodkin, A., 2015. The Virtual Brain: Modeling Biological Correlates of Recovery after Chronic Stroke. *Front Neurol* 6, 228, doi:10.3389/fneur.2015.00228.
- Fancy, S. P., Zhao, C., Franklin, R. J., 2004. Increased expression of Nkx2.2 and Olig2 identifies reactive oligodendrocyte progenitor cells responding to demyelination in the adult CNS. *Mol Cell Neurosci* 27, 247-54, doi:10.1016/j.mcn.2004.06.015.
- Fancy, S. P., Chan, J. R., Baranzini, S. E., Franklin, R. J., Rowitch, D. H., 2011a. Myelin regeneration: a recapitulation of development? *Annu Rev Neurosci* 34, 21-43, doi:10.1146/annurev-neuro-061010-113629.
- Fancy, S. P., Baranzini, S. E., Zhao, C., Yuk, D. I., Irvine, K. A., Kaing, S., Sanai, N., Franklin, R. J., Rowitch, D. H., 2009. Dysregulation of the Wnt pathway inhibits timely myelination and remyelination in the mammalian CNS. *Genes Dev* 23, 1571-85, doi:10.1101/gad.1806309.
- Fancy, S. P., Harrington, E. P., Baranzini, S. E., Silbereis, J. C., Shiow, L. R., Yuen, T. J., Huang, E. J., Lomvardas, S., Rowitch, D. H., 2014. Parallel states of pathological Wnt signaling in neonatal brain injury and colon cancer. *Nat Neurosci* 17, 506-12, doi:10.1038/nn.3676.
- Fancy, S. P., 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., Franklin, R. J., Rowitch, D. H., 2011b. Axin2 as regulatory and therapeutic target in newborn brain injury and remyelination. *Nat Neurosci* 14, 1009-16, doi:10.1038/nn.2855.
- Farmer, W. T., Abrahamsson, T., Chierzi, S., Lui, C., Zaelzer, C., Jones, E. V., Bally, B. P., Chen, G. G., Theroux, J. F., Peng, J., Bourque, C. W., Charron, F., Ernst, C., Sjöström, P. J., Murai, K. K., 2016. Neurons diversify astrocytes in the adult brain through sonic hedgehog signaling. *Science* 351, 849-54, doi:10.1126/science.aab3103.
- Felts, P. A., Woolston, A. M., Fernando, H. B., Asquith, S., Gregson, N. A., Mizzi, O. J., Smith, K. J., 2005. Inflammation and primary demyelination induced by the intraspinal injection of lipopolysaccharide. *Brain* 128, 1649-66, doi:10.1093/brain/awh516.
- Ferent, J., Traiffort, E., 2015. Hedgehog: Multiple Paths for Multiple Roles in Shaping the Brain and Spinal Cord. *Neuroscientist* 21, 356-71, doi:10.1177/1073858414531457.
- Ferent, J., Zimmer, C., Durbec, P., Ruat, M., Traiffort, E., 2013. Sonic Hedgehog signaling is a positive oligodendrocyte regulator during demyelination. *J Neurosci* 33, 1759-72, doi:10.1523/JNEUROSCI.3334-12.2013.
- Ferent, J., Cochard, L., Faure, H., Taddei, M., Hahn, H., Ruat, M., Traiffort, E., 2014. Genetic activation of Hedgehog signaling unbalances the rate of neural stem cell renewal by increasing symmetric divisions. *Stem Cell Reports* 3, 312-23, doi:10.1016/j.stemcr.2014.05.016.
- Fernandes de Abreu, D. A., Eyles, D., Feron, F., 2009a. Vitamin D, a neuro-immunomodulator: implications for neurodegenerative and autoimmune diseases. *Psychoneuroendocrinology* 34 Suppl 1, S265-77, doi:10.1016/j.psyneuen.2009.05.023.
- Fernandes de Abreu, D. A., Babron, M. C., Rebeix, I., Fontenille, C., Yaouanq, J., Brassat, D., Fontaine, B., Clerget-Darpoux, F., Jehan, F., Feron, F., 2009b. Season of birth and not vitamin D receptor

- promoter polymorphisms is a risk factor for multiple sclerosis. *Mult Scler* 15, 1146-52, doi:10.1177/1352458509106780.
- Flores, A. I., Narayanan, S. P., Morse, E. N., Shick, H. E., Yin, X., Kidd, G., Avila, R. L., Kirschner, D. A., Macklin, W. B., 2008. Constitutively active Akt induces enhanced myelination in the CNS. *J Neurosci* 28, 7174-83, doi:10.1523/JNEUROSCI.0150-08.2008.
- Fogarty, M., Richardson, W. D., Kessaris, N., 2005. A subset of oligodendrocytes generated from radial glia in the dorsal spinal cord. *Development* 132, 1951-9, doi:10.1242/dev.01777.
- Fok-Seang, J., Miller, R. H., 1994. Distribution and differentiation of A2B5+ glial precursors in the developing rat spinal cord. *J Neurosci Res* 37, 219-35, doi:10.1002/jnr.490370208.
- Franco, P. G., Silvestroff, L., Soto, E. F., Pasquini, J. M., 2008. Thyroid hormones promote differentiation of oligodendrocyte progenitor cells and improve remyelination after cuprizone-induced demyelination. *Exp Neurol* 212, 458-67, doi:10.1016/j.expneurol.2008.04.039.
- Franklin, R. J., 2002. Why does remyelination fail in multiple sclerosis? *Nat Rev Neurosci* 3, 705-14, doi:10.1038/nrn917.
- Franklin, R. J., Blakemore, W. F., 1997. Transplanting oligodendrocyte progenitors into the adult CNS. *J Anat* 190 (Pt 1), 23-33.
- Franklin, R. J., Hinks, G. L., 1999. Understanding CNS remyelination: clues from developmental and regeneration biology. *J Neurosci Res* 58, 207-13.
- Franklin, R. J., Ffrench-Constant, C., 2008. Remyelination in the CNS: from biology to therapy. *Nat Rev Neurosci* 9, 839-55, doi:10.1038/nrn2480.
- Fruttiger, M., Karlsson, L., Hall, A. C., Abramsson, A., Calver, A. R., Bostrom, H., Willetts, K., Bertold, C. H., Heath, J. K., Betsholtz, C., Richardson, W. D., 1999. Defective oligodendrocyte development and severe hypomyelination in PDGF-A knockout mice. *Development* 126, 457-67.
- Fu, H., Cai, J., Rutledge, M., Hu, X., Qiu, M., 2003. Oligodendrocytes can be generated from the local ventricular and subventricular zones of embryonic chicken midbrain. *Brain Res Dev Brain Res* 143, 161-5.
- Fuller, M. L., DeChant, A. K., Rothstein, B., Caprariello, A., Wang, R., Hall, A. K., Miller, R. H., 2007. Bone morphogenetic proteins promote gliosis in demyelinating spinal cord lesions. *Ann Neurol* 62, 288-300, doi:10.1002/ana.21179.
- Fyffe-Maricich, S. L., Karlo, J. C., Landreth, G. E., Miller, R. H., 2011. The ERK2 mitogen-activated protein kinase regulates the timing of oligodendrocyte differentiation. *J Neurosci* 31, 843-50, doi:10.1523/JNEUROSCI.3239-10.2011.
- Gallet, A., 2011. Hedgehog morphogen: from secretion to reception. *Trends Cell Biol* 21, 238-46, doi:10.1016/j.tcb.2010.12.005.
- Gao, L., Miller, R. H., 2006. Specification of optic nerve oligodendrocyte precursors by retinal ganglion cell axons. *J Neurosci* 26, 7619-28, doi:10.1523/JNEUROSCI.0855-06.2006.
- Garbern, J. Y., 2007. Pelizaeus-Merzbacher disease: Genetic and cellular pathogenesis. *Cell Mol Life Sci* 64, 50-65, doi:10.1007/s00018-006-6182-8.
- Garcia, A. D., Petrova, R., Eng, L., Joyner, A. L., 2010. Sonic hedgehog regulates discrete populations of astrocytes in the adult mouse forebrain. *J Neurosci* 30, 13597-608, doi:10.1523/JNEUROSCI.0830-10.2010.
- Genuardi, M., Calvieri, F., Tozzi, C., Coslovi, R., Neri, G., 1994. A new case of interstitial deletion of chromosome 3q, del(3q)(q13.12q21.3), with agenesis of the corpus callosum. *Clin Dysmorphol* 3, 292-6.
- Ghasemlou, N., Jeong, S. Y., Lacroix, S., David, S., 2007. T cells contribute to lysophosphatidylcholine-induced macrophage activation and demyelination in the CNS. *Glia* 55, 294-302, doi:10.1002/glia.20449.

- Ghoumari, A. M., Baulieu, E. E., Schumacher, M., 2005. Progesterone increases oligodendroglial cell proliferation in rat cerebellar slice cultures. *Neuroscience* 135, 47-58, doi:10.1016/j.neuroscience.2005.05.023.
- Gibson, E. M., Purger, D., Mount, C. W., Goldstein, A. K., Lin, G. L., Wood, L. S., Inema, I., Miller, S. E., Bieri, G., Zuchero, J. B., Barres, B. A., Woo, P. J., Vogel, H., Monje, M., 2014. Neuronal activity promotes oligodendrogenesis and adaptive myelination in the mammalian brain. *Science* 344, 1252304, doi:10.1126/science.1252304.
- Goebbels, S., Oltrogge, J. H., Wolfer, S., Wieser, G. L., Nientiedt, T., Pieper, A., Ruhwedel, T., Groszer, M., Sereda, M. W., Nave, K. A., 2012. Genetic disruption of Pten in a novel mouse model of tomaculous neuropathy. *EMBO Mol Med* 4, 486-99, doi:10.1002/emmm.201200227.
- Goebbels, S., Oltrogge, J. H., Kemper, R., Heilmann, I., Bormuth, I., Wolfer, S., Wichert, S. P., Mobius, W., Liu, X., Lappe-Siefke, C., Rossner, M. J., Groszer, M., Suter, U., Frahm, J., Boretius, S., Nave, K. A., 2010. Elevated phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in glia triggers cell-autonomous membrane wrapping and myelination. *J Neurosci* 30, 8953-64, doi:10.1523/JNEUROSCI.0219-10.2010.
- Goetz, S. C., Anderson, K. V., 2010. The primary cilium: a signalling centre during vertebrate development. *Nat Rev Genet* 11, 331-44, doi:10.1038/nrg2774.
- Gold, R., Lington, C., Lassmann, H., 2006. Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain* 129, 1953-71, doi:10.1093/brain/awl075.
- Gonzalez-Perez, O., Romero-Rodriguez, R., Soriano-Navarro, M., Garcia-Verdugo, J. M., Alvarez-Buylla, A., 2009. Epidermal growth factor induces the progeny of subventricular zone type B cells to migrate and differentiate into oligodendrocytes. *Stem Cells* 27, 2032-43, doi:10.1002/stem.119.
- Goodin, D. S., 2009. The causal cascade to multiple sclerosis: a model for MS pathogenesis. *PLoS One* 4, e4565, doi:10.1371/journal.pone.0004565.
- Goudarzi, S., Rivera, A., Butt, A. M., Hafizi, S., 2016. Gas6 Promotes Oligodendrogenesis and Myelination in the Adult Central Nervous System and After Lysolecithin-Induced Demyelination. *ASN Neuro* 8, doi:10.1177/1759091416668430.
- Greer, J. M., 2015. The Role of HLA in MS Susceptibility and Phenotype. *Curr Top Behav Neurosci* 26, 1-27, doi:10.1007/7854_2014_357.
- Groves, A. K., Barnett, S. C., Franklin, R. J., Crang, A. J., Mayer, M., Blakemore, W. F., Noble, M., 1993. Repair of demyelinated lesions by transplantation of purified O-2A progenitor cells. *Nature* 362, 453-5, doi:10.1038/362453a0.
- Gudi, V., Moharreggh-Khiabani, D., Skripuletz, T., Koutsoudaki, P. N., Kotsiari, A., Skuljec, J., Trebst, C., Stangel, M., 2009. Regional differences between grey and white matter in cuprizone induced demyelination. *Brain Res* 1283, 127-38, doi:10.1016/j.brainres.2009.06.005.
- Guo, Q. H., Yang, H. J., Wang, S. D., 2015. Olanzapine inhibits the proliferation and induces the differentiation of glioma stem-like cells through modulating the Wnt signaling pathway in vitro. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 19, 2406-15.
- Hack, M. A., Saghatelian, A., de Chevigny, A., Pfeifer, A., Ashery-Padan, R., Lledo, P. M., Gotz, M., 2005. Neuronal fate determinants of adult olfactory bulb neurogenesis. *Nat Neurosci* 8, 865-72, doi:10.1038/nn1479.
- Haider, L., Simeonidou, C., Steinberger, G., Hametner, S., Grigoriadis, N., Deretzi, G., Kovacs, G. G., Kutzelnigg, A., Lassmann, H., Frischer, J. M., 2014. Multiple sclerosis deep grey matter: the relation between demyelination, neurodegeneration, inflammation and iron. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 85, 1386-95, doi:10.1136/jnnp-2014-307712.
- Hammond, E., Lang, J., Maeda, Y., Pleasure, D., Angus-Hill, M., Xu, J., Horiuchi, M., Deng, W., Guo, F., 2015. The Wnt effector transcription factor 7-like 2 positively regulates oligodendrocyte differentiation

- in a manner independent of Wnt/beta-catenin signaling. *J Neurosci* 35, 5007-22, doi:10.1523/JNEUROSCI.4787-14.2015.
- Hammond, T. R., Gadea, A., Dupree, J., Kerninon, C., Nait-Oumesmar, B., Aguirre, A., Gallo, V., 2014. Astrocyte-derived endothelin-1 inhibits remyelination through notch activation. *Neuron* 81, 588-602, doi:10.1016/j.neuron.2013.11.015.
- Han, Y. G., Spassky, N., Romaguera-Ros, M., Garcia-Verdugo, J. M., Aguilar, A., Schneider-Maunoury, S., Alvarez-Buylla, A., 2008. Hedgehog signaling and primary cilia are required for the formation of adult neural stem cells. *Nat Neurosci* 11, 277-84, doi:10.1038/nn2059.
- Handel, A. E., Handunnethi, L., Ebers, G. C., Ramagopalan, S. V., 2009. Type 1 diabetes mellitus and multiple sclerosis: common etiological features. *Nat Rev Endocrinol* 5, 655-64, doi:10.1038/nrendo.2009.216.
- Harauz, G., Boggs, J. M., 2013. Myelin management by the 18.5-kDa and 21.5-kDa classic myelin basic protein isoforms. *J Neurochem* 125, 334-61, doi:10.1111/jnc.12195.
- Harlow, D. E., Macklin, W. B., 2014. Inhibitors of myelination: ECM changes, CSPGs and PTPs. *Exp Neurol* 251, 39-46, doi:10.1016/j.expneurol.2013.10.017.
- Harris, J. J., Attwell, D., 2012. The energetics of CNS white matter. *J Neurosci* 32, 356-71, doi:10.1523/JNEUROSCI.3430-11.2012.
- Harsan, L. A., Steibel, J., Zaremba, A., Agin, A., Sapin, R., Poulet, P., Guignard, B., Parizel, N., Grucker, D., Boehm, N., Miller, R. H., Ghandour, M. S., 2008. Recovery from chronic demyelination by thyroid hormone therapy: myelinogenesis induction and assessment by diffusion tensor magnetic resonance imaging. *J Neurosci* 28, 14189-201, doi:10.1523/JNEUROSCI.4453-08.2008.
- Hartline, D. K., Colman, D. R., 2007. Rapid conduction and the evolution of giant axons and myelinated fibers. *Curr Biol* 17, R29-35, doi:10.1016/j.cub.2006.11.042.
- Hartman, N. W., Carpentino, J. E., LaMonica, K., Mor, D. E., Naegele, J. R., Grabel, L., 2010. CXCL12-mediated guidance of migrating embryonic stem cell-derived neural progenitors transplanted into the hippocampus. *PLoS One* 5, e15856, doi:10.1371/journal.pone.0015856.
- Harwell, C. C., Parker, P. R., Gee, S. M., Okada, A., McConnell, S. K., Kreitzer, A. C., Kriegstein, A. R., 2012. Sonic hedgehog expression in corticofugal projection neurons directs cortical microcircuit formation. *Neuron* 73, 1116-26, doi:10.1016/j.neuron.2012.02.009.
- He, M., Subramanian, R., Bangs, F., Omelchenko, T., Liem, K. F., Jr., Kapoor, T. M., Anderson, K. V., 2014. The kinesin-4 protein Kif7 regulates mammalian Hedgehog signalling by organizing the cilium tip compartment. *Nat Cell Biol* 16, 663-72, doi:10.1038/ncb2988.
- He, Y., Sandoval, J., Casaccia-Bonofil, P., 2007. Events at the transition between cell cycle exit and oligodendrocyte progenitor differentiation: the role of HDAC and YY1. *Neuron Glia Biol* 3, 221-31, doi:10.1017/S1740925X08000057.
- Herculano-Houzel, S., 2014. The glia/neuron ratio: how it varies uniformly across brain structures and species and what that means for brain physiology and evolution. *Glia* 62, 1377-91, doi:10.1002/glia.22683.
- Hildebrand, C., Remahl, S., Persson, H., Bjartmar, C., 1993. Myelinated nerve fibres in the CNS. *Prog Neurobiol* 40, 319-84.
- Hirano, A., 1989. Review of the morphological aspects of remyelination. *Dev Neurosci* 11, 112-7.
- Hong, M., Krauss, R. S., 2012. Cdon mutation and fetal ethanol exposure synergize to produce midline signaling defects and holoprosencephaly spectrum disorders in mice. *PLoS Genet* 8, e1002999, doi:10.1371/journal.pgen.1002999.
- Howng, S. Y., Avila, R. L., Emery, B., Traka, M., Lin, W., Watkins, T., Cook, S., Bronson, R., Davisson, M., Barres, B. A., Popko, B., 2010. ZFP191 is required by oligodendrocytes for CNS myelination. *Genes Dev* 24, 301-11, doi:10.1101/gad.1864510.

- Hoyos, H. C., Marder, M., Ulrich, R., Gudi, V., Stangel, M., Rabinovich, G. A., Pasquini, L. A., Pasquini, J. M., 2016. The Role of Galectin-3: From Oligodendroglial Differentiation and Myelination to Demyelination and Remyelination Processes in a Cuprizone-Induced Demyelination Model. *Adv Exp Med Biol* 949, 311-332, doi:10.1007/978-3-319-40764-7_15.
- Hu, X., Hicks, C. W., He, W., Wong, P., Macklin, W. B., Trapp, B. D., Yan, R., 2006. Bace1 modulates myelination in the central and peripheral nervous system. *Nat Neurosci* 9, 1520-5, doi:10.1038/nn1797.
- 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., Chambon, P., Ffrench-Constant, C., Franklin, R. J., 2011. Retinoid X receptor gamma signaling accelerates CNS remyelination. *Nat Neurosci* 14, 45-53, doi:10.1038/nn.2702.
- Huang, S., Zhang, Z., Zhang, C., Lv, X., Zheng, X., Chen, Z., Sun, L., Wang, H., Zhu, Y., Zhang, J., Yang, S., Lu, Y., Sun, Q., Tao, Y., Liu, F., Zhao, Y., Chen, D., 2013. Activation of Smurf E3 ligase promoted by smoothed regulates hedgehog signaling through targeting patched turnover. *PLoS Biol* 11, e1001721, doi:10.1371/journal.pbio.1001721.
- Huang, S. Y., Yang, J. Y., 2015. Targeting the Hedgehog Pathway in Pediatric Medulloblastoma. *Cancers (Basel)* 7, 2110-23, doi:10.3390/cancers7040880.
- Hughes, E. G., Appel, B., 2016. The cell biology of CNS myelination. *Curr Opin Neurobiol* 39, 93-100, doi:10.1016/j.conb.2016.04.013.
- Hughes, E. G., Kang, S. H., Fukaya, M., Bergles, D. E., 2013. Oligodendrocyte progenitors balance growth with self-repulsion to achieve homeostasis in the adult brain. *Nat Neurosci* 16, 668-76, doi:10.1038/nn.3390.
- Hussain, R., El-Etr, M., Gaci, O., Rakotomamonjy, J., Macklin, W. B., Kumar, N., Sitruk-Ware, R., Schumacher, M., Ghomari, A. M., 2011. Progesterone and Nestorone facilitate axon remyelination: a role for progesterone receptors. *Endocrinology* 152, 3820-31, doi:10.1210/en.2011-1219.
- Hussain, R., Ghomari, A. M., Bielecki, B., Steibel, J., Boehm, N., Liere, P., Macklin, W. B., Kumar, N., Habert, R., Mhaouty-Kodja, S., Tronche, F., Sitruk-Ware, R., Schumacher, M., Ghandour, M. S., 2013. The neural androgen receptor: a therapeutic target for myelin repair in chronic demyelination. *Brain* 136, 132-46, doi:10.1093/brain/aws284.
- Ihrie, R. A., Shah, J. K., Harwell, C. C., Levine, J. H., Guinto, C. D., Lezameta, M., Kriegstein, A. R., Alvarez-Buylla, A., 2011. Persistent sonic hedgehog signaling in adult brain determines neural stem cell positional identity. *Neuron* 71, 250-62, doi:10.1016/j.neuron.2011.05.018.
- Incardona, J. P., Gruenberg, J., Roelink, H., 2002. Sonic hedgehog induces the segregation of patched and smoothed in endosomes. *Curr Biol* 12, 983-95.
- Ingham, P. W., Nystedt, S., Nakano, Y., Brown, W., Stark, D., van den Heuvel, M., Taylor, A. M., 2000. Patched represses the Hedgehog signalling pathway by promoting modification of the Smoothed protein. *Curr Biol* 10, 1315-8.
- Irizar, H., Munoz-Culla, M., Sepulveda, L., Saenz-Cuesta, M., Prada, A., Castillo-Trivino, T., Zamora-Lopez, G., Lopez de Munain, A., Olascoaga, J., Otaegui, D., 2014. Transcriptomic profile reveals gender-specific molecular mechanisms driving multiple sclerosis progression. *PLoS One* 9, e90482, doi:10.1371/journal.pone.0090482.
- Ishii, A., Fyffe-Maricich, S. L., Furusho, M., Miller, R. H., Bansal, R., 2012. ERK1/ERK2 MAPK signaling is required to increase myelin thickness independent of oligodendrocyte differentiation and initiation of myelination. *J Neurosci* 32, 8855-64, doi:10.1523/JNEUROSCI.0137-12.2012.
- Izzi, L., Levesque, M., Morin, S., Laniel, D., Wilkes, B. C., Mille, F., Krauss, R. S., McMahon, A. P., Allen, B. L., Charron, F., 2011. Boc and Gas1 each form distinct Shh receptor complexes with Ptch1 and are

- required for Shh-mediated cell proliferation. *Dev Cell* 20, 788-801, doi:10.1016/j.devcel.2011.04.017.
- Jablonska, B., Aguirre, A., Raymond, M., Szabo, G., Kitabatake, Y., Sailor, K. A., Ming, G. L., Song, H., Gallo, V., 2010. Chordin-induced lineage plasticity of adult SVZ neuroblasts after demyelination. *Nat Neurosci* 13, 541-50, doi:10.1038/nn.2536.
- Jack, C., Ruffini, F., Bar-Or, A., Antel, J. P., 2005. Microglia and multiple sclerosis. *J Neurosci Res* 81, 363-73, doi:10.1002/jnr.20482.
- Jahn, O., Tenzer, S., Werner, H. B., 2009. Myelin proteomics: molecular anatomy of an insulating sheath. *Mol Neurobiol* 40, 55-72, doi:10.1007/s12035-009-8071-2.
- Jakobs, P., Schulz, P., Ortman, C., Schurmann, S., Exner, S., Rebollido-Rios, R., Dreier, R., Seidler, D. G., Grobe, K., 2016. Bridging the gap: heparan sulfate and Scube2 assemble Sonic hedgehog release complexes at the surface of producing cells. *Sci Rep* 6, 26435, doi:10.1038/srep26435.
- Jakobs, P., Exner, S., Schurmann, S., Pickhinke, U., Bandari, S., Ortman, C., Kupich, S., Schulz, P., Hansen, U., Seidler, D. G., Grobe, K., 2014. Scube2 enhances proteolytic Shh processing from the surface of Shh-producing cells. *J Cell Sci* 127, 1726-37, doi:10.1242/jcs.137695.
- Jakovcevski, I., Filipovic, R., Mo, Z., Rakic, S., Zecevic, N., 2009. Oligodendrocyte development and the onset of myelination in the human fetal brain. *Front Neuroanat* 3, 5, doi:10.3389/neuro.05.005.2009.
- Jarjour, A. A., Boyd, A., Dow, L. E., Holloway, R. K., Goebels, S., Humbert, P. O., Williams, A., French-Constant, C., 2015. The polarity protein Scribble regulates myelination and remyelination in the central nervous system. *PLoS Biol* 13, e1002107, doi:10.1371/journal.pbio.1002107.
- Jean, I., Lavielle, C., Bartheleix-Pouplard, A., Fressinaud, C., 2003. Neurotrophin-3 specifically increases mature oligodendrocyte population and enhances remyelination after chemical demyelination of adult rat CNS. *Brain Res* 972, 110-8.
- Jeffery, N. D., Blakemore, W. F., 1995. Remyelination of mouse spinal cord axons demyelinated by local injection of lysolecithin. *J Neurocytol* 24, 775-81.
- Jeffries, M. A., Urbanek, K., Torres, L., Wendell, S. G., Rubio, M. E., Fyffe-Maricich, S. L., 2016. ERK1/2 Activation in Preexisting Oligodendrocytes of Adult Mice Drives New Myelin Synthesis and Enhanced CNS Function. *J Neurosci* 36, 9186-200, doi:10.1523/JNEUROSCI.1444-16.2016.
- Jeong, J., McMahon, A. P., 2005. Growth and pattern of the mammalian neural tube are governed by partially overlapping feedback activities of the hedgehog antagonists patched 1 and Hhip1. *Development* 132, 143-54, doi:10.1242/dev.01566.
- Jia, J., Tong, C., Wang, B., Luo, L., Jiang, J., 2004. Hedgehog signalling activity of Smoothed requires phosphorylation by protein kinase A and casein kinase I. *Nature* 432, 1045-50, doi:10.1038/nature03179.
- Jiang, X., Yang, P., Ma, L., 2009. Kinase activity-independent regulation of cyclin pathway by GRK2 is essential for zebrafish early development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 10183-8, doi:10.1073/pnas.0812105106.
- Jiao, J., Chen, D. F., 2008. Induction of neurogenesis in nonconventional neurogenic regions of the adult central nervous system by niche astrocyte-produced signals. *Stem Cells* 26, 1221-30, doi:10.1634/stemcells.2007-0513.
- Kang, J. S., Mulieri, P. J., Miller, C., Sassoon, D. A., Krauss, R. S., 1998. CDO, a robo-related cell surface protein that mediates myogenic differentiation. *J Cell Biol* 143, 403-13.
- Kang, J. S., Mulieri, P. J., Hu, Y., Taliana, L., Krauss, R. S., 2002. BOC, an Ig superfamily member, associates with CDO to positively regulate myogenic differentiation. *Embo J* 21, 114-24.
- Kang, J. S., Gao, M., Feinleib, J. L., Cotter, P. D., Guadagno, S. N., Krauss, R. S., 1997. CDO: an oncogene-, serum-, and anchorage-regulated member of the Ig/fibronectin type III repeat family. *J Cell Biol* 138, 203-13.

- Kappos, L., Radue, E. W., O'Connor, P., Polman, C., Hohlfeld, R., Calabresi, P., Selmaj, K., Agoropoulou, C., Leyk, M., Zhang-Auberson, L., Burtin, P., Group, F. S., 2010. A placebo-controlled trial of oral fingolimod in relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 362, 387-401, doi:10.1056/NEJMoa0909494.
- Karadottir, R., Hamilton, N. B., Bakiri, Y., Attwell, D., 2008. Spiking and nonspiking classes of oligodendrocyte precursor glia in CNS white matter. *Nat Neurosci* 11, 450-6, doi:10.1038/nn2060.
- Kavran, J. M., Ward, M. D., Oladosu, O. O., Mulepati, S., Leahy, D. J., 2010. All mammalian Hedgehog proteins interact with cell adhesion molecule, down-regulated by oncogenes (CDO) and brother of CDO (BOC) in a conserved manner. *J Biol Chem* 285, 24584-90, doi:10.1074/jbc.M110.131680.
- Kennedy, T. E., Serafini, T., de la Torre, J. R., Tessier-Lavigne, M., 1994. Netrins are diffusible chemotropic factors for commissural axons in the embryonic spinal cord. *Cell* 78, 425-35.
- Kenney, A. M., Rowitch, D. H., 2000. Sonic hedgehog promotes G(1) cyclin expression and sustained cell cycle progression in mammalian neuronal precursors. *Mol Cell Biol* 20, 9055-67.
- Kessaris, N., Fogarty, M., Iannarelli, P., Grist, M., Wegner, M., Richardson, W. D., 2006. Competing waves of oligodendrocytes in the forebrain and postnatal elimination of an embryonic lineage. *Nat Neurosci* 9, 173-9, doi:10.1038/nn1620.
- Khaliullina, H., Bilgin, M., Sampaio, J. L., Shevchenko, A., Eaton, S., 2015. Endocannabinoids are conserved inhibitors of the Hedgehog pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, 3415-20, doi:10.1073/pnas.1416463112.
- Kim, H. J., DiBernardo, A. B., Sloane, J. A., Rasband, M. N., Solomon, D., Kosaras, B., Kwak, S. P., Vartanian, T. K., 2006. WAVE1 is required for oligodendrocyte morphogenesis and normal CNS myelination. *J Neurosci* 26, 5849-59, doi:10.1523/JNEUROSCI.4921-05.2006.
- Kotter, M. R., Zhao, C., van Rooijen, N., Franklin, R. J., 2005. Macrophage-depletion induced impairment of experimental CNS remyelination is associated with a reduced oligodendrocyte progenitor cell response and altered growth factor expression. *Neurobiol Dis* 18, 166-75, doi:10.1016/j.nbd.2004.09.019.
- Kovacs, J. J., Whalen, E. J., Liu, R., Xiao, K., Kim, J., Chen, M., Wang, J., Chen, W., Lefkowitz, R. J., 2008. Beta-arrestin-mediated localization of smoothed to the primary cilium. *Science* 320, 1777-81, doi:10.1126/science.1157983.
- Krauss, S., Concordet, J. P., Ingham, P. W., 1993. A functionally conserved homolog of the Drosophila segment polarity gene hh is expressed in tissues with polarizing activity in zebrafish embryos. *Cell* 75, 1431-44.
- Kucharova, K., Stallcup, W. B., 2015. NG2-proteoglycan-dependent contributions of oligodendrocyte progenitors and myeloid cells to myelin damage and repair. *J Neuroinflammation* 12, 161, doi:10.1186/s12974-015-0385-6.
- Kuhlmann, T., Miron, V., Cui, Q., Wegner, C., Antel, J., Bruck, W., 2008. Differentiation block of oligodendroglial progenitor cells as a cause for remyelination failure in chronic multiple sclerosis. *Brain* 131, 1749-58, doi:10.1093/brain/awn096.
- Kukley, M., Capetillo-Zarate, E., Dietrich, D., 2007. Vesicular glutamate release from axons in white matter. *Nat Neurosci* 10, 311-20, doi:10.1038/nn1850.
- Lai, K., Kaspar, B. K., Gage, F. H., Schaffer, D. V., 2003. Sonic hedgehog regulates adult neural progenitor proliferation in vitro and in vivo. *Nat Neurosci* 6, 21-7, doi:10.1038/nn983.
- Lassmann, H., 2014. Mechanisms of white matter damage in multiple sclerosis. *Glia* 62, 1816-30, doi:10.1002/glia.22597.
- Lawson-Yuen, A., Berend, S. A., Soul, J. S., Irons, M., 2006. Patient with novel interstitial deletion of chromosome 3q13.1q13.3 and agenesis of the corpus callosum. *Clin Dysmorphol* 15, 217-20, doi:10.1097/01.mcd.0000220609.17284.a9.

- Lee, H. J., Jo, S. B., Romer, A. I., Lim, H. J., Kim, M. J., Koo, S. H., Krauss, R. S., Kang, J. S., 2015. Overweight in mice and enhanced adipogenesis in vitro are associated with lack of the hedgehog coreceptor boc. *Diabetes* 64, 2092-103, doi:10.2337/db14-1017.
- Lee, X., Yang, Z., Shao, Z., Rosenberg, S. S., Levesque, M., Pepinsky, R. B., Qiu, M., Miller, R. H., Chan, J. R., Mi, S., 2007. NGF regulates the expression of axonal LINGO-1 to inhibit oligodendrocyte differentiation and myelination. *J Neurosci* 27, 220-5, doi:10.1523/JNEUROSCI.4175-06.2007.
- Lelievre, V., Ghiani, C. A., Seksenyan, A., Gressens, P., de Vellis, J., Waschek, J. A., 2006. Growth factor-dependent actions of PACAP on oligodendrocyte progenitor proliferation. *Regul Pept* 137, 58-66, doi:10.1016/j.regpep.2006.04.024.
- Leray, E., Morrissey, S., Yaouanq, J., Coustans, M., Le Page, E., Chaperon, J., Edan, G., 2007. Long-term survival of patients with multiple sclerosis in West France. *Mult Scler* 13, 865-74, doi:10.1177/1352458507077410.
- Levine, J. M., Reynolds, R., 1999. Activation and proliferation of endogenous oligodendrocyte precursor cells during ethidium bromide-induced demyelination. *Exp Neurol* 160, 333-47, doi:10.1006/exnr.1999.7224.
- Li, H., Richardson, W. D., 2016. Evolution of the CNS myelin gene regulatory program. *Brain Res* 1641, 111-21, doi:10.1016/j.brainres.2015.10.013.
- Li, S., Li, S., Han, Y., Tong, C., Wang, B., Chen, Y., Jiang, J., 2016. Regulation of Smoothed Phosphorylation and High-Level Hedgehog Signaling Activity by a Plasma Membrane Associated Kinase. *PLoS Biol* 14, e1002481, doi:10.1371/journal.pbio.1002481.
- Li, X. J., Zhang, X., Johnson, M. A., Wang, Z. B., Lavaute, T., Zhang, S. C., 2009. Coordination of sonic hedgehog and Wnt signaling determines ventral and dorsal telencephalic neuron types from human embryonic stem cells. *Development* 136, 4055-63, doi:10.1242/dev.036624.
- 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, 217-24, doi:10.1016/j.expneurol.2006.05.032.
- Liu, J., Tian, D., Murugan, M., Eyo, U. B., Dreyfus, C. F., Wang, W., Wu, L. J., 2015. Microglial Hv1 proton channel promotes cuprizone-induced demyelination through oxidative damage. *J Neurochem* 135, 347-56, doi:10.1111/jnc.13242.
- Louapre, C., Maillart, E., Papeix, C., Lubetzki, C., 2013. [New and emerging treatments for multiple sclerosis]. *Med Sci (Paris)* 29, 1105-10, doi:10.1051/medsci/20132912013.
- Loulier, K., Ruat, M., Traiffort, E., 2005. Analysis of hedgehog interacting protein in the brain and its expression in nitric oxide synthase-positive cells. *Neuroreport* 16, 1959-62.
- Loulier, K., Ruat, M., Traiffort, E., 2006. Increase of proliferating oligodendroglial progenitors in the adult mouse brain upon Sonic hedgehog delivery in the lateral ventricle. *J Neurochem* 98, 530-42, doi:10.1111/j.1471-4159.2006.03896.x.
- Lu, Q. R., Sun, T., Zhu, Z., Ma, N., Garcia, M., Stiles, C. D., Rowitch, D. H., 2002. Common developmental requirement for Olig function indicates a motor neuron/oligodendrocyte connection. *Cell* 109, 75-86.
- Lu, Q. R., Yuk, D., Alberta, J. A., Zhu, Z., Pawlitzky, I., Chan, J., McMahon, A. P., Stiles, C. D., Rowitch, D. H., 2000. Sonic hedgehog--regulated oligodendrocyte lineage genes encoding bHLH proteins in the mammalian central nervous system. *Neuron* 25, 317-29.
- Ludwin, S. K., Maitland, M., 1984. Long-term remyelination fails to reconstitute normal thickness of central myelin sheaths. *J Neurol Sci* 64, 193-8.
- Lum, L., Yao, S., Mozer, B., Rovescalli, A., Von Kessler, D., Nirenberg, M., Beachy, P. A., 2003. Identification of Hedgehog pathway components by RNAi in *Drosophila* cultured cells. *Science* 299, 2039-45.
- Lunn, K. F., Baas, P. W., Duncan, I. D., 1997. Microtubule organization and stability in the oligodendrocyte. *J Neurosci* 17, 4921-32.

- Luskin, M. B., Parnavelas, J. G., Barfield, J. A., 1993. Neurons, astrocytes, and oligodendrocytes of the rat cerebral cortex originate from separate progenitor cells: an ultrastructural analysis of clonally related cells. *J Neurosci* 13, 1730-50.
- Machold, R., Hayashi, S., Rutlin, M., Muzumdar, M. D., Nery, S., Corbin, J. G., Gritli-Linde, A., Dellovade, T., Porter, J. A., Rubin, L. L., Dudek, H., McMahon, A. P., Fishell, G., 2003. Sonic hedgehog is required for progenitor cell maintenance in telencephalic stem cell niches. *Neuron* 39, 937-50.
- Magalon, K., Cantarella, C., Monti, G., Cayre, M., Durbec, P., 2007. Enriched environment promotes adult neural progenitor cell mobilization in mouse demyelination models. *Eur J Neurosci* 25, 761-71, doi:10.1111/j.1460-9568.2007.05335.x.
- Maier, D., Cheng, S., Faubert, D., Hipfner, D. R., 2014. A broadly conserved g-protein-coupled receptor kinase phosphorylation mechanism controls *Drosophila* smoothed activity. *PLoS Genet* 10, e1004399, doi:10.1371/journal.pgen.1004399.
- Maire, C. L., Wegener, A., Kerninon, C., Nait Oumesmar, B., 2010. Gain-of-function of Olig transcription factors enhances oligodendrogenesis and myelination. *Stem Cells* 28, 1611-22, doi:10.1002/stem.480.
- Mantovani, A., Biswas, S. K., Galdiero, M. R., Sica, A., Locati, M., 2013. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *J Pathol* 229, 176-85, doi:10.1002/path.4133.
- Marigo, V., Davey, R. A., Zuo, Y., Cunningham, J. M., Tabin, C. J., 1996. Biochemical evidence that patched is the Hedgehog receptor. *Nature* 384, 176-9, doi:10.1038/384176a0.
- Marigo, V., Roberts, D. J., Lee, S. M., Tsukurov, O., Levi, T., Gastier, J. M., Epstein, D. J., Gilbert, D. J., Copeland, N. G., Seidman, C. E., et al., 1995. Cloning, expression, and chromosomal location of SHH and IHH: two human homologues of the *Drosophila* segment polarity gene hedgehog. *Genomics* 28, 44-51.
- Marques, S., Zeisel, A., Codeluppi, S., van Bruggen, D., Mendanha Falcao, A., Xiao, L., Li, H., Haring, M., Hochgerner, H., Romanov, R. A., Gyllborg, D., Munoz-Manchado, A. B., La Manno, G., Lonnerberg, P., Floriddia, E. M., Rezayee, F., Ernfors, P., Arenas, E., Hjerling-Leffler, J., Harkany, T., Richardson, W. D., Linnarsson, S., Castelo-Branco, G., 2016. Oligodendrocyte heterogeneity in the mouse juvenile and adult central nervous system. *Science* 352, 1326-9, doi:10.1126/science.aaf6463.
- Marriott, M. P., Emery, B., Cate, H. S., Binder, M. D., Kemper, D., Wu, Q., Kolbe, S., Gordon, I. R., Wang, H., Egan, G., Murray, S., Butzkueven, H., Kilpatrick, T. J., 2008. Leukemia inhibitory factor signaling modulates both central nervous system demyelination and myelin repair. *Glia* 56, 686-98, doi:10.1002/glia.20646.
- Masdeu, C., Bernard, V., Faure, H., Traiffort, E., Ruat, M., 2007. Distribution of Smoothed at hippocampal mossy fiber synapses. *Neuroreport* 18, 395-9, doi:10.1097/WNR.0b013e32801421ce.
- Mason, J. L., Suzuki, K., Chaplin, D. D., Matsushima, G. K., 2001a. Interleukin-1beta promotes repair of the CNS. *J Neurosci* 21, 7046-52.
- Mason, J. L., Ye, P., Suzuki, K., D'Ercole, A. J., Matsushima, G. K., 2000. Insulin-like growth factor-1 inhibits mature oligodendrocyte apoptosis during primary demyelination. *J Neurosci* 20, 5703-8.
- Mason, J. L., Langaman, C., Morell, P., Suzuki, K., Matsushima, G. K., 2001b. Episodic demyelination and subsequent remyelination within the murine central nervous system: changes in axonal calibre. *Neuropathol Appl Neurobiol* 27, 50-8.
- Mason, J. L., Xuan, S., Dragatsis, I., Efstratiadis, A., Goldman, J. E., 2003. Insulin-like growth factor (IGF) signaling through type 1 IGF receptor plays an important role in remyelination. *J Neurosci* 23, 7710-8.
- Mastronardi, F. G., daCruz, L. A., Wang, H., Boggs, J., Moscarello, M. A., 2003. The amount of sonic hedgehog in multiple sclerosis white matter is decreased and cleavage to the signaling peptide is deficient. *Mult Scler* 9, 362-71.

- Mastronardi, F. G., Min, W., Wang, H., Winer, S., Dosch, M., Boggs, J. M., Moscarello, M. A., 2004. Attenuation of experimental autoimmune encephalomyelitis and nonimmune demyelination by IFN-beta plus vitamin B12: treatment to modify notch-1/sonic hedgehog balance. *J Immunol* 172, 6418-26.
- Matsushima, G. K., Morell, P., 2001. The neurotoxicant, cuprizone, as a model to study demyelination and remyelination in the central nervous system. *Brain Pathol* 11, 107-16.
- Maxfield, F. R., van Meer, G., 2010. Cholesterol, the central lipid of mammalian cells. *Curr Opin Cell Biol* 22, 422-9, doi:10.1016/j.ceb.2010.05.004.
- McKenzie, I. A., Ohayon, D., Li, H., de Faria, J. P., Emery, B., Tohyama, K., Richardson, W. D., 2014. Motor skill learning requires active central myelination. *Science* 346, 318-22, doi:10.1126/science.1254960.
- McLellan, J. S., Zheng, X., Hauk, G., Ghirlando, R., Beachy, P. A., Leahy, D. J., 2008. The mode of Hedgehog binding to Ihog homologues is not conserved across different phyla. *Nature* 455, 979-83, doi:10.1038/nature07358.
- McTigue, D. M., Tripathi, R. B., 2008. The life, death, and replacement of oligodendrocytes in the adult CNS. *J Neurochem* 107, 1-19, doi:10.1111/j.1471-4159.2008.05570.x.
- Mecklenburg, N., Garcia-Lopez, R., Puellas, E., Sotelo, C., Martinez, S., 2011. Cerebellar oligodendroglial cells have a mesencephalic origin. *Glia* 59, 1946-57, doi:10.1002/glia.21236.
- Menz, G. L., Miller, D. J., Ralston, G. B., 1995. Interactions of myelin basic protein with palmitoyllysophosphatidylcholine: characterization of the complexes and conformations of the protein. *Eur Biophys J* 24, 39-53.
- Menn, B., Garcia-Verdugo, J. M., Yaschine, C., Gonzalez-Perez, O., Rowitch, D., Alvarez-Buylla, A., 2006. Origin of oligodendrocytes in the subventricular zone of the adult brain. *J Neurosci* 26, 7907-18, doi:10.1523/JNEUROSCI.1299-06.2006.
- Merchan, P., Bribian, A., Sanchez-Camacho, C., Lezameta, M., Bovolenta, P., de Castro, F., 2007. Sonic hedgehog promotes the migration and proliferation of optic nerve oligodendrocyte precursors. *Mol Cell Neurosci* 36, 355-68, doi:10.1016/j.mcn.2007.07.012.
- Merkle, F. T., Mirzadeh, Z., Alvarez-Buylla, A., 2007. Mosaic organization of neural stem cells in the adult brain. *Science* 317, 381-4, doi:10.1126/science.1144914.
- Merrill, J. E., 2009. In vitro and in vivo pharmacological models to assess demyelination and remyelination. *Neuropsychopharmacology* 34, 55-73, doi:10.1038/npp.2008.145.
- Messersmith, D. J., Murtie, J. C., Le, T. Q., Frost, E. E., Armstrong, R. C., 2000. Fibroblast growth factor 2 (FGF2) and FGF receptor expression in an experimental demyelinating disease with extensive remyelination. *J Neurosci Res* 62, 241-56, doi:10.1002/1097-4547(20001015)62:2<241::AID-JNR9>3.0.CO;2-D.
- Mi, S., Sandrock, A., Miller, R. H., 2008. LINGO-1 and its role in CNS repair. *Int J Biochem Cell Biol* 40, 1971-8, doi:10.1016/j.biocel.2008.03.018.
- Mi, S., Hu, B., Hahm, K., Luo, Y., Kam Hui, E. S., Yuan, Q., Wong, W. M., Wang, L., Su, H., Chu, T. H., Guo, J., Zhang, W., So, K. F., Pepinsky, B., Shao, Z., Graff, C., Garber, E., Jung, V., Wu, E. X., Wu, W., 2007. LINGO-1 antagonist promotes spinal cord remyelination and axonal integrity in MOG-induced experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nat Med* 13, 1228-33, doi:10.1038/nm1664.
- Mi, S., Miller, R. H., Tang, W., Lee, X., Hu, B., Wu, W., Zhang, Y., Shields, C. B., Zhang, Y., Miklasz, S., Shea, D., Mason, J., Franklin, R. J., Ji, B., Shao, Z., Chedotal, A., Bernard, F., Roulois, A., Xu, J., Jung, V., Pepinsky, B., 2009. Promotion of central nervous system remyelination by induced differentiation of oligodendrocyte precursor cells. *Ann Neurol* 65, 304-15, doi:10.1002/ana.21581.
- Mikita, J., Dubourdiu-Cassagno, N., Deloire, M. S., Vekris, A., Biran, M., Raffard, G., Brochet, B., Cannon, M. H., Franconi, J. M., Boiziau, C., Petry, K. G., 2011. Altered M1/M2 activation patterns of

- monocytes in severe relapsing experimental rat model of multiple sclerosis. Amelioration of clinical status by M2 activated monocyte administration. *Mult Scler* 17, 2-15, doi:10.1177/1352458510379243.
- Mille, F., Thibert, C., Fombonne, J., Rama, N., Guix, C., Hayashi, H., Corset, V., Reed, J. C., Mehlen, P., 2009. The Patched dependence receptor triggers apoptosis through a DRAL-caspase-9 complex. *Nat Cell Biol* 11, 739-46, doi:10.1038/ncb1880.
- Mille, F., Tamayo-Orrego, L., Levesque, M., Remke, M., Korshunov, A., Cardin, J., Bouchard, N., Izzi, L., Kool, M., Northcott, P. A., Taylor, M. D., Pfister, S. M., Charron, F., 2014. The Shh receptor Boc promotes progression of early medulloblastoma to advanced tumors. *Dev Cell* 31, 34-47, doi:10.1016/j.devcel.2014.08.010.
- Miller, D. H., Weinshenker, B. G., Filippi, M., Banwell, B. L., Cohen, J. A., Freedman, M. S., Galetta, S. L., Hutchinson, M., Johnson, R. T., Kappos, L., Kira, J., Lublin, F. D., McFarland, H. F., Montalban, X., Panitch, H., Richert, J. R., Reingold, S. C., Polman, C. H., 2008. Differential diagnosis of suspected multiple sclerosis: a consensus approach. *Mult Scler* 14, 1157-74, doi:10.1177/1352458508096878.
- Miller, R. H., Mi, S., 2007. Dissecting demyelination. *Nat Neurosci* 10, 1351-4, doi:10.1038/nn1995.
- Milner, R., Anderson, H. J., Rippon, R. F., McKay, J. S., Franklin, R. J., Marchionni, M. A., Reynolds, R., Ffrench-Constant, C., 1997. Contrasting effects of mitogenic growth factors on oligodendrocyte precursor cell migration. *Glia* 19, 85-90.
- Ming, X., Chew, L. J., Gallo, V., 2013. Transgenic overexpression of Sox17 promotes oligodendrocyte development and attenuates demyelination. *J Neurosci* 33, 12528-42, doi:10.1523/JNEUROSCI.0536-13.2013.
- Miron, V. E., Ludwin, S. K., Darlington, P. J., Jarjour, A. A., Soliven, B., Kennedy, T. E., Antel, J. P., 2010. Fingolimod (FTY720) enhances remyelination following demyelination of organotypic cerebellar slices. *Am J Pathol* 176, 2682-94, doi:10.2353/ajpath.2010.091234.
- Miron, V. E., Boyd, A., Zhao, J. W., Yuen, T. J., Ruckh, J. M., Shadrach, J. L., van Wijngaarden, P., Wagers, A. J., Williams, A., Franklin, R. J., Ffrench-Constant, C., 2013. M2 microglia and macrophages drive oligodendrocyte differentiation during CNS remyelination. *Nat Neurosci* 16, 1211-8, doi:10.1038/nn.3469.
- Mirzadeh, Z., Merkle, F. T., Soriano-Navarro, M., Garcia-Verdugo, J. M., Alvarez-Buylla, A., 2008. Neural stem cells confer unique pinwheel architecture to the ventricular surface in neurogenic regions of the adult brain. *Cell Stem Cell* 3, 265-78, doi:10.1016/j.stem.2008.07.004.
- Mix, E., Meyer-Rienecker, H., Zettl, U. K., 2008. Animal models of multiple sclerosis for the development and validation of novel therapies - potential and limitations. *J Neurol* 255 Suppl 6, 7-14, doi:10.1007/s00415-008-6003-0.
- Mo, Z., Zecevic, N., 2009. Human fetal radial glia cells generate oligodendrocytes in vitro. *Glia* 57, 490-8, doi:10.1002/glia.20775.
- Monteiro de Castro, G., Deja, N. A., Ma, D., Zhao, C., Franklin, R. J., 2015. Astrocyte Activation via Stat3 Signaling Determines the Balance of Oligodendrocyte versus Schwann Cell Remyelination. *Am J Pathol* 185, 2431-40, doi:10.1016/j.ajpath.2015.05.011.
- Mukhopadhyay, S., Wen, X., Ratti, N., Loktev, A., Rangell, L., Scales, S. J., Jackson, P. K., 2013. The ciliary G-protein-coupled receptor Gpr161 negatively regulates the Sonic hedgehog pathway via cAMP signaling. *Cell* 152, 210-23, doi:10.1016/j.cell.2012.12.026.
- Mulieri, P. J., Kang, J. S., Sasso, D. A., Krauss, R. S., 2002. Expression of the boc gene during murine embryogenesis. *Dev Dyn* 223, 379-88, doi:10.1002/dvdy.10063.
- Mulieri, P. J., Okada, A., Sasso, D. A., McConnell, S. K., Krauss, R. S., 2000. Developmental expression pattern of the cdo gene. *Dev Dyn* 219, 40-9, doi:10.1002/1097-0177(2000)9999:9999::AID-DVDY1032>3.0.CO;2-M.

- Muller, C., Bauer, N. M., Schafer, I., White, R., 2013. Making myelin basic protein -from mRNA transport to localized translation. *Front Cell Neurosci* 7, 169, doi:10.3389/fncel.2013.00169.
- Murtie, J. C., Zhou, Y. X., Le, T. Q., Vana, A. C., Armstrong, R. C., 2005. PDGF and FGF2 pathways regulate distinct oligodendrocyte lineage responses in experimental demyelination with spontaneous remyelination. *Neurobiol Dis* 19, 171-82, doi:10.1016/j.nbd.2004.12.006.
- Nachtergaele, S., Whalen, D. M., Mydock, L. K., Zhao, Z., Malinauskas, T., Krishnan, K., Ingham, P. W., Covey, D. F., Siebold, C., Rohatgi, R., 2013. Structure and function of the Smoothed extracellular domain in vertebrate Hedgehog signaling. *Elife* 2, e01340, doi:10.7554/eLife.01340.
- Nait-Oumesmar, B., Picard-Riera, N., Kerninon, C., Baron-Van Evercooren, A., 2008. The role of SVZ-derived neural precursors in demyelinating diseases: from animal models to multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 265, 26-31, doi:10.1016/j.jns.2007.09.032.
- Nait-Oumesmar, B., Decker, L., Lachapelle, F., Avellana-Adalid, V., Bachelin, C., Baron-Van Evercooren, A., 1999. Progenitor cells of the adult mouse subventricular zone proliferate, migrate and differentiate into oligodendrocytes after demyelination. *Eur J Neurosci* 11, 4357-66.
- Nait-Oumesmar, B., Picard-Riera, N., Kerninon, C., Decker, L., Seilhean, D., Hoglinger, G. U., Hirsch, E. C., Reynolds, R., Baron-Van Evercooren, A., 2007. Activation of the subventricular zone in multiple sclerosis: evidence for early glial progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 4694-9, doi:10.1073/pnas.0606835104.
- Nakatani, H., Martin, E., Hassani, H., Clavairoly, A., Maire, C. L., Viadieu, A., Kerninon, C., Delmasure, A., Frah, M., Weber, M., Nakafuku, M., Zalc, B., Thomas, J. L., Guillemot, F., Nait-Oumesmar, B., Parras, C., 2013. *Ascl1/Mash1* promotes brain oligodendrogenesis during myelination and remyelination. *J Neurosci* 33, 9752-68, doi:10.1523/JNEUROSCI.0805-13.2013.
- Narayanan, S. P., Flores, A. I., Wang, F., Macklin, W. B., 2009. Akt signals through the mammalian target of rapamycin pathway to regulate CNS myelination. *J Neurosci* 29, 6860-70, doi:10.1523/JNEUROSCI.0232-09.2009.
- Naruse, M., Ishizaki, Y., Ikenaka, K., Tanaka, A., Hitoshi, S., 2017. Origin of oligodendrocytes in mammalian forebrains: a revised perspective. *J Physiol Sci* 67, 63-70, doi:10.1007/s12576-016-0479-7.
- Naruse, M., Ishino, Y., Kumar, A., Ono, K., Takebayashi, H., Yamaguchi, M., Ishizaki, Y., Ikenaka, K., Hitoshi, S., 2016. The Dorsoventral Boundary of the Germinal Zone is a Specialized Niche for the Generation of Cortical Oligodendrocytes during a Restricted Temporal Window. *Cereb Cortex* 26, 2800-10, doi:10.1093/cercor/bhv141.
- Nash, B., Ioannidou, K., Barnett, S. C., 2011. Astrocyte phenotypes and their relationship to myelination. *J Anat* 219, 44-52, doi:10.1111/j.1469-7580.2010.01330.x.
- Nave, K. A., Werner, H. B., 2014. Myelination of the nervous system: mechanisms and functions. *Annu Rev Cell Dev Biol* 30, 503-33, doi:10.1146/annurev-cellbio-100913-013101.
- Nave, K. A., Lai, C., Bloom, F. E., Milner, R. J., 1986. Jumpy mutant mouse: a 74-base deletion in the mRNA for myelin proteolipid protein and evidence for a primary defect in RNA splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 9264-8.
- Nawaz, S., Sanchez, P., Schmitt, S., Snaidero, N., Mitkovski, M., Velte, C., Bruckner, B. R., Alexopoulos, I., Czopka, T., Jung, S. Y., Rhee, J. S., Janshoff, A., Witke, W., Schaap, I. A., Lyons, D. A., Simons, M., 2015. Actin filament turnover drives leading edge growth during myelin sheath formation in the central nervous system. *Dev Cell* 34, 139-51, doi:10.1016/j.devcel.2015.05.013.
- Nedelcu, D., Liu, J., Xu, Y., Jao, C., Salic, A., 2013. Oxysterol binding to the extracellular domain of Smoothed in Hedgehog signaling. *Nat Chem Biol* 9, 557-64, doi:10.1038/nchembio.1290.
- Nery, S., Wichterle, H., Fishell, G., 2001. Sonic hedgehog contributes to oligodendrocyte specification in the mammalian forebrain. *Development* 128, 527-40.
- Niehaus, A., Stegmuller, J., Diers-Fenger, M., Trotter, J., 1999. Cell-surface glycoprotein of oligodendrocyte progenitors involved in migration. *J Neurosci* 19, 4948-61.

- Nielsen, J. A., Berndt, J. A., Hudson, L. D., Armstrong, R. C., 2004. Myelin transcription factor 1 (Myt1) modulates the proliferation and differentiation of oligodendrocyte lineage cells. *Mol Cell Neurosci* 25, 111-23, doi:10.1016/j.mcn.2003.10.001.
- Nishiyama, A., Komitova, M., Suzuki, R., Zhu, X., 2009. Polydendrocytes (NG2 cells): multifunctional cells with lineage plasticity. *Nat Rev Neurosci* 10, 9-22, doi:10.1038/nrn2495.
- Nishiyama, A., Lin, X. H., Giese, N., Heldin, C. H., Stallcup, W. B., 1996. Co-localization of NG2 proteoglycan and PDGF alpha-receptor on O2A progenitor cells in the developing rat brain. *J Neurosci Res* 43, 299-314, doi:10.1002/(SICI)1097-4547(19960201)43:3<299::AID-JNR5>3.0.CO;2-E.
- Noble, M., Murray, K., Stroobant, P., Waterfield, M. D., Riddle, P., 1988. Platelet-derived growth factor promotes division and motility and inhibits premature differentiation of the oligodendrocyte/type-2 astrocyte progenitor cell. *Nature* 333, 560-2, doi:10.1038/333560a0.
- Northcott, P. A., Jones, D. T., Kool, M., Robinson, G. W., Gilbertson, R. J., Cho, Y. J., Pomeroy, S. L., Korshunov, A., Lichter, P., Taylor, M. D., Pfister, S. M., 2012. Medulloblastomics: the end of the beginning. *Nat Rev Cancer* 12, 818-34, doi:10.1038/nrc3410.
- Norton, W. T., Poduslo, S. E., 1973. Myelination in rat brain: method of myelin isolation. *J Neurochem* 21, 749-57.
- Nusslein-Volhard, C., Wieschaus, E., 1980. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 287, 795-801.
- Oberheim, N. A., Goldman, S. A., Nedergaard, M., 2012. Heterogeneity of astrocytic form and function. *Methods Mol Biol* 814, 23-45, doi:10.1007/978-1-61779-452-0_3.
- Okada, A., Charron, F., Morin, S., Shin, D. S., Wong, K., Fabre, P. J., Tessier-Lavigne, M., McConnell, S. K., 2006. Boc is a receptor for sonic hedgehog in the guidance of commissural axons. *Nature* 444, 369-73, doi:10.1038/nature05246.
- Oksenberg, J. R., Baranzini, S. E., 2010. Multiple sclerosis genetics--is the glass half full, or half empty? *Nat Rev Neurol* 6, 429-37, doi:10.1038/nrneurol.2010.91.
- Orentas, D. M., Hayes, J. E., Dyer, K. L., Miller, R. H., 1999. Sonic hedgehog signaling is required during the appearance of spinal cord oligodendrocyte precursors. *Development* 126, 2419-29.
- Ortega, F., Gascon, S., Masserdotti, G., Deshpande, A., Simon, C., Fischer, J., Dimou, L., Chichung Lie, D., Schroeder, T., 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, 602-13, doi:10.1038/ncb2736.
- Ortega, M. C., Cases, O., Merchan, P., Kozyraki, R., Clemente, D., de Castro, F., 2012. Megalin mediates the influence of sonic hedgehog on oligodendrocyte precursor cell migration and proliferation during development. *Glia* 60, 851-66, doi:10.1002/glia.22316.
- Orton, S. M., Herrera, B. M., Yee, I. M., Valdar, W., Ramagopalan, S. V., Sadovnick, A. D., Ebers, G. C., Canadian Collaborative Study, G., 2006. Sex ratio of multiple sclerosis in Canada: a longitudinal study. *Lancet Neurol* 5, 932-6, doi:10.1016/S1474-4422(06)70581-6.
- Palm, W., Swierczynska, M. M., Kumari, V., Ehrhart-Bornstein, M., Bornstein, S. R., Eaton, S., 2013. Secretion and signaling activities of lipoprotein-associated hedgehog and non-sterol-modified hedgehog in flies and mammals. *PLoS Biol* 11, e1001505, doi:10.1371/journal.pbio.1001505.
- Palma, V., Lim, D. A., Dahmane, N., Sanchez, P., Brionne, T. C., Herzberg, C. D., Gitton, Y., Carleton, A., Alvarez-Buylla, A., Ruiz i Altaba, A., 2005. Sonic hedgehog controls stem cell behavior in the postnatal and adult brain. *Development* 132, 335-44, doi:10.1242/dev.01567.
- Parchure, A., Vyas, N., Ferguson, C., Parton, R. G., Mayor, S., 2015. Oligomerization and endocytosis of Hedgehog is necessary for its efficient exovesicular secretion. *Mol Biol Cell* 26, 4700-17, doi:10.1091/mbc.E15-09-0671.
- Park, H. C., Mehta, A., Richardson, J. S., Appel, B., 2002. *olig2* is required for zebrafish primary motor neuron and oligodendrocyte development. *Dev Biol* 248, 356-68.

- Pascual, O., Traiffort, E., Baker, D. P., Galdes, A., Ruat, M., Champagnat, J., 2005. Sonic hedgehog signalling in neurons of adult ventrolateral nucleus tractus solitarius. *Eur J Neurosci* 22, 389-96, doi:10.1111/j.1460-9568.2005.04223.x.
- Patel, J. R., McCandless, E. E., Dorsey, D., Klein, R. S., 2010. CXCR4 promotes differentiation of oligodendrocyte progenitors and remyelination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 11062-7, doi:10.1073/pnas.1006301107.
- Patrikios, P., Stadelmann, C., Kutzelnigg, A., Rauschka, H., Schmidbauer, M., Laursen, H., Sorensen, P. S., Bruck, W., Lucchinetti, C., Lassmann, H., 2006. Remyelination is extensive in a subset of multiple sclerosis patients. *Brain* 129, 3165-72, doi:10.1093/brain/awl217.
- Pekny, M., Pekna, M., Messing, A., Steinhauser, C., Lee, J. M., Parpura, V., Hol, E. M., Sofroniew, M. V., Verkhratsky, A., 2016. Astrocytes: a central element in neurological diseases. *Acta Neuropathol* 131, 323-45, doi:10.1007/s00401-015-1513-1.
- Pepinsky, R. B., Walus, L., Shao, Z., Ji, B., Gu, S., Sun, Y., Wen, D., Lee, X., Wang, Q., Garber, E., Mi, S., 2011a. Production of a PEGylated Fab' of the anti-LINGO-1 Li33 antibody and assessment of its biochemical and functional properties in vitro and in a rat model of remyelination. *Bioconjug Chem* 22, 200-10, doi:10.1021/bc1002746.
- Pepinsky, R. B., Shao, Z., Ji, B., Wang, Q., Meng, G., Walus, L., Lee, X., Hu, Y., Graff, C., Garber, E., Meier, W., Mi, S., 2011b. Exposure levels of anti-LINGO-1 Li81 antibody in the central nervous system and dose-efficacy relationships in rat spinal cord remyelination models after systemic administration. *J Pharmacol Exp Ther* 339, 519-29, doi:10.1124/jpet.111.183483.
- Petralia, R. S., Wang, Y. X., Mattson, M. P., Yao, P. J., 2012. Subcellular distribution of patched and smoothed in the cerebellar neurons. *Cerebellum* 11, 972-81, doi:10.1007/s12311-012-0374-6.
- Pfeiffer, S. E., Warrington, A. E., Bansal, R., 1993. The oligodendrocyte and its many cellular processes. *Trends Cell Biol* 3, 191-7.
- Piaton, G., Aigrot, M. S., Williams, A., Moyon, S., Tepavcevic, V., Moutkine, I., Gras, J., Matho, K. S., Schmitt, A., Soellner, H., Huber, A. B., Ravassard, P., Lubetzki, C., 2011. Class 3 semaphorins influence oligodendrocyte precursor recruitment and remyelination in adult central nervous system. *Brain* 134, 1156-67.
- Podbielska, M., Banik, N. L., Kurowska, E., Hogan, E. L., 2013. Myelin recovery in multiple sclerosis: the challenge of remyelination. *Brain Sci* 3, 1282-324, doi:10.3390/brainsci3031282.
- Pohl, H. B., Porcheri, C., Mueggler, T., Bachmann, L. C., Martino, G., Riethmacher, D., Franklin, R. J., Rudin, M., Suter, U., 2011. Genetically induced adult oligodendrocyte cell death is associated with poor myelin clearance, reduced remyelination, and axonal damage. *J Neurosci* 31, 1069-80, doi:10.1523/JNEUROSCI.5035-10.2011.
- Polizio, A. H., Chinchilla, P., Chen, X., Manning, D. R., Riobo, N. A., 2011. Sonic Hedgehog activates the GTPases Rac1 and RhoA in a Gli-independent manner through coupling of smoothed to Gi proteins. *Sci Signal* 4, pt7, doi:10.1126/scisignal.2002396.
- Poncet, C., Soula, C., Trousse, F., Kan, P., Hirsinger, E., Pourquie, O., Duprat, A. M., Cochard, P., 1996. Induction of oligodendrocyte progenitors in the trunk neural tube by ventralizing signals: effects of notochord and floor plate grafts, and of sonic hedgehog. *Mech Dev* 60, 13-32.
- Porter, J. A., Ekker, S. C., Park, W. J., von Kessler, D. P., Young, K. E., Chen, C. H., Ma, Y., Woods, A. S., Cotter, R. J., Koonin, E. V., Beachy, P. A., 1996. Hedgehog patterning activity: role of a lipophilic modification mediated by the carboxy-terminal autoprocessing domain. *Cell* 86, 21-34.
- Powers, B. E., Sellers, D. L., Lovelett, E. A., Cheung, W., Aalami, S. P., Zapertov, N., Maris, D. O., Horner, P. J., 2013. Remyelination reporter reveals prolonged refinement of spontaneously regenerated myelin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 4075-80, doi:10.1073/pnas.1210293110.

- Pozniak, C. D., Langseth, A. J., Dijkgraaf, G. J., Choe, Y., Werb, Z., Pleasure, S. J., 2010. Sox10 directs neural stem cells toward the oligodendrocyte lineage by decreasing Suppressor of Fused expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 21795-800, doi:10.1073/pnas.1016485107.
- Prineas, J. W., Connell, F., 1979. Remyelination in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 5, 22-31, doi:10.1002/ana.410050105.
- Pringle, N. P., Yu, W. P., Guthrie, S., Roelink, H., Lumsden, A., Peterson, A. C., Richardson, W. D., 1996. Determination of neuroepithelial cell fate: induction of the oligodendrocyte lineage by ventral midline cells and sonic hedgehog. *Dev Biol* 177, 30-42, doi:10.1006/dbio.1996.0142.
- Prins, M., Schul, E., Geurts, J., van der Valk, P., Drukarch, B., van Dam, A. M., 2015. Pathological differences between white and grey matter multiple sclerosis lesions. *Ann N Y Acad Sci* 1351, 99-113, doi:10.1111/nyas.12841.
- Psachoulia, K., Jamen, F., Young, K. M., Richardson, W. D., 2009. Cell cycle dynamics of NG2 cells in the postnatal and ageing brain. *Neuron Glia Biol* 5, 57-67, doi:10.1017/S1740925X09990354.
- Psachoulia, K., Chamberlain, K. A., Heo, D., Davis, S. E., Paskus, J. D., Nanesco, S. E., Dupree, J. L., Wynn, T. A., Huang, J. K., 2016. IL4I1 augments CNS remyelination and axonal protection by modulating T cell driven inflammation. *Brain* 139, 3121-3136, doi:10.1093/brain/aww254.
- Qi, Y., Stapp, D., Qiu, M., 2002. Origin and molecular specification of oligodendrocytes in the telencephalon. *Trends Neurosci* 25, 223-5.
- Qi, Y., Tan, M., Hui, C. C., Qiu, M., 2003. Gli2 is required for normal Shh signaling and oligodendrocyte development in the spinal cord. *Mol Cell Neurosci* 23, 440-50.
- Qiu, A., Mori, S., Miller, M. I., 2015. Diffusion tensor imaging for understanding brain development in early life. *Annu Rev Psychol* 66, 853-76, doi:10.1146/annurev-psych-010814-015340.
- Rakic, S., Zecevic, N., 2003. Early oligodendrocyte progenitor cells in the human fetal telencephalon. *Glia* 41, 117-27, doi:10.1002/glia.10140.
- Ravanelli, A. M., Appel, B., 2015. Motor neurons and oligodendrocytes arise from distinct cell lineages by progenitor recruitment. *Genes Dev* 29, 2504-15, doi:10.1101/gad.271312.115.
- Raymond Y Cajal, S., 1913. Contribucion al conocimiento de la neuroglia del cerebro humano. *Trab Lab Invest Biol (Madrid)* 11.
- Readhead, C., Hood, L., 1990. The dysmyelinating mouse mutations shiverer (shi) and myelin deficient (shim1d). *Behav Genet* 20, 213-34.
- Richardson, W. D., Kessaris, N., Pringle, N., 2006. Oligodendrocyte wars. *Nat Rev Neurosci* 7, 11-8, doi:10.1038/nrn1826.
- Richardson, W. D., Young, K. M., Tripathi, R. B., McKenzie, I., 2011. NG2-glia as multipotent neural stem cells: fact or fantasy? *Neuron* 70, 661-73, doi:10.1016/j.neuron.2011.05.013.
- Riddle, R. D., Johnson, R. L., Laufer, E., Tabin, C., 1993. Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell* 75, 1401-16.
- Rimkus, T. K., Carpenter, R. L., Qasem, S., Chan, M., Lo, H. W., 2016. Targeting the Sonic Hedgehog Signaling Pathway: Review of Smoothed and GLI Inhibitors. *Cancers (Basel)* 8, doi:10.3390/cancers8020022.
- Rio Hortega, D., 1921. Histogenesis y evolucion normal; exodo y distribucion regional de la microglia. *Memor Real Soc Esp Hist Nat* 11.
- Rittchen, S., Boyd, A., Burns, A., Park, J., Fahmy, T. M., Metcalfe, S., Williams, A., 2015. Myelin repair in vivo is increased by targeting oligodendrocyte precursor cells with nanoparticles encapsulating leukaemia inhibitory factor (LIF). *Biomaterials* 56, 78-85, doi:10.1016/j.biomaterials.2015.03.044.
- Rivers, L. E., Young, K. M., Rizzi, M., Jamen, F., Psachoulia, K., Wade, A., Kessaris, N., Richardson, W. D., 2008. PDGFRA/NG2 glia generate myelinating oligodendrocytes and piriform projection neurons in adult mice. *Nat Neurosci* 11, 1392-401, doi:10.1038/nn.2220.

- Robbins, D. J., Fei, D. L., Riobo, N. A., 2012. The Hedgehog signal transduction network. *Sci Signal* 5, re6, doi:10.1126/scisignal.2002906.
- Robinson, S., Miller, R. H., 1999. Contact with central nervous system myelin inhibits oligodendrocyte progenitor maturation. *Dev Biol* 216, 359-68, doi:10.1006/dbio.1999.9466.
- Roelink, H., Augsburger, A., Heemskerk, J., Korzh, V., Norlin, S., Ruiz i Altaba, A., Tanabe, Y., Placzek, M., Edlund, T., Jessell, T. M., et al., 1994. Floor plate and motor neuron induction by vhh-1, a vertebrate homolog of hedgehog expressed by the notochord. *Cell* 76, 761-75.
- Roessler, E., Muenke, M., 2010. The molecular genetics of holoprosencephaly. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 154C, 52-61, doi:10.1002/ajmg.c.30236.
- Rohatgi, R., Milenkovic, L., Scott, M. P., 2007. Patched1 regulates hedgehog signaling at the primary cilium. *Science* 317, 372-6, doi:10.1126/science.1139740.
- Roots, B. I., 2008. The phylogeny of invertebrates and the evolution of myelin. *Neuron Glia Biol* 4, 101-9, doi:10.1017/S1740925X0900012X.
- Rosenberg, S. S., Kelland, E. E., Tokar, E., De la Torre, A. R., Chan, J. R., 2008. The geometric and spatial constraints of the microenvironment induce oligodendrocyte differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 14662-7, doi:10.1073/pnas.0805640105.
- Rosetti, C. M., Maggio, B., Oliveira, R. G., 2008. The self-organization of lipids and proteins of myelin at the membrane interface. Molecular factors underlying the microheterogeneity of domain segregation. *Biochim Biophys Acta* 1778, 1665-75, doi:10.1016/j.bbamem.2008.02.007.
- Roussel, M. F., Hatten, M. E., 2011. Cerebellum development and medulloblastoma. *Curr Top Dev Biol* 94, 235-82, doi:10.1016/B978-0-12-380916-2.00008-5.
- Rowitch, D. H., Kriegstein, A. R., 2010. Developmental genetics of vertebrate glial-cell specification. *Nature* 468, 214-22, doi:10.1038/nature09611.
- Rowitch, D. H., B, S. J., Lee, S. M., Flax, J. D., Snyder, E. Y., McMahon, A. P., 1999. Sonic hedgehog regulates proliferation and inhibits differentiation of CNS precursor cells. *J Neurosci* 19, 8954-65.
- Sabo, J. K., Aumann, T. D., Merlo, D., Kilpatrick, T. J., Cate, H. S., 2011. Remyelination is altered by bone morphogenic protein signaling in demyelinated lesions. *J Neurosci* 31, 4504-10, doi:10.1523/JNEUROSCI.5859-10.2011.
- Saher, G., Simons, M., 2010. Cholesterol and myelin biogenesis. *Subcell Biochem* 51, 489-508, doi:10.1007/978-90-481-8622-8_18.
- Saher, G., Quintes, S., Nave, K. A., 2011. Cholesterol: a novel regulatory role in myelin formation. *Neuroscientist* 17, 79-93, doi:10.1177/1073858410373835.
- Saher, G., Quintes, S., Mobius, W., Wehr, M. C., Kramer-Albers, E. M., Brugger, B., Nave, K. A., 2009. Cholesterol regulates the endoplasmic reticulum exit of the major membrane protein PO required for peripheral myelin compaction. *J Neurosci* 29, 6094-104, doi:10.1523/JNEUROSCI.0686-09.2009.
- Saher, G., Brugger, B., Lappe-Siefke, C., Mobius, W., Tozawa, R., Wehr, M. C., Wieland, F., Ishibashi, S., Nave, K. A., 2005. High cholesterol level is essential for myelin membrane growth. *Nat Neurosci* 8, 468-75, doi:10.1038/nn1426.
- Samanta, J., Grund, E. M., Silva, H. M., Lafaille, J. J., Fishell, G., Salzer, J. L., 2015. Inhibition of Gli1 mobilizes endogenous neural stem cells for remyelination. *Nature* 526, 448-52, doi:10.1038/nature14957.
- Sanchez-Camacho, C., Bovolenta, P., 2008. Autonomous and non-autonomous Shh signalling mediate the in vivo growth and guidance of mouse retinal ganglion cell axons. *Development* 135, 3531-41, doi:10.1242/dev.023663.
- Sanders, T. A., Llagostera, E., Barna, M., 2013. Specialized filopodia direct long-range transport of SHH during vertebrate tissue patterning. *Nature* 497, 628-32, doi:10.1038/nature12157.

- Sasaki, H., Nishizaki, Y., Hui, C., Nakafuku, M., Kondoh, H., 1999. Regulation of Gli2 and Gli3 activities by an amino-terminal repression domain: implication of Gli2 and Gli3 as primary mediators of Shh signaling. *Development* 126, 3915-24.
- Scholz, J., Klein, M. C., Behrens, T. E., Johansen-Berg, H., 2009. Training induces changes in white-matter architecture. *Nat Neurosci* 12, 1370-1, doi:10.1038/nn.2412.
- Schueler-Furman, O., Glick, E., Segovia, J., Linial, M., 2006. Is GAS1 a co-receptor for the GDNF family of ligands? *Trends Pharmacol Sci* 27, 72-7, doi:10.1016/j.tips.2005.12.004.
- Schulte, G., 2010. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXX. The class Frizzled receptors. *Pharmacol Rev* 62, 632-67, doi:10.1124/pr.110.002931.
- Schumacher, M., Hussain, R., Gago, N., Oudinet, J. P., Mattern, C., Ghomari, A. M., 2012. Progesterone synthesis in the nervous system: implications for myelination and myelin repair. *Front Neurosci* 6, 10, doi:10.3389/fnins.2012.00010.
- Seifert, T., Bauer, J., Weissert, R., Fazekas, F., Storch, M. K., 2005. Differential expression of sonic hedgehog immunoreactivity during lesion evolution in autoimmune encephalomyelitis. *J Neuropathol Exp Neurol* 64, 404-11.
- Seppala, M., Xavier, G. M., Fan, C. M., Cobourne, M. T., 2014. Boc modifies the spectrum of holoprosencephaly in the absence of Gas1 function. *Biol Open* 3, 728-40, doi:10.1242/bio.20147989.
- Shen, S., Sandoval, J., Swiss, V. A., Li, J., Dupree, J., Franklin, R. J., Casaccia-Bonnel, P., 2008. Age-dependent epigenetic control of differentiation inhibitors is critical for remyelination efficiency. *Nat Neurosci* 11, 1024-34, doi:10.1038/nn.2172.
- Sim, F. J., Zhao, C., Penderis, J., Franklin, R. J., 2002. The age-related decrease in CNS remyelination efficiency is attributable to an impairment of both oligodendrocyte progenitor recruitment and differentiation. *J Neurosci* 22, 2451-9, doi:20026217.
- Skripuletz, T., Lindner, M., Kotsiari, A., Garde, N., Fokuhl, J., Linsmeier, F., Trebst, C., Stangel, M., 2008. Cortical demyelination is prominent in the murine cuprizone model and is strain-dependent. *Am J Pathol* 172, 1053-61, doi:10.2353/ajpath.2008.070850.
- Snaidero, N., Mobius, W., Czopka, T., Hekking, L. H., Mathisen, C., Verkleij, D., Goebbels, S., Edgar, J., Merkler, D., Lyons, D. A., Nave, K. A., Simons, M., 2014. Myelin membrane wrapping of CNS axons by PI(3,4,5)P3-dependent polarized growth at the inner tongue. *Cell* 156, 277-90, doi:10.1016/j.cell.2013.11.044.
- Snyder, D. H., Valsamis, M. P., Stone, S. H., Raine, C. S., 1975. Progressive demyelination and reparative phenomena in chronic experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuropathol Exp Neurol* 34, 209-21.
- Sofroniew, M. V., Vinters, H. V., 2010. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 119, 7-35, doi:10.1007/s00401-009-0619-8.
- Solly, S. K., Thomas, J. L., Monge, M., Demerens, C., Lubetzki, C., Gardinier, M. V., Matthieu, J. M., Zalc, B., 1996. Myelin/oligodendrocyte glycoprotein (MOG) expression is associated with myelin deposition. *Glia* 18, 39-48, doi:10.1002/(SICI)1098-1136(199609)18:1<39::AID-GLIA4>3.0.CO;2-Z.
- Song, J. Y., Holtz, A. M., Pinsky, J. M., Allen, B. L., 2015. Distinct structural requirements for CDON and BOC in the promotion of Hedgehog signaling. *Dev Biol* 402, 239-52, doi:10.1016/j.ydbio.2015.03.015.
- Soula, C., Danesin, C., Kan, P., Grob, M., Poncet, C., Cochard, P., 2001. Distinct sites of origin of oligodendrocytes and somatic motoneurons in the chick spinal cord: oligodendrocytes arise from Nkx2.2-expressing progenitors by a Shh-dependent mechanism. *Development* 128, 1369-79.

- Spassky, N., Olivier, C., Cobos, I., LeBras, B., Goujet-Zalc, C., Martinez, S., Zalc, B., Thomas, J. L., 2001. The early steps of oligodendrogenesis: insights from the study of the plp lineage in the brain of chicks and rodents. *Dev Neurosci* 23, 318-26.
- Spassky, N., de Castro, F., Le Bras, B., Heydon, K., Queraud-LeSaux, F., Bloch-Gallego, E., Chedotal, A., Zalc, B., Thomas, J. L., 2002. Directional guidance of oligodendroglial migration by class 3 semaphorins and netrin-1. *J Neurosci* 22, 5992-6004, doi:20026573.
- Sperber, B. R., Boyle-Walsh, E. A., Engleka, M. J., Gadue, P., Peterson, A. C., Stein, P. L., Scherer, S. S., McMorris, F. A., 2001. A unique role for Fyn in CNS myelination. *J Neurosci* 21, 2039-47.
- Stidworthy, M. F., Genoud, S., Suter, U., Mantei, N., Franklin, R. J., 2003. Quantifying the early stages of remyelination following cuprizone-induced demyelination. *Brain Pathol* 13, 329-39.
- Stidworthy, M. F., Genoud, S., Li, W. W., Leone, D. P., Mantei, N., Suter, U., Franklin, R. J., 2004. Notch1 and Jagged1 are expressed after CNS demyelination, but are not a major rate-determining factor during remyelination. *Brain* 127, 1928-41, doi:10.1093/brain/awh217.
- Sun, D., Jakobs, T. C., 2012. Structural remodeling of astrocytes in the injured CNS. *Neuroscientist* 18, 567-88, doi:10.1177/1073858411423441.
- Svaren, J., 2014. MicroRNA and transcriptional crosstalk in myelinating glia. *Neurochem Int* 77, 50-7, doi:10.1016/j.neuint.2014.06.010.
- Szymanska, K., Johnson, C. A., 2012. The transition zone: an essential functional compartment of cilia. *Cilia* 1, 10, doi:10.1186/2046-2530-1-10.
- Taipale, J., Cooper, M. K., Maiti, T., Beachy, P. A., 2002. Patched acts catalytically to suppress the activity of Smoothened. *Nature* 418, 892-7, doi:10.1038/nature00989.
- Talbott, J. F., Loy, D. N., Liu, Y., Qiu, M. S., Bunge, M. B., Rao, M. S., 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, doi:10.1016/j.expneurol.2004.05.038.
- Tanaka, T., Murakami, K., Bando, Y., Yoshida, S., 2013. Minocycline reduces remyelination by suppressing ciliary neurotrophic factor expression after cuprizone-induced demyelination. *J Neurochem* 127, 259-70, doi:10.1111/jnc.12289.
- Taveggia, C., Thaker, P., Petrylak, A., Caporaso, G. L., Toews, A., Falls, D. L., Einheber, S., Salzer, J. L., 2008. Type III neuregulin-1 promotes oligodendrocyte myelination. *Glia* 56, 284-93, doi:10.1002/glia.20612.
- Tekki-Kessarlis, N., Woodruff, R., Hall, A. C., Gaffield, W., Kimura, S., Stiles, C. D., Rowitch, D. H., Richardson, W. D., 2001. Hedgehog-dependent oligodendrocyte lineage specification in the telencephalon. *Development* 128, 2545-54.
- Tenzen, T., Allen, B. L., Cole, F., Kang, J. S., Krauss, R. S., McMahon, A. P., 2006. The cell surface membrane proteins Cdo and Boc are components and targets of the Hedgehog signaling pathway and feedback network in mice. *Dev Cell* 10, 647-56, doi:10.1016/j.devcel.2006.04.004.
- Teperino, R., Aberger, F., Esterbauer, H., Riobo, N., Pospisilik, J. A., 2014. Canonical and non-canonical Hedgehog signalling and the control of metabolism. *Semin Cell Dev Biol* 33, 81-92, doi:10.1016/j.semcdb.2014.05.007.
- Teperino, R., Amann, S., Bayer, M., McGee, S. L., Loipetzberger, A., Connor, T., Jaeger, C., Kammerer, B., Winter, L., Wiche, G., Dalgaard, K., Selvaraj, M., Gaster, M., Lee-Young, R. S., Febbraio, M. A., Knauf, C., Cani, P. D., Aberger, F., Penninger, J. M., Pospisilik, J. A., Esterbauer, H., 2012. Hedgehog partial agonism drives Warburg-like metabolism in muscle and brown fat. *Cell* 151, 414-26, doi:10.1016/j.cell.2012.09.021.
- Terasaki, P. I., Park, M. S., Opelz, G., Saito, S., Mickey, M. R., 1977. The role of B-lymphocyte antigens in MLC stimulation. *Transplant Proc* 9, 469-73.

- Thibert, C., Teillet, M. A., Lapointe, F., Mazelin, L., Le Douarin, N. M., Mehlen, P., 2003. Inhibition of neuroepithelial patched-induced apoptosis by sonic hedgehog. *Science* 301, 843-6, doi:10.1126/science.1085405.
- Tomassy, G. S., Dershowitz, L. B., Arlotta, P., 2016. Diversity Matters: A Revised Guide to Myelination. *Trends Cell Biol* 26, 135-47, doi:10.1016/j.tcb.2015.09.002.
- Tong, C. K., Fuentealba, L. C., Shah, J. K., Lindquist, R. A., Ihrie, R. A., Guinto, C. D., Rodas-Rodriguez, J. L., Alvarez-Buylla, A., 2015. A Dorsal SHH-Dependent Domain in the V-SVZ Produces Large Numbers of Oligodendroglial Lineage Cells in the Postnatal Brain. *Stem Cell Reports* 5, 461-70, doi:10.1016/j.stemcr.2015.08.013.
- Touahri, Y., Escalas, N., Benazeraf, B., Cochard, P., Danesin, C., Soula, C., 2012. Sulfatase 1 promotes the motor neuron-to-oligodendrocyte fate switch by activating Shh signaling in Olig2 progenitors of the embryonic ventral spinal cord. *J Neurosci* 32, 18018-34, doi:10.1523/JNEUROSCI.3553-12.2012.
- Traiffort, E., Angot, E., Ruat, M., 2010. Sonic Hedgehog signaling in the mammalian brain. *J Neurochem* 113, 576-90, doi:10.1111/j.1471-4159.2010.06642.x.
- Traiffort, E., Charytoniuk, D. A., Faure, H., Ruat, M., 1998. Regional distribution of Sonic Hedgehog, patched, and smoothed mRNA in the adult rat brain. *J Neurochem* 70, 1327-30.
- Traiffort, E., Zakaria, M., Laouarem, Y., Ferent, J., 2016. Hedgehog: A Key Signaling in the Development of the Oligodendrocyte Lineage. *J.Dev.Biol.*
- Traiffort, E., Moya, K. L., Faure, H., Hassig, R., Ruat, M., 2001. High expression and anterograde axonal transport of aminoterminal sonic hedgehog in the adult hamster brain. *Eur J Neurosci* 14, 839-50.
- Traiffort, E., Charytoniuk, D., Watroba, L., Faure, H., Sales, N., Ruat, M., 1999. Discrete localizations of hedgehog signalling components in the developing and adult rat nervous system. *Eur J Neurosci* 11, 3199-214.
- Traka, M., Arasi, K., Avila, R. L., Podojil, J. R., Christakos, A., Miller, S. D., Soliven, B., Popko, B., 2010. A genetic mouse model of adult-onset, pervasive central nervous system demyelination with robust remyelination. *Brain* 133, 3017-29, doi:10.1093/brain/awq247.
- Trapp, B. D., Nishiyama, A., Cheng, D., Macklin, W., 1997. Differentiation and death of premyelinating oligodendrocytes in developing rodent brain. *J Cell Biol* 137, 459-68.
- Trazzi, S., Fuchs, C., Valli, E., Perini, G., Bartesaghi, R., Ciani, E., 2013. The amyloid precursor protein (APP) triplicated gene impairs neuronal precursor differentiation and neurite development through two different domains in the Ts65Dn mouse model for Down syndrome. *J Biol Chem* 288, 20817-29, doi:10.1074/jbc.M113.451088.
- Tripathi, R. B., Clarke, L. E., Burzomato, V., Kessar, N., Anderson, P. N., Attwell, D., Richardson, W. D., 2011. Dorsally and ventrally derived oligodendrocytes have similar electrical properties but myelinate preferred tracts. *J Neurosci* 31, 6809-19, doi:10.1523/JNEUROSCI.6474-10.2011.
- Trousse, F., Marti, E., Gruss, P., Torres, M., Bovolenta, P., 2001. Control of retinal ganglion cell axon growth: a new role for Sonic hedgehog. *Development* 128, 3927-36.
- Tsai, H. H., Niu, J., Munji, R., Davalos, D., Chang, J., Zhang, H., Tien, A. C., Kuo, C. J., Chan, J. R., Daneman, R., Fancy, S. P., 2016. Oligodendrocyte precursors migrate along vasculature in the developing nervous system. *Science* 351, 379-84, doi:10.1126/science.aad3839.
- Tucker, E. S., Segall, S., Gopalakrishna, D., Wu, Y., Vernon, M., Polleux, F., Lamantia, A. S., 2008. Molecular specification and patterning of progenitor cells in the lateral and medial ganglionic eminences. *J Neurosci* 28, 9504-18, doi:10.1523/JNEUROSCI.2341-08.2008.
- Tukachinsky, H., Kuzmickas, R. P., Jao, C. Y., Liu, J., Salic, A., 2012. Dispatched and scube mediate the efficient secretion of the cholesterol-modified hedgehog ligand. *Cell Rep* 2, 308-20, doi:10.1016/j.celrep.2012.07.010.

- Vallstedt, A., Klos, J. M., Ericson, J., 2005. Multiple dorsoventral origins of oligodendrocyte generation in the spinal cord and hindbrain. *Neuron* 45, 55-67, doi:10.1016/j.neuron.2004.12.026.
- Vana, A. C., Lucchinetti, C. F., Le, T. Q., Armstrong, R. C., 2007. Myelin transcription factor 1 (Myt1) expression in demyelinated lesions of rodent and human CNS. *Glia* 55, 687-97, doi:10.1002/glia.20492.
- Varjosalo, M., Taipale, J., 2008. Hedgehog: functions and mechanisms. *Genes Dev* 22, 2454-72, doi:10.1101/gad.1693608.
- Vercellino, M., Romagnolo, A., Mattioda, A., Masera, S., Piacentino, C., Merola, A., Chio, A., Mutani, R., Cavalla, P., 2009a. Multiple sclerosis relapses: a multivariable analysis of residual disability determinants. *Acta Neurol Scand* 119, 126-30, doi:10.1111/j.1600-0404.2008.01076.x.
- Vercellino, M., Masera, S., Lorenzatti, M., Condello, C., Merola, A., Mattioda, A., Tribolo, A., Capello, E., Mancardi, G. L., Mutani, R., Giordana, M. T., Cavalla, P., 2009b. Demyelination, inflammation, and neurodegeneration in multiple sclerosis deep gray matter. *J Neuropathol Exp Neurol* 68, 489-502, doi:10.1097/NEN.0b013e3181a19a5a.
- Vernerey, J., Macchi, M., Magalon, K., Cayre, M., Durbec, P., 2013. Ciliary neurotrophic factor controls progenitor migration during remyelination in the adult rodent brain. *J Neurosci* 33, 3240-50, doi:10.1523/JNEUROSCI.2579-12.2013.
- Virshow, R., 1846. Ueber das granulirte Aussehen der Wandungen der Gehirnvventrikel. *Allg Z Psychiat* 3: 242-250, 1846.
- Vischer, B. R., Myers, L. W., Ellison, G. W., Malmgren, R. M., Detels, R., Lucia, M. V., Madden, D. L., Sever, J. L., Park, M. S., Coulson, A. H., 1979. HLA types and immunity in multiple sclerosis. *Neurology* 29, 1561-5.
- VonDrän, M. W., Singh, H., Honeywell, J. Z., Dreyfus, C. F., 2011. Levels of BDNF impact oligodendrocyte lineage cells following a cuprizone lesion. *J Neurosci* 31, 14182-90, doi:10.1523/JNEUROSCI.6595-10.2011.
- Voyvodic, J. T., 1989. Target size regulates calibre and myelination of sympathetic axons. *Nature* 342, 430-3, doi:10.1038/342430a0.
- Vuong, T. A., Leem, Y. E., Kim, B. G., Cho, H., Lee, S. J., Bae, G. U., Kang, J. S., 2017. A Sonic hedgehog coreceptor, BOC regulates neuronal differentiation and neurite outgrowth via interaction with ABL and JNK activation. *Cell Signal* 30, 30-40, doi:10.1016/j.cellsig.2016.11.013.
- Wallace, V. A., 1999. Purkinje-cell-derived Sonic hedgehog regulates granule neuron precursor cell proliferation in the developing mouse cerebellum. *Curr Biol* 9, 445-8.
- Wang, C., Wu, H., Katritch, V., Han, G. W., Huang, X. P., Liu, W., Siu, F. Y., Roth, B. L., Cherezov, V., Stevens, R. C., 2013. Structure of the human smoothed receptor bound to an antitumour agent. *Nature* 497, 338-43, doi:10.1038/nature12167.
- Wang, L. C., Almazan, G., 2016. Cdon, a cell surface protein, mediates oligodendrocyte differentiation and myelination. *Glia* 64, 1021-33, doi:10.1002/glia.22980.
- Wang, Q., Huang, S., Yang, L., Zhao, L., Yin, Y., Liu, Z., Chen, Z., Zhang, H., 2008. Down-regulation of Sonic hedgehog signaling pathway activity is involved in 5-fluorouracil-induced apoptosis and motility inhibition in Hep3B cells. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 40, 819-29.
- Watkins, T. A., Emery, B., Mulinyawe, S., Barres, B. A., 2008. Distinct stages of myelination regulated by gamma-secretase and astrocytes in a rapidly myelinating CNS coculture system. *Neuron* 60, 555-69, doi:10.1016/j.neuron.2008.09.011.
- Waxman, S. G., 1972. Regional differentiation of the axon: a review with special reference to the concept of the multiplex neuron. *Brain Res* 47, 269-88.
- Waxman, S. G., 2006. Axonal conduction and injury in multiple sclerosis: the role of sodium channels. *Nat Rev Neurosci* 7, 932-41, doi:10.1038/nrn2023.

- Wechsler-Reya, R. J., Scott, M. P., 1999. Control of neuronal precursor proliferation in the cerebellum by Sonic Hedgehog. *Neuron* 22, 103-14.
- Wegener, A., Deboux, C., Bachelin, C., Frah, M., Kerninon, C., Seilhean, D., Weider, M., Wegner, M., Nait-Oumesmar, B., 2015. Gain of Olig2 function in oligodendrocyte progenitors promotes remyelination. *Brain* 138, 120-35, doi:10.1093/brain/awu375.
- Wegorzewska, M., Krauss, R. S., Kang, J. S., 2003. Overexpression of the immunoglobulin superfamily members CDO and BOC enhances differentiation of the human rhabdomyosarcoma cell line RD. *Mol Carcinog* 37, 1-4, doi:10.1002/mc.10121.
- Wight, P. A., Dobretsova, A., 2004. Where, when and how much: regulation of myelin proteolipid protein gene expression. *Cell Mol Life Sci* 61, 810-21, doi:10.1007/s00018-003-3309-z.
- Williams, A., Piaton, G., Aigrot, M. S., Belhadi, A., Theaudin, M., Petermann, F., Thomas, J. L., Zalc, B., Lubetzki, C., 2007. Semaphorin 3A and 3F: key players in myelin repair in multiple sclerosis? *Brain* 130, 2554-65.
- Woodruff, R. H., Fruttiger, M., Richardson, W. D., Franklin, R. J., 2004. Platelet-derived growth factor regulates oligodendrocyte progenitor numbers in adult CNS and their response following CNS demyelination. *Mol Cell Neurosci* 25, 252-62, doi:10.1016/j.mcn.2003.10.014.
- Xie, C., Li, Z., Zhang, G. X., Guan, Y., 2014. Wnt signaling in remyelination in multiple sclerosis: friend or foe? *Mol Neurobiol* 49, 1117-25, doi:10.1007/s12035-013-8584-6.
- Yam, P. T., Charron, F., 2013. Signaling mechanisms of non-conventional axon guidance cues: the Shh, BMP and Wnt morphogens. *Curr Opin Neurobiol* 23, 965-73, doi:10.1016/j.conb.2013.09.002.
- Yam, P. T., Langlois, S. D., Morin, S., Charron, F., 2009. Sonic hedgehog guides axons through a noncanonical, Src-family-kinase-dependent signaling pathway. *Neuron* 62, 349-62, doi:10.1016/j.neuron.2009.03.022.
- Yan, H., Rivkees, S. A., 2002. Hepatocyte growth factor stimulates the proliferation and migration of oligodendrocyte precursor cells. *J Neurosci Res* 69, 597-606, doi:10.1002/jnr.10323.
- Yang, X. H., Ding, Y., Li, W., Zhang, R. Y., Wu, J. L., Ling, E. A., Wu, W., Zeng, Y. S., 2016. Effects of electroacupuncture and the retinoid X receptor (RXR) signalling pathway on oligodendrocyte differentiation in the demyelinated spinal cord of rats. *Acupunct Med*, doi:10.1136/acupmed-2016-011134.
- Yao, D. L., Liu, X., Hudson, L. D., Webster, H. D., 1995. Insulin-like growth factor I treatment reduces demyelination and up-regulates gene expression of myelin-related proteins in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 6190-4.
- Yao, S., Lum, L., Beachy, P., 2006. The ihog cell-surface proteins bind Hedgehog and mediate pathway activation. *Cell* 125, 343-57.
- Yavari, A., Nagaraj, R., Owusu-Ansah, E., Folick, A., Ngo, K., Hillman, T., Call, G., Rohatgi, R., Scott, M. P., Banerjee, U., 2010. Role of lipid metabolism in smoothed derepression in hedgehog signaling. *Dev Cell* 19, 54-65, doi:10.1016/j.devcel.2010.06.007.
- Ye, F., Chen, Y., Hoang, T., Montgomery, R. L., Zhao, X. H., Bu, H., Hu, T., Taketo, M. M., van Es, J. H., Clevers, H., Hsieh, J., Bassel-Duby, R., Olson, E. N., Lu, Q. R., 2009. HDAC1 and HDAC2 regulate oligodendrocyte differentiation by disrupting the beta-catenin-TCF interaction. *Nat Neurosci* 12, 829-38, doi:10.1038/nn.2333.
- Young, K. M., Psachoulia, K., Tripathi, R. B., Dunn, S. J., Cossell, L., Attwell, D., Tohyama, K., Richardson, W. D., 2013. Oligodendrocyte dynamics in the healthy adult CNS: evidence for myelin remodeling. *Neuron* 77, 873-85, doi:10.1016/j.neuron.2013.01.006.
- Yuen, T. J., Johnson, K. R., Miron, V. E., Zhao, C., Quandt, J., Harrisingh, M. C., Swire, M., Williams, A., McFarland, H. F., Franklin, R. J., Ffrench-Constant, C., 2013. Identification of endothelin 2 as an inflammatory factor that promotes central nervous system remyelination. *Brain* 136, 1035-47, doi:10.1093/brain/awt024.

- Yurlova, L., Kahya, N., Aggarwal, S., Kaiser, H. J., Chiantia, S., Bakhti, M., Pewzner-Jung, Y., Ben-David, O., Futerman, A. H., Brugger, B., Simons, M., 2011. Self-segregation of myelin membrane lipids in model membranes. *Biophys J* 101, 2713-20, doi:10.1016/j.bpj.2011.10.026.
- Zalc, B., Colman, D. R., 2000. Origins of vertebrate success. *Science* 288, 271-2.
- Zawadzka, M., Rivers, L. E., Fancy, S. P., Zhao, C., Tripathi, R., Jamen, F., Young, K., Goncharevich, A., Pohl, H., Rizzi, M., Rowitch, D. H., Kessler, N., Suter, U., Richardson, W. D., Franklin, R. J., 2010. CNS-resident glial progenitor/stem cells produce Schwann cells as well as oligodendrocytes during repair of CNS demyelination. *Cell Stem Cell* 6, 578-90, doi:10.1016/j.stem.2010.04.002.
- Zhang, W., Hong, M., Bae, G. U., Kang, J. S., Krauss, R. S., 2011. Boc modifies the holoprosencephaly spectrum of Cdo mutant mice. *Dis Model Mech* 4, 368-80, doi:10.1242/dmm.005744.
- Zhang, X., Zhang, F., Huang, D., Wu, L., Ma, L., Liu, H., Zhao, Y., Yu, S., Shi, J., 2016. Contribution of Gray and White Matter Abnormalities to Cognitive Impairment in Multiple Sclerosis. *Int J Mol Sci* 18, doi:10.3390/ijms18010046.
- Zhang, Y., Argaw, A. T., Gurfein, B. T., Zameer, A., Snyder, B. J., Ge, C., Lu, Q. R., Rowitch, D. H., Raine, C. S., Brosnan, C. F., John, G. R., 2009. Notch1 signaling plays a role in regulating precursor differentiation during CNS remyelination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 19162-7, doi:10.1073/pnas.0902834106.
- Zhao, Y., Tong, C., Jiang, J., 2007. Hedgehog regulates smoothed activity by inducing a conformational switch. *Nature* 450, 252-8, doi:10.1038/nature06225.
- Zheng, X., Mann, R. K., Sever, N., Beachy, P. A., 2010. Genetic and biochemical definition of the Hedgehog receptor. *Genes Dev* 24, 57-71, doi:10.1101/gad.1870310.
- Zhou, Q., Anderson, D. J., 2002. The bHLH transcription factors OLIG2 and OLIG1 couple neuronal and glial subtype specification. *Cell* 109, 61-73.
- Zhou, Y. X., Pannu, R., Le, T. Q., Armstrong, R. C., 2012. Fibroblast growth factor 1 (FGFR1) modulation regulates repair capacity of oligodendrocyte progenitor cells following chronic demyelination. *Neurobiol Dis* 45, 196-205, doi:10.1016/j.nbd.2011.08.004.
- Ziebell, J. M., Adelson, P. D., Lifshitz, J., 2015. Microglia: dismantling and rebuilding circuits after acute neurological injury. *Metab Brain Dis* 30, 393-400, doi:10.1007/s11011-014-9539-y.
- Zuchero, J. B., Barres, B. A., 2015. Glia in mammalian development and disease. *Development* 142, 3805-9, doi:10.1242/dev.129304.
- Zuchero, J. B., Fu, M. M., Sloan, S. A., Ibrahim, A., Olson, A., Zaremba, A., Dugas, J. C., Wienbar, S., Caprariello, A. V., Kantor, C., Leonoudakis, D., Lariosa-Willingham, K., Kronenberg, G., Gertz, K., Soderling, S. H., Miller, R. H., Barres, B. A., 2015. CNS myelin wrapping is driven by actin disassembly. *Dev Cell* 34, 152-67, doi:10.1016/j.devcel.2015.06.011.
- Zujovic, V., Doucerain, C., Hidalgo, A., Bachelin, C., Lachapelle, F., Weissert, R., Stadelmann, C., Linington, C., Baron-Van Evercooren, A., 2012. Exogenous schwann cells migrate, remyelinate and promote clinical recovery in experimental auto-immune encephalomyelitis. *PLoS One* 7, e42667, doi:10.1371/journal.pone.0042667.

Titre : Caractérisation des rôles du co-récepteur de Shh, Boc, dans le développement et la réparation de la myéline du système nerveux central.

Mots clés : Boc, sonic hedgehog, co-récepteur, oligodendrocyte, myéline, régénération

Résumé : Au cours des dernières années, des progrès significatifs ont été réalisés dans la prévention des épisodes de démyélinisation qui surviennent au cours de la sclérose en plaques, mais beaucoup moins dans le domaine de la régénération de la myéline détruite. Notre équipe a précédemment démontré que la protéine Sonic Hedgehog (Shh) est un régulateur positif des progéniteurs oligodendrocytaires ou OPC favorisant la réparation de la myéline dans un modèle de démyélinisation induite par injection focale de lysolécithine dans le corps calleux chez la souris. Cependant, les mécanismes moléculaires mis en jeu restent encore largement méconnus. Mon projet de thèse consiste à explorer le rôle d'un co-récepteur de Shh, Boc, une glycoprotéine reliée aux molécules d'adhésion cellulaire (CAM) et fortement induite à l'issue d'une démyélinisation. Dans un premier temps, nous avons focalisé nos investigations sur la caractérisation du mutant Boc knockout au cours de la myélinisation développementale. Nos résultats révèlent des activités région et temps spécifiques de Boc sur les mécanismes de prolifération et de maturation des progéniteurs oligodendrocytaires. De plus, les souris Boc knockout

présentent un phénotype d'hypermyélinisation qui apparaît au cours des premières semaines post-natales et persiste à l'âge adulte. Dans un second temps, nous avons déterminé l'effet de l'absence de Boc sur les processus de démyélinisation et de réparation de la myéline. En utilisant le modèle d'injection focale de lysolécithine dans le corps calleux, nous avons démontré un retard dans la maturation des OPC et une réduction de la régression des lésions chez les souris dépourvues de Boc. Nos résultats indiquent ainsi un rôle positif de Boc dans le processus de régénération faisant suite à une démyélinisation. Par ailleurs, l'absence de Boc diminue la réaction gliale inflammatoire étroitement associée au mécanisme de régénération de la myéline. L'ensemble de nos résultats indique une activité différente du récepteur au cours des processus de myélinisation et de remyélinisation du système nerveux central. Ces données originales contribuent à la caractérisation d'une composante de la signalisation Hedgehog impliquée dans le processus régénératif associé aux pathologies démyélinisantes. Ces résultats seront importants à considérer dans le cadre de l'approche thérapeutique des maladies démyélinisantes.

Title : Characterization of the Sonic Hedgehog co-receptor, Boc, in the development and regeneration of myelin in the central nervous system

Keywords : Boc, sonic hedgehog, oligodendrocyte, myelin, regeneration

Abstract: During the last years, significant progress have been made in preventing demyelinating events that occur during multiple sclerosis, but much less in the field of regeneration of the lost myelin. Our team has previously demonstrated that the Sonic Hedgehog (Shh) protein is a positive regulator of oligodendrocyte progenitors enhancing myelin repair in a demyelination model relying on the focal injection of lysolecithin into the corpus callosum. However, the molecular mechanisms that are involved are still largely unknown. My thesis project was aimed at exploring the role of a co-receptor of Shh, Boc, a glycoprotein linked to the cell adhesion molecules (CAM) and strongly induced during myelin repair. First, we focused our investigations on the characterization of the Boc knockout mutant during developmental myelination. Our results reveal region and time specific activities for Boc in the mechanisms of proliferation and maturation of oligodendrocyte progenitors. In addition, Boc knockout mice exhibit hypermyelination that occurs

in the first postnatal weeks and persists until adulthood. In a second step, we determined the effect of the absence of Boc in the processes of demyelination and myelin repair. Using the model of focal injection of lysolecithin into the corpus callosum, we demonstrated a delay in oligodendrocyte maturation and a decrease in lesion regression in the Boc knockout mice. Thus, our results indicate a positive role for Boc in the regeneration process following demyelination. Furthermore, the absence of Boc decreases the inflammatory glial reaction closely associated with myelin repair. Altogether, our results indicate a different activity of the receptor during the processes of myelination and remyelination in the central nervous system. These original data contribute to the characterization of a component of the Hedgehog signaling pathway involved in the regenerative process associated with demyelinating pathologies. Those results will be important to consider in the context of the therapeutic approach of the demyelinating diseases.

