



**HAL**  
open science

# Rôle de la voie de signalisation Sonic Hedgehog dans les cellules Glast positives du cerveau de souris adulte

Linda Tirou

► **To cite this version:**

Linda Tirou. Rôle de la voie de signalisation Sonic Hedgehog dans les cellules Glast positives du cerveau de souris adulte. Neurobiologie. Université Paris-Saclay, 2020. Français. NNT : 2020UPASL022 . tel-03402975

**HAL Id: tel-03402975**

**<https://theses.hal.science/tel-03402975>**

Submitted on 26 Oct 2021

**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.

# Rôle de la voie de signalisation Sonic Hedgehog dans les cellules Glast positives du cerveau de souris adulte

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

École doctorale n° 568 Signalisation et réseaux intégratifs en biologie  
(BIOSIGNE)

Spécialité de doctorat: Aspects moléculaires et réseaux intégratifs en biologie

Unité de recherche : Institut des neurosciences Paris-Saclay (NeuroPSI UMR 9197)

Référent : Faculté des sciences

**Thèse présentée et soutenue à Gif-sur-Yvette, le 09/10/2020, par**

**Linda TIROU**

## Composition du Jury

**Elisabeth TRAIFFORT**

Directrice de Recherche,  
INSERM U1195 (Kremlin-Bicêtre)

Présidente

**Corinne LELOUP**

Directrice de Recherche,  
CNRS UMR 6265, INRA 1324 (Bourgogne)

Rapportrice & Examinatrice

**Isabelle MUS-VETEAU**

Directrice de Recherche  
CNRS UMR 7275 (Sophia Antipolis)

Rapportrice & Examinatrice

**Alain-Pierre GADEAU**

Directeur de Recherche,  
INSERM U1034 (Bordeaux)

Examineur

**Glenn DALLERAC**

Chargé de Recherche,  
CNRS UMR9197 NeuroPSI (Gif-sur-Yvette)

Examineur

**Martial RUAT**

Directeur de Recherche,  
CNRS UMR9197 NeuroPSI (Gif-sur-Yvette)

Directeur de thèse



## Remerciements

Voilà ... me voici enfin au terme de cette thèse. Il m'a fallu 5 ans ... cinq années qui m'ont paru très longues et qui, pourtant, semblent être passées à la vitesse de la lumière, maintenant que j'écris ces mots. Je tiens à remercier les nombreuses personnes qui m'ont permise de vivre cette aventure. Et oui, la poursuite d'un doctorat est une véritable quête au cours de laquelle on en apprend beaucoup sur la science, la recherche, la vie au labo, la hiérarchie et les responsabilités mais aussi, et surtout, sur soi-même, nos limites, nos convictions et notre rapport aux autres.

Pour commencer, je tiens à remercier mon directeur de thèse, Martial RUAT, pour m'avoir guidée au cours de ces années. Merci de m'avoir intégrée à votre équipe dès le début, pour tout ce que j'ai appris et les nombreuses collaborations auxquelles j'ai pu participer. Je remercie également Philippe VERNIER et François ROUYER, ancien et actuel directeur de l'Institut NeuroPSI, pour m'avoir permise d'effectuer cette thèse dans le paysage bucolique de Gif sur Yvette. Merci à l'école doctorale EDS68 BIOSIGNE et aux différents organismes qui ont financé mes travaux. Merci au jury qui a accepté de lire ce travail.

Tout cela aurait été impossible sans l'aide, le conseil et la participation de nombreuses personnes que je ne peux toutes citer (ma thèse est déjà assez longue comme ça!) mais que je remercie profondément, que ce soit pour un conseil technique, un café ou juste un déjeuner ensemble, merci! Je vais quand même en nommer certaines (oui, je me contredis, mais c'est ma thèse après tout, je décide!). Je remercie la personne qui m'a appris la majorité des outils et procédures qui m'ont permis de devenir indépendante. Merci Hélène FAURE pour ta patience et ton écoute face à toutes mes questions (de simples vérifications de dilutions à ton aide lors du transfert d'ependorfs de l'azote liquide au  $-80^{\circ}\text{C}$ ).

Au cours de ces 5 années, j'ai pu avoir des fous rires et passer de bons moments grâce à mes collègues dont certains sont devenus de véritables amis qui me sont très chers (m'est-ce pas Stéphanie et Giovanni?). Je tenais donc à remercier Mariagiovanna (-pour avoir ri à mes blagues idiotes et m'avoir accompagnée), Rayel, Laurent, Lucile et Clément! Merci pour votre bonne humeur et votre soutien au cours de ces années. Merci également aux autres doctorants qui ont participé aux NeuroPSI Talents Day et au Happy Neuro Hour Club (j'espère que quelqu'un sera changer ce nom un jour). Ce sont de superbes souvenirs...

Je remercie, bien sûr, le personnel de l'animalerie qui ont répondu à mes nombreuses questions et demandes, qui ont choqué les fameuses souris qui ont permis tout ce travail. Merci à Phareviens, Bioemergences et autres collaborateurs qui m'ont montré un aperçu de leur science.

Je remercie aussi mes amies, Hbanane, Maly, Lina (qui sont toujours là pour m'écouter raconter des bêtises) et les filles pour votre soutien ☺. Merci à Déborah et Emmanuelle, mes complices de tango argentin, qui m'ont aidée à garder la tête froide dans les moments difficiles.

ENFIN... le plus important et cher à mon cœur pour la fin, je tiens à remercier ma famille, Papa, Maman, Nouria, Sriram, Benjamine pour votre amour et soutien au cours de ces années et de ma vie. Je ne serais pas là sans vous. Merci d'avoir été là pour écouter mes monologues et blagues de scientifiques malgré votre appréhension face aux coupes de cerveau. Merci pour les soirées glaces devant Hercule Poirot ou Esprits Criminels ♡♡♡♡.

Et voilà... c'est la fin... une page qui se tourne... malgré tout, je suis heureuse d'avoir pu faire cette thèse, j'ai aimé travaillé sur ces différents sujets et j'espère avoir grandi en tant que personne, en tant que doctorante Linda TIROU.

Thank you!



## LISTE DES ABREVIATIONS

$\alpha$ -MSH	$\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone
aBNST	Anterior subdivisions of the bed nucleus of the stria terminalis
A $\beta$	Amyloïde $\beta$
ADAM	A Disintegrin And Metalloprotease
AGE	Advanced glycations end products
AgRP	Agouti-related protein
Aldh111	Aldehyde Dehydrogenase 1 Family Member L1
AMPC	Adenosine monophosphate cyclique
aPKC $\iota/\lambda$	Protéine kinase C atypique iota/lambda
AQP4	Aquaporine 4
ATO	Arsenic trioxide
AVC	Accident vasculaire cérébral
BCC	Carcinome basocellulaire
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
BHE	Barrière hématoencéphalique
Boc	Brother of Cdo
Boi	Brother of Ihog
Camkk2	Calcium/Calmodulin Dependent protein Kinase Kinase 2
CCK	Cholécystokinine
CCN	Cellules de la crête neurale crânienne
Cdo	Cell adhesion molecule Down-regulated by Oncogene
CGP	Précurseurs des cellules granulaires du cervelet
CK1	Casein kinase 1
CNBP	Cellular Nucleic acid Binding Protein
CNP	2',3'-Cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase
CR	Calretinine
CRD	Domaine riche en cystéine
CSNs	Cellules souches neurales
CVO	Organe circumventriculaire
C-ter	Carboxy-terminal
Dcx	Doublecortine
Dhh	Desert Hedgehog
Disp	Dispatched
DMH	Noyau hypothalamique dorsomédial
EAE	Experimental Autoimmune Encephalomyelitis
ECD	Domaine extracellulaire
EGF	Epidermal growth factor
EM	Eminence médiane
ERAD	Complexe de dégradation du réticulum endoplasmique
ESCRT	Endosomal Sorting Complex Required for Transport
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FAS	Syndrome d'alcoolisme foetal
FDA	United States Food and Drug Administration

FGF	Fibroblast growth factor
FTO	Fat mass and obesity-associated protein
GABA	$\gamma$ -aminobutyric acid
Gas1	Growth arrest specific 1
GDNF	Glial cell-line derived neurotrophic factor
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
GLAST	Astrocyte-specific glutamate transporter
Gli	Glioma-associated oncogene
GLP1	Glucagon-like peptide 1
GLT1	Glutamate transporter 1
GLUT	Transporteur de glucose
GRK2	G-protein coupled receptor kinase 2
GSK3	Glycogen synthase kinase-3
GTT	Test de tolérance au glucose
HFD	High fat diet
HGP	Production hépatique de glucose
Hh	Hedgehog
Hhat	Hedgehog acyltransférase
HhC	Fragment Hedgehog carboxy-terminal
Hhip	Hedgehog interacting protein
HhN	Fragment Hedgehog amino-terminal
HIS	Hybridation <i>in situ</i>
HPE	Holoprosencéphalie
HSPG	Protéoglycane à héparane sulfate
ICD	Domaine carboxy-terminal intracellulaire
ICL	Boucle intracellulaire
icv	Injection intraventriculaire
IGF1	Insulin like growth factor 1
Ihh	Indian Hedgehog
Ihog	Interference Hedgehog
IR	Récepteur à l'insuline
IRS	Insulin receptor substrates
ITT	Test de tolérance à l'insuline
Kir4.1	Inward-rectified potassium channel
LD	Domaine de liaison
LHA	Aire hypothalamique latérale
LPC	Lysolécithine
MAPk	Mitogen-activated protein kinases
MB	Médulloblastome
MBH	Mediobasal hypothalamic nucleus
MBP	Myelin basic protein
MC3/4R	Récepteurs à la mélanocortine 3 et 4
MCT1	Transporteur monocarboxylate 1
MPF	Mitosis promoting factor
MYRF	Myelin regulator factor

NEFA	Non-esterified fatty acids
NPC1	Niemann-Pick C1
NPY	Neuropeptide Y
NT	Neurotransmetteurs
N-ter	Amino-terminal
ObR	Récepteur à la leptine
ODC	Ornithine decarboxylase
OLs	Oligodendrocytes
OPCs	Précurseurs oligodendrocytaires
PDGF	Platelet-derived neurotrophic factor
PDGFR $\alpha$	Platelet-derived neurotrophic factor receptor $\alpha$
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PKA	Protéine kinase A
PLP	Myelin proteolipid protein
PLP1	Myelin proteolipid protein 1
POMC	Pro-opiomelanocortin
Ptc	Patched
PTP1B	Protein tyrosine phosphatase 1
PTX	Toxine pertussique
PVN	Paraventricular hypothalamic nucleus
PVT	Paraventricular thalamic nucleus
PYY	Peptide YY
RCPGs	Récepteurs couplés aux protéines G
RE	Réticulum endoplasmique
RGLs	Cellules gliales radiales de type 1
RIP	Rat insulin-promoter
RND	Résistance Nodulation Division
ROS	Reactive oxygen species
SCAP	SREBP cleavage-activating protein
Scube 2	Signal peptide, cubulin domain, epidermal-growth-factor-like domain-containing protein 2
SF1	Steroidogenic factor 1
Shh	Sonic Hedgehog
smFISH	Single-molecule fluorescent <i>in situ</i> hybridization
Smo	Smoothened
SNP	Single nucleotide polymorphisms
SOCS3	Suppressor of cytokine signaling 3
SSD	Domaine senseur de stérol
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
SuFu	Suppressor of Fused
TACs	Cellules à amplification transitoire
TCPTP	T cell protein tyrosine phosphatase
TGF- $\beta$	Transforming growth factor- $\beta$
TLR4	Toll-like receptor 4
TM	Transmembranaire
TMD	Domaine transmembranaire

TMEV	Theiler's Murine Encephalomyelitis Virus
TNF- $\alpha$	Tumor necrosis factor $\alpha$
TSH	Thyroid stimulating hormone
UPR	Unfolded protein response
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VMH	Noyau hypothalamique ventromédial
ZSG	Zone sous-granulaire du gyrus denté de l'hippocampe
ZSV	Zone sous-ventriculaire des ventricules latéraux

## TABLE DES ILLUSTRATIONS

<b>Figure 1</b> : Diversité et fonctions des astrocytes dans le cerveau adulte.....	18
<b>Figure 2</b> : L'astrocyte, régulateur de l'activité synaptique.....	24
<b>Figure 3</b> : Les principales aires de neurogénèse dans le cerveau adulte de souris .....	33
<b>Figure 4</b> : Lignage oligodendrocytaire et formation de la gaine de myéline.....	39
<b>Figure 5</b> : Le rôle métabolique de l'oligodendrocyte.....	43
<b>Figure 6</b> : Propriétés morphogénétiques de la protéine Hedgehog au cours du développement.....	50
<b>Figure 7</b> : Maturation et transport des protéines Hedgehog .....	55
<b>Figure 8</b> : Structure de Patched, récepteur de la protéine Hedgehog.....	58
<b>Figure 9</b> : Modèle d'interaction du récepteur Patched et de son ligand Sonic Hedgehog .....	60
<b>Figure 10</b> : Structure de la protéine Smoothened .....	66
<b>Figure 11</b> : Modèles de répression de l'activité du récepteur Smoothened par la protéine Patched.....	68
<b>Figure 12</b> : La voie Hedgehog canonique chez les vertébrés.....	70
<b>Figure 13</b> : La régulation des facteurs de transcription Gli.....	73
<b>Figure 14</b> : Les voies Hedgehog non canoniques .....	79
<b>Figure 15</b> : Les fonctions de la voie Sonic Hedgehog dans le cerveau de rongeur postnatal et adulte .....	84
<b>Figure 16</b> : Altérations de la signalisation Hedgehog dans les cancers .....	90
<b>Figure 17</b> : Structures chimiques de divers antagonistes (Vismodegib, Sonidegib, Itraconazole, Cyclopamine, SANT-1, MRT-92) et agonistes (SAG, Purmorphamine, GSA-10) du récepteur Smoothened .....	101
<b>Figure 18</b> : Stratégies pour moduler l'activité de la voie de signalisation Hedgehog.....	104
<b>Figure 19</b> : Circuits hypothalamiques régulant l'appétit et l'homéostasie énergétique .....	115
<b>Figure 20</b> : Détails de la cartographie des composantes de la voie Shh chez le rongeur adulte .....	241
<b>Figure 21</b> : Les fonctions potentielles de la protéine Sonic Hedgehog oligodendrocytaire dans le cerveau de rongeur postnatal et adulte .....	249
<b>Figure 22</b> : Voies de signalisation impliquées dans l'entrée de glucose dépendante et indépendante de l'insuline.....	253

**Figure 23 :** Modèle putatif du rôle de la voie de signalisation Hedgehog astrocytaire dans le contrôle du métabolisme du glucose et des lipides périphériques ..... 256

# TABLE DES MATIERES

<b>INTRODUCTION</b> .....	15
<b>I. CELLULES GLIALES CHEZ L'ADULTE</b> .....	16
<b>1. L'astrocyte</b> .....	16
1.1 Hétérogénéité des astrocytes .....	16
1.1.1 <i>Diversité des profils morphologiques et moléculaires</i> .....	16
1.1.2 <i>Origine de l'hétérogénéité astrocytaire</i> .....	20
1.2 Les fonctions astrocytaires .....	20
1.2.1 <i>Support du neurone</i> .....	21
1.2.2 <i>L'astrocyte, senseur des signaux métaboliques</i> .....	25
1.3 Réponse astrocytaire en situations pathologiques .....	26
1.3.1 <i>Les astrocytes réactifs</i> .....	27
1.3.2 <i>Maladies neurodégénératives</i> .....	28
1.4 Cellules souches .....	30
<b>2. L'oligodendrocyte</b> .....	34
2.1 Le lignage oligodendrocytaire .....	34
2.2 La myélinisation des axones .....	36
2.2.1 <i>Formation de la gaine de myéline</i> .....	36
2.2.2 <i>Facteurs modulant la myélinisation</i> .....	38
2.2.3 <i>Plasticité de la myéline</i> .....	41
2.3 Support trophique du neurone .....	41
2.4 Oligodendrocytes et pathologies .....	42
2.4.1 <i>Atteintes de la myéline</i> .....	42
2.4.2 <i>Le processus de remyélinisation et les approches thérapeutiques</i> .....	45
2.4.3 <i>Autres pathologies</i> .....	47
<b>II. LA VOIE DE SIGNALISATION HEDGEHOG</b> .....	48
<b>1. Les principaux acteurs de la voie Hedgehog</b> .....	48
1.1 Les protéines Hedgehog .....	48
1.1.1 <i>Fonction morphogénétique</i> .....	48
1.1.2 <i>Synthèse et maturation</i> .....	49
1.1.3 <i>Transport</i> .....	51
1.2 Le récepteur Patched .....	56
1.2.1 <i>Structure</i> .....	56

1.2.2 Récepteur de la protéine Hh .....	59
1.2.3 Les co-récepteurs de la protéine Hh.....	61
1.2.4 Hedgehog interacting protein.....	63
1.3 Smoothened, activateur clé des étapes cytoplasmiques .....	64
<b>2. Transduction du signal.....</b>	<b>69</b>
2.1 Voie canonique.....	69
2.1.1 Définition.....	69
2.1.2 Les effecteurs intracellulaires .....	72
2.1.3 Importance du cil primaire chez les vertébrés .....	74
2.2 Voies non canoniques.....	75
2.2.1 Chez l'embryon.....	75
2.2.2 Chez l'adulte .....	76
<b>3. La voie de signalisation Hh est présente dans le cerveau de rongeurs .....</b>	<b>80</b>
3.1 Les rôles de la voie Hh dans le cerveau de rongeur postnatal et adulte.....	80
3.1.1 Etablissement des communications synaptiques dans le cortex.....	80
3.1.2 Régulation des cellules souches neurales adultes.....	80
3.1.3 Spécification des astrocytes du cervelet.....	82
3.1.4 Lignage oligodendrocytaire.....	83
3.2 Les pathologies associées à la voie Hedgehog .....	85
3.2.1 Malformations congénitales.....	85
3.2.2 Ciliopathies.....	86
3.2.3 Cancers.....	87
3.2.4 Maladies neurodégénératives.....	91
3.2.5 Réparation de la myéline.....	92
3.2.6 Lésions aiguës.....	93
3.3 Pharmacologie de la voie Hh .....	94
3.3.1 Les antagonistes du récepteur Smo.....	94
3.3.2 Les agonistes du récepteur Smo.....	98
3.4.3 Autres modulateurs pharmacologiques de la voie Hh .....	101
<b>III.MAINTIEN DE L'HOMÉOSTASIE MÉTABOLIQUE PAR L'HYPOTHALAMUS .....</b>	<b>105</b>
<b>1. Circuits neuronaux clés.....</b>	<b>105</b>
1.1 Le noyau arqué.....	105
1.1.1 Les neurones POMC.....	106
1.1.2 Les neurones AgRP/NPY.....	106
1.1.3 Autres populations neuronales .....	107

1.2 Les partenaires des effets métaboliques du noyau arqué.....	108
1.2.1 <i>Autres noyaux hypothalamiques</i> .....	108
1.2.2 <i>Le nerf vague</i> .....	109
<b>2. Les signaux métaboliques périphériques</b> .....	110
2.1 Principales hormones dans la régulation du métabolisme.....	110
2.1.1 <i>L'insuline</i> .....	110
2.1.2 <i>La leptine</i> .....	112
2.1.3 <i>Les hormones du système digestif</i> .....	113
2.2 Détection des signaux périphériques.....	115
2.2.1 <i>L'éminence médiane</i> .....	116
2.2.2 <i>Caractéristiques générales des tanycytes</i> .....	116
2.2.3 <i>Point d'accès vers les neurones du noyau arqué</i> .....	116
2.2.4 <i>Cellules souches putatives de l'hypothalamus</i> .....	117
<b>3. L'obésité : un exemple de dysfonctionnement métabolique</b> .....	118
3.1 Causes de l'obésité.....	118
3.2 Conséquences d'un régime riche en graisses.....	119
3.3 Inflammation et modification de la vascularisation.....	121
 <b>IV. Présentation du sujet de thèse</b> .....	 123
 <b>RESULTATS EXPERIMENTAUX</b> .....	 124
Article 1, Daynac <i>et al</i> , Stem Cell Reports, 2016.....	125
Article 2, Tirou <i>et al</i> , PLoS One, 2020.....	153
Article 3, Tirou <i>et al</i> , soumission prévue à Molecular Metabolism.....	173
 <b>DISCUSSION</b> .....	 239
 <b>I. La voie Shh, composante de l'environnement des cellules souches neurales</b> .....	 240
<b>1. Actions de la voie Shh sur les différentes populations de la ZSV</b> .....	240
1.1 Régulation des CSNs.....	242
1.2 Modulation des TACs et neuroblastes.....	243
<b>2. Modulation pharmacologique des cellules de la ZSV</b> .....	244
 <b>II. L'OL mature, une nouvelle source de protéine Shh chez l'adulte</b> .....	 245
<b>1. Les sources de protéine Shh dans le cerveau de rongeur adulte</b> .....	245
<b>2. Fonctions potentielles de la protéine Shh oligodendrocytaire</b> .....	247

2.1 Régulation des fonctions oligodendrocytaires .....	247
2.2 Régulation des niches de neurogénèse .....	248
2.3 Modulation de l'activité astrocytaire.....	248
<b>III. Implication de la voie Shh dans le contrôle de l'homéostasie énergétique .....</b>	<b>250</b>
<b>1. La voie Hedgehog dans l'hypothalamus adulte .....</b>	<b>250</b>
<b>2. La voie Hedgehog, modulateur des fonctions métaboliques .....</b>	<b>251</b>
<b>IV. Conclusions et perspectives .....</b>	<b>257</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>259</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>307</b>

## **INTRODUCTION**

## I. CELLULES GLIALES CHEZ L'ADULTE

### 1. L'astrocyte

Les astrocytes constituent une des populations gliales les plus abondantes au sein du cerveau adulte de mammifère. Initialement définis comme des cellules non neuronales en forme d'étoile, ils présentent de nombreux prolongements formant une véritable arborisation autour de leurs corps cellulaires. Ces cellules macrogliales sont d'importants acteurs responsables de l'homéostasie du milieu et du bon fonctionnement des neurones. Pour cela, les astrocytes interagissent avec de nombreuses cellules différentes, dans un environnement évoluant constamment. Ces cellules gliales ont ainsi acquis des propriétés spécifiques au maintien de l'environnement cellulaire des différentes régions du cerveau, conduisant à une très grande hétérogénéité de cette population (Miller, 2018).

#### 1.1 Hétérogénéité des astrocytes

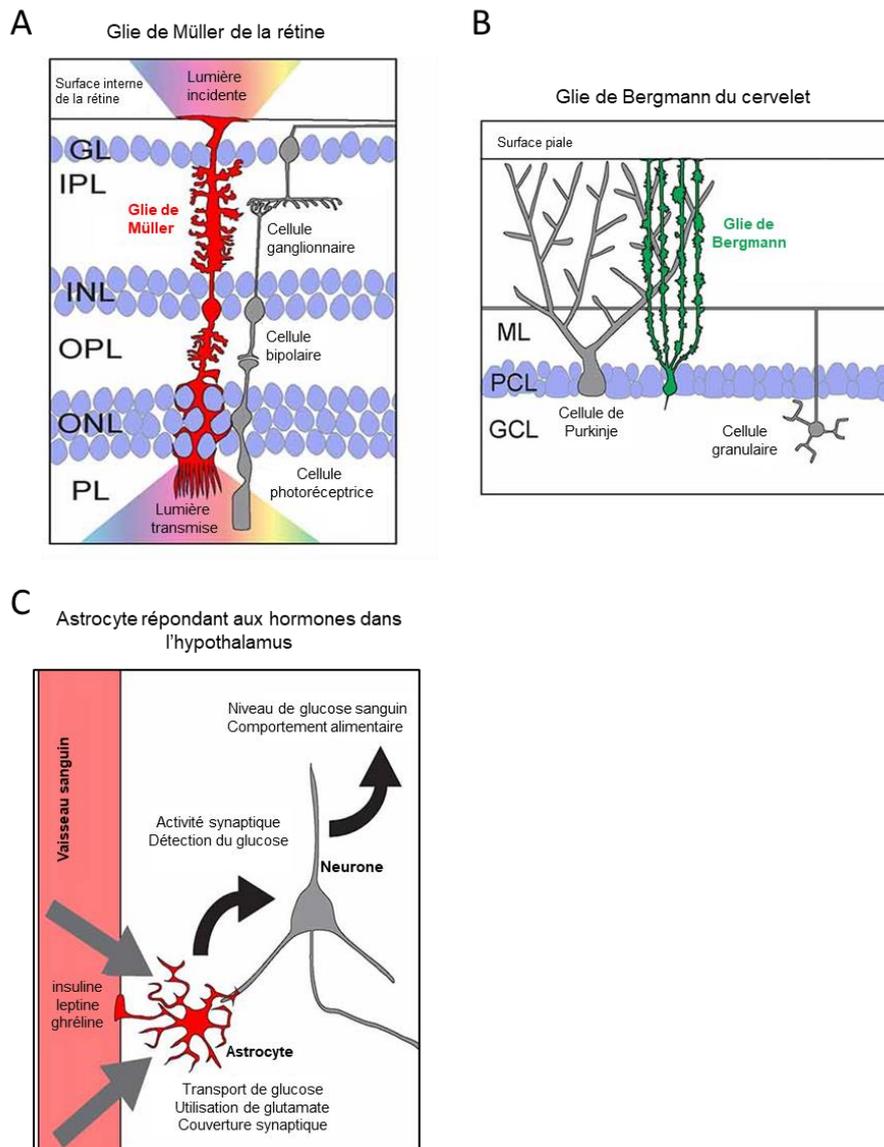
Le terme « hétérogénéité » est utilisé pour décrire un type cellulaire capable de présenter plusieurs profils morphologiques et moléculaires associés à différentes fonctions (Foerster et al., 2019). Selon les critères considérés (morphologie, expression de marqueurs), différentes classifications ont été proposées pour catégoriser les astrocytes.

##### *1.1.1 Diversité des profils morphologiques et moléculaires*

La première classification des astrocytes, qui a longtemps été la seule, consistait en deux groupes grossièrement définis selon des critères morphologiques, les astrocytes protoplasmiques et fibreux. Les astrocytes protoplasmiques, localisés dans la substance grise, présentent de nombreuses ramifications fines leur donnant un aspect touffu caractéristique. Leurs prolongements enveloppent les synapses neuronales et contactent également les vaisseaux. Moins ramifiés, les astrocytes fibreux sont associés aux faisceaux d'axones myélinisés tels que ceux présents dans le corps calleux (Matias et al., 2019). De nombreuses études ont permis de mettre en évidence plusieurs autres classes d'astrocytes. Cette diversité morphologique des astrocytes

reflète le circuit neuronal avoisinant et démontre une vraie adaptation de ces cellules gliales pour maintenir l'homéostasie du milieu nécessaire à l'activité neuronale (**Figure 1A-C**). Dans la rétine, la glie de Müller est un exemple illustrant cette adaptation morphologique. Elle est constituée de cellules dont le corps cellulaire se situe dans la couche nucléaire tandis que leurs prolongements s'étendent radialement, traversant toutes les couches de la rétine (**Figure 1A**). Cette morphologie particulière permet aux astrocytes de la glie de Müller d'être capables de contacter tous les types cellulaires et axones présents dans chacune de ces couches. Ces cellules gliales sont également des éléments structuraux participant, par leurs contacts avec les vaisseaux, à l'intégrité de la barrière hématoencéphalique (BHE) au sein de la rétine (Derouiche et al., 2012; Vecino et al., 2016). Une autre population astrocytaire à la morphologie particulière, très loin de la forme étoilée classique des astrocytes, est la glie de Bergmann dans le cervelet (**Figure 1B**). Ces astrocytes, également polarisés radialement, présentent un corps cellulaire étroitement associé à celui des neurones de Purkinje. Ces cellules gliales possèdent une arborisation complexe de prolongements s'entremêlant aux nombreuses projections neuronales de la couche moléculaire du cervelet, afin d'atteindre et d'envelopper les synapses (Farmer and Murai, 2017).

De nombreux travaux basés sur l'étude du profil d'expression d'astrocytes isolés à partir de différentes régions du cerveau de souris et d'Homme, mettent en avant l'hétérogénéité moléculaire de ces cellules gliales parfois au sein de la même région (Chai et al., 2017; Malik et al., 2014; Morel et al., 2017; Zhang et al., 2016). De façon similaire à la diversité morphologique, ces différences de profils moléculaires illustrent la spécialisation des propriétés astrocytaires pour assurer les besoins des neurones de différentes régions. Ainsi, la comparaison d'astrocytes de différentes régions, dont le cortex et l'hippocampe, a mis en évidence une variation des molécules synaptogéniques sécrétées par les astrocytes de chaque zone (Buosi et al., 2018). De même, la couverture des synapses par les prolongements astrocytaires est très variable selon les régions, allant de moins de 50% dans le cortex à près de la totalité des synapses recouvertes dans le cervelet (Lippman et al., 2008; Witcher et al., 2010).



**Figure 1 : Diversité et fonctions des astrocytes dans le cerveau adulte**

(A-C) Exemples de la diversité des astrocytes dans le cerveau de mammifère adulte. (A) La glie de Müller (rouge) est constituée d'astrocytes déployant des pieds astrocytaires s'accolant à la face interne de la rétine tandis que leurs corps cellulaires se trouvent dans la couche nucléaire interne (INL). Les prolongements de ces astrocytes traversent ainsi toutes les couches de la rétine. La glie de Müller facilite la transmission de la lumière de l'intérieur de la rétine (haut) jusqu'à la couche des photorécepteurs (PL). GL, couche granulaire; IPL, couche plexiforme interne; OPL, couche plexiforme externe; ONL, couche nucléaire externe. (B) Dans le cervelet, la glie de Bergmann (vert) se compose d'astrocytes étroitement associés aux cellules de Purkinje. Les corps cellulaires de ces astrocytes entourent ceux des cellules de Purkinje tandis que les prolongements astrocytaires enveloppent les synapses formées par les dendrites de ces neurones dans la couche moléculaire. ML, couche moléculaire; PCL, couche des cellules de Purkinje; GCL, couche des cellules granulaires. (C) Les astrocytes de l'hypothalamus (rouge) sont des régulateurs clés de la satiété et de l'homéostasie énergétique. Ces cellules répondent directement aux hormones périphériques (insuline, leptine, ghréline) en modulant le transport de glucose et l'activité synaptique des neurones hypothalamiques, d'après (Farmer and Murai, *Front. Cell. Neurosci.*, 2017).

Ce phénomène pourrait être associé à une implication plus ou moins importante des astrocytes à la modulation de l'activité synaptique selon les régions. Une autre analyse, par FACS (fluorescence-activated cell sorting), d'astrocytes de plusieurs régions du cerveau de souris de la lignée reportrice Aldh1l1-GFP (Aldehyde Dehydrogenase 1 Family Member L1, un marqueur astrocytaire) se base sur l'affinité de ces cellules pour plusieurs marqueurs membranaires (John Lin et al., 2017). Cette étude a permis d'identifier cinq sous-populations d'astrocytes présentant des profils moléculaires et fonctionnels distincts notamment dans la régulation de l'activité synaptique et le développement de tumeurs. Les auteurs mettent en avant le potentiel de ce type d'analyse dans l'étude de tumeurs pouvant impliquer des cellules gliales telles que le gliome.

Des travaux antérieurs utilisant moins de marqueurs démontraient déjà l'hétérogénéité des profils d'expression de canaux, transporteurs et récepteurs par les astrocytes d'une même région. Dans l'hippocampe mais également dans le striatum, les astrocytes présentent des différences d'expression du canal potassique Kir4.1 (inward-rectified potassium channel), de signalisation calcique et de couverture des neurones et synapses avec lesquels ils sont en contact (Chai et al., 2017). De même, dans le cortex, des études par immunomarquage ont permis d'identifier l'expression préférentielle de Kir4.1 et du transporteur GABAergique GAT3 dans les couches II/III et V. Tandis que la couche I exprime fortement l'AQP4 (aquaporine 4), la GFAP (glial fibrillary acidic protein) et la connexine 43 (Conti et al., 2004; Moroni et al., 2015; Zeisel et al., 2015) suggérant des différences de besoins des neurones au sein de chaque couche corticale. Enfin, dans la rétine, les cellules de la glie de Müller possèdent des propriétés adaptées à la fonction de la rétine telles que la régulation de la composition du fluide extracellulaire et la protection du système face au stress oxydatif ayant lieu au cours de la photoréception (Reichenbach and Bringmann, 2013).

Il est à noter que les modèles génétiques ciblant les astrocytes sont basés sur des marqueurs moléculaires exprimés dans la majorité des astrocytes, tels que GLAST (astrocyte-specific glutamate transporter), GFAP et Aldh1l1 (Khakh and Sofroniew, 2015).

### 1.1.2 Origine de l'hétérogénéité astrocytaire

Cette diversité des astrocytes pourrait refléter des origines embryonnaires différentes. Par exemple, dans le cortex, les astrocytes sont produits à partir des progéniteurs présents le long de la surface ventriculaire du cerveau antérieur en développement (Gao et al., 2014). Cependant, une sous-population d'astrocytes dérivant de cellules exprimant le protéoglycane NG2<sup>+</sup> a également été décrite (Zhu et al., 2008).

Le contexte environnemental entre également en compte. En effet, les astrocytes mettent en jeu un certain nombre de signalisations intercellulaires dont les voies FGF (fibroblast growth factor) et Notch, afin de maintenir leurs propriétés via, notamment, la régulation de leur profil d'expression génique et de leur morphologie (Hasel et al., 2017; Kang et al., 2014; Lin and Goldman, 2009; Magnusson et al., 2014). Dans un certain nombre de cas, des facteurs produits par les neurones influencent les cellules gliales. Dans le cervelet, des signaux émis par les cellules de Purkinje permettent à la glie de Bergmann de maintenir un profil d'expression unique (Farmer et al., 2016). De plus, des études *in vitro* d'astrocytes en présence de neurones rapportent une augmentation de l'expression de marqueurs astrocytaires tels que GLAST, GLT1 (glutamate transporter 1) et AQP4 indiquant que les neurones peuvent moduler la physiologie des astrocytes et intervenir dans leur profil d'expression génique (Hasel et al., 2017).

### 1.2 Les fonctions astrocytaires

Les astrocytes interagissent physiquement avec les neurones, leurs prolongements enveloppant le corps cellulaire neuronal et les synapses. Cette couverture astrocytaire est dynamique et peut être modifiée par l'activité neuronale, la présence de lésions ou un changement d'état physiologique tel que la faim (Bernardinelli et al., 2014; Genoud et al., 2006; Theodosis et al., 2008). Elle va permettre aux astrocytes de communiquer avec les neurones afin de moduler l'activité et la physiologie neuronale tout en leur apportant les substrats métaboliques nécessaires à leur intégrité (Dallérac et al., 2018).

### *1.2.1 Support du neurone*

#### *Modulation de l'activité synaptique*

Une des fonctions principales des astrocytes est la modulation de l'activité synaptique. Cette action se réaliserait au sein de « la synapse tripartite », structure impliquant le neurone pré-synaptique, le neurone post-synaptique et l'astrocyte (Allen and Eroglu, 2017; Araque et al., 1999). Les prolongements astrocytaires possèdent la machinerie moléculaire nécessaire à la régulation de la synapse. Des ARNm et des ribosomes ont été identifiés dans ces extensions astrocytaires suggérant une production de protéines directement au sein de ces structures, ce qui permettrait d'adapter rapidement l'action astrocytaire aux changements environnementaux (Sakers et al., 2017). Les astrocytes permettent, via leurs prolongements pérисynaptiques, de retirer les neurotransmetteurs (NT) présents dans l'espace interstitiel. Cette action est importante pour empêcher l'accumulation de NT dans la fente synaptique, qui pourrait entraîner une toxicité pour les neurones et l'activation non spécifique de synapses voisines (Murphy-Royal et al., 2017) **(Figure 2A-B)**.

Grâce aux nombreux canaux qu'ils expriment, les astrocytes assurent un rôle de tampon du milieu extracellulaire. Ils contrôlent l'homéostasie ionique au niveau de la synapse, propriété importante pour le maintien de la transmission synaptique (Djukic et al., 2007; Sibille et al., 2014). Le canal principal des astrocytes pour moduler le niveau des ions potassium est le canal Kir4.1, crucial pour l'homéostasie des ions  $K^+$  dans l'espace extracellulaire (Farmer and Murai, 2017).

#### *Médiateur de la nutrition*

Les neurones sont les principaux consommateurs de glucose dans le cerveau (Attwell and Laughlin, 2001; Harris et al., 2012). Le glucose, apporté par les vaisseaux sanguins, est récupéré principalement par des transporteurs de glucose (GLUT) dont GLUT1 et GLUT3, exprimés par les cellules gliales et les neurones, respectivement (Mergenthaler et al., 2013). La large couverture astrocytaire des vaisseaux sanguins dans le cerveau suggère que ces cellules gliales possèdent un accès facilité au glucose périphérique. Les neurones accèderaient alors au glucose par l'intermédiaire des astrocytes avec lesquels ils sont en contact. Dans le cadre de régions éloignées, l'apport de glucose ferait intervenir le réseau interconnecté d'astrocytes. Les échanges au

sein de ce réseau se font par le biais des jonctions communicantes (gap junctions), structures composées de connexines, des protéines membranaires qui, en s'oligomérisant par six, forment des hémicanaux. L'association de deux hémicanaux permet de former une « gap junction », perméable à la diffusion d'ions et de molécules de taille réduite (Abrams and Scherer, 2012). Les jonctions communicantes interviennent ainsi dans le transfert du glucose et de ses métabolites, des vaisseaux sanguins aux neurones, notamment dans l'hypothalamus (Clasadonte et al., 2017; Rouach et al., 2008).

Les neurones et les astrocytes sont capables de métaboliser le glucose en pyruvate et ATP via la glycolyse et de l'utiliser pour assurer leurs propres fonctions. Les astrocytes ont également la possibilité de transformer le glucose en glycogène et de le stocker (Mergenthaler et al., 2013). Un modèle de « navette lactate astrocyte-neurone » propose une transformation du glucose par l'astrocyte puis un transfert du lactate obtenu au neurone. Cette action serait dépendante de l'activité neuronale. En effet, dans ce modèle, le glutamate libéré par les neurones actifs serait récupéré par les astrocytes et conduirait à une augmentation de la glycolyse dans ces cellules gliales. Le lactate produit lors de cette glycolyse serait alors exporté, via des transporteurs monocarboxylates, aux neurones qui l'utiliseraient comme source énergétique (Alberini et al., 2018; Pellerin and Magistretti, 2012) (**Figure 2B**).

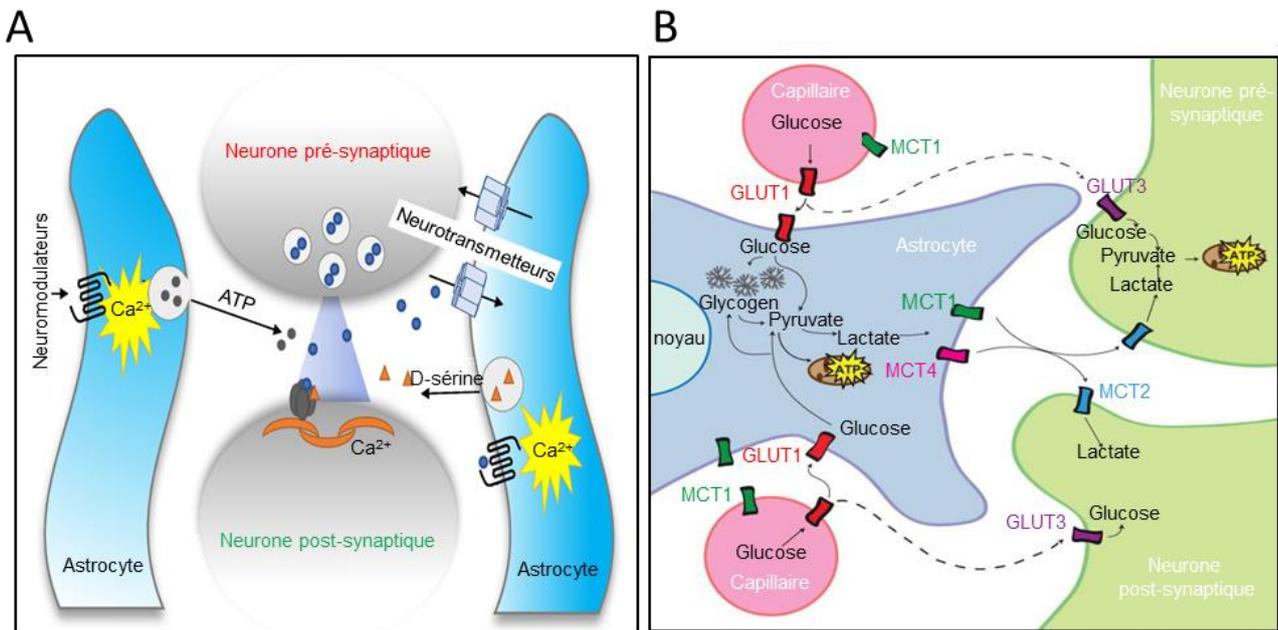
### Sécrétion de gliotransmetteurs

La présence de récepteurs métabotropiques et ionotropiques de NT sur les astrocytes pérисynaptiques permet à ces cellules de détecter l'activité des circuits synaptiques locaux et ainsi d'y répondre, notamment en activant des courants calciques (Agulhon et al., 2008; Shigetomi et al., 2013). Des mesures de niveaux de calcium au sein des astrocytes ont ainsi permis d'identifier plusieurs NT ou neuromodulateurs auxquels ces cellules sont capables de répondre dont le glutamate, l'acétylcholine, l'ATP, le GABA ( $\gamma$ -aminobutyric acid) et les endocannabinoïdes (Martin-Fernandez et al., 2017; Robin et al., 2018). L'induction de courants calciques au sein de l'astrocyte, par l'activité synaptique, peut entraîner la sécrétion de facteurs neuroactifs nommés gliotransmetteurs qui vont agir au niveau de la synapse pour contrôler la transmission synaptique et moduler la plasticité neuronale (Araque et al., 2014). Ainsi, dans l'hippocampe, la libération de glutamate par les astrocytes

au niveau du neurone pré-synaptique permet d'amplifier l'activité des synapses glutamatergiques (Durkee and Araque, 2019). Dans l'hypothalamus, Gordon et al. (Gordon et al., 2009, 2005) montrent que l'activation des neurones du PVN (paraventricular hypothalamic nucleus), par le glutamate, induit la libération d'ATP par les astrocytes conduisant à une augmentation de l'efficacité synaptique au sein des synapses glutamatergiques, formant ainsi une boucle d'amplification du signal. Il est à noter qu'un astrocyte peut libérer plusieurs gliotransmetteurs ayant des effets avec des dynamiques temporelles variables et dépendants de l'environnement neuronal. Ainsi les astrocytes ne font pas que suivre l'activité synaptique, ils l'intègrent et y répondent de façon variée et plastique. Tous les NT ne présentent pas la même efficacité à induire la sécrétion de gliotransmetteurs (**Figure 2A**). Le mécanisme de libération de ces gliotransmetteurs est débattu. Un des modes de sécrétion proposé passe par des vésicules impliquant les protéines SNARE (Fiacco and McCarthy, 2018; Hamilton and Attwell, 2010; Savtchouk and Volterra, 2018; Schwarz et al., 2017).

### Physiologie de la synapse

En plus de moduler l'activité synaptique, les astrocytes interviennent également dans la formation de nouvelles synapses. Ces cellules gliales sécrètent divers facteurs importants pour la formation de la structure synaptique et sa maturation. Un des premiers facteurs astrocytaires identifiés régulant les synapses glutamatergiques est le cholestérol. La libération de cette molécule complexée à des lipoprotéines par les astrocytes conduit à une augmentation du nombre de vésicules dans la terminaison pré-synaptique amplifiant ainsi sa fonctionnalité (Goritz et al., 2005; Mauch et al., 2001). Les astrocytes interviennent également dans la régulation de l'élimination des synapses. En effet, une activité phagocytaire de ces cellules gliales a été rapportée au cours du développement pour éliminer les synapses en excès (Chung et al., 2013). Elles peuvent également entraîner indirectement la phagocytose de synapse via la sécrétion de TGF- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ ). Ce facteur permet l'augmentation de l'expression de la protéine du complément C1q dans les neurones, conduisant à une labellisation des synapses qui sont alors reconnues et phagocytées par la microglie (Bialas and Stevens, 2013; Schafer et al., 2012).



**Figure 2 : L'astrocyte, régulateur de l'activité synaptique**

(A) Les astrocytes sont des composants structuraux et fonctionnels des synapses. A l'aide de leurs prolongements périssynaptiques, ces cellules sont capables de détecter l'activité synaptique et d'y répondre par des courants intracellulaires de calcium et par la libération de molécules neuroactives (gliotransmetteurs) pouvant agir sur la synapse, d'après (Allen and Eroglu, *Neuron*, 2017). (B) Représentation de la « navette lactate astrocyte-neurone ». Dans ce modèle, les capillaires sanguins achemineraient le glucose jusqu'au cerveau où il serait récupéré par les astrocytes via des transporteurs de glucose tels que GLUT1. Dans l'astrocyte, le glucose peut être stocké sous forme de glycogène ou être glycolysé pour donner du pyruvate. Ce dernier peut être transféré dans la mitochondrie ou être converti en lactate qui sera alors libéré dans l'espace extracellulaire via les transporteurs monocarboxylate 1 ou 4 (MCT1/4). Les neurones peuvent récupérer ce lactate par leur transporteur MCT2. Dans les neurones, le lactate est reconverti en pyruvate et transporté dans la mitochondrie pour produire de l'ATP. Le glucose provenant des capillaires peut également entrer directement dans les neurones qui possèdent des transporteurs de glucose comme GLUT3, d'après (Alberini et al, *Glia*, 2018).

### 1.2.2 L'astrocyte, senseur des signaux métaboliques

De par leur relation privilégiée avec les vaisseaux sanguins, les astrocytes participent à la BHE. En effet, les astrocytes couvrent une grande partie de la vascularisation cérébrale et sont capables de libérer des facteurs régulant le flux sanguin, notamment pour augmenter l'apport de glucose (Attwell et al., 2010). Ces cellules gliales sont donc directement en contact avec les molécules provenant de la périphérie dont le glucose et les hormones impliquées dans l'homéostasie énergétique (Kacem et al., 1998; Sofroniew and Vinters, 2010).

La régulation de l'entrée de glucose, source d'énergie pour l'activité neuronale, repose sur la présence de transporteurs de glucose et de récepteur à l'insuline, hormone assurant un rôle crucial dans la réponse au glucose (García-Cáceres et al., 2019). Les astrocytes expriment le transporteur au glucose GLUT1, mais également le récepteur à l'insuline (IR). L'importance des astrocytes dans l'action de l'insuline au sein du cerveau a été mise en avant par Garcia-Cáceres et al. (García-Cáceres et al., 2016) à l'aide de modèles de délétion du IR dans les cellules astrocytaires (GLAST<sup>+</sup> ou GFAP<sup>+</sup>). Dans cette étude, les auteurs ont d'abord démontré la spécificité de l'ablation astrocytaire du IR en rapportant une absence d'activation de la voie de l'insuline dans les astrocytes tandis que l'activation est maintenue dans les tissus périphériques cibles (tissus adipeux, muscle, foie). Cette étude démontre ainsi que les effets observés dans leurs modèles ont une origine cérébrale. La délétion du IR dans les astrocytes conduit à une diminution de l'entrée de glucose au sein de ces cellules *in vitro*. Chez l'animal, cet effet est associé à une perturbation de la réponse des neurones POMC (pro-opiomélanocortin) à l'augmentation du niveau de glucose sanguin. Cette ablation entraîne également des altérations morphologiques des astrocytes dont une modification de la couverture synaptique pouvant expliquer la réduction de la réponse des neurones POMC. De plus, les niveaux de glucose et d'insuline dans le liquide céphalorachidien des souris délétées sont inférieurs à ceux des souris contrôles pouvant traduire une diminution de l'entrée de ces molécules dans le cerveau. L'absence de réponse des neurones POMC pourrait donc être due à une incapacité de ces neurones à détecter les modifications du niveau de glucose. Les astrocytes régulent ainsi l'entrée de glucose via la BHE et modulent son transport à l'aide des jonctions communicantes, du transporteur

au glucose GLUT1 mais également du récepteur à l'insuline (Allard et al., 2014; Chari et al., 2011; Fuente-Martín et al., 2016; García-Cáceres et al., 2016; J. G. Kim et al., 2014).

Au sein des régions impliquées dans le contrôle de l'homéostasie énergétique, à savoir l'hypothalamus et le tronc cérébral, les astrocytes expriment les récepteurs pour diverses hormones provenant de la périphérie. Des études *in vitro* démontrent l'induction de courants calciques dans les astrocytes en culture suite à l'apport de ghréline, hormone produite par l'estomac et stimulant la prise alimentaire (Jiang et al., 2014; Wren et al., 2001). Ces cellules gliales sont également capables de répondre au GLP1 (glucagon-like peptide 1), hormone favorisant la satiété et libérée par le tube digestif, même si des concentrations importantes sont nécessaires (Reiner et al., 2016; Tian and Jin, 2016). Enfin, les astrocytes expriment le récepteur à la leptine (ObR), hormone dont l'apport entraîne une réponse calcique dans ces cellules (Hsuchou et al., 2009).

Ces hormones périphériques informent les astrocytes de l'état métabolique de l'organisme, leur permettant d'adapter en conséquence la modulation des neurones. Les astrocytes sont capables de modifier la prise alimentaire en agissant sur l'activité neuronale des cellules à proximité. Un exemple a été rapporté dans le MBH (mediobasal hypothalamic nucleus) où la modification de l'activité électrique des neurones AgRP (agouti-related protein) par les astrocytes conduit à la libération d'adénosine. L'activation des récepteurs adénosine qui s'ensuit, permet de modifier les circuits neuronaux impliqués dans la réponse à la leptine et à la ghréline, hormones modulant la prise alimentaire (Yang et al., 2015). De plus, la délétion génétique des récepteurs ObR ou IR dans les cellules GFAP positives, potentiellement astrocytaires, conduit à une diminution de la capacité de la leptine et du glucose, respectivement, à bloquer la prise alimentaire (García-Cáceres et al., 2016; J. G. Kim et al., 2014).

### 1.3 Réponse astrocytaire en situations pathologiques

Les astrocytes sont impliqués dans un grand nombre de maladies neurologiques dont l'épilepsie, les tumeurs cérébrales, le retard mental et la dégénérescence neuronale (Cabezas et al., 2014; John Lin et al., 2017; Molofsky et al., 2012; Ohno et al., 2014). Les diverses sous-populations astrocytaires répondent différemment

aux stimulations neuronales : certaines deviennent hypertrophiques, réactives ou sénescents tandis que d'autres prolifèrent. Les astrocytes répondent également à leur environnement en libérant des molécules pro- ou anti-inflammatoires.

### *1.3.1 Les astrocytes réactifs*

En situation pathologique, les astrocytes présentent des modifications morphologiques et moléculaires traduisant leur passage dans un état réactif. Ces changements vont dépendre de la région touchée et du type de lésion (Escartin et al., 2019). Bien que la réactivité des astrocytes soit une réponse secondaire à une pathologie ou une lésion, ces cellules seraient capables de moduler la progression de l'état pathologique. Une des caractéristiques principales des astrocytes réactifs est la surexpression de protéines associées aux filaments intermédiaires telles que la GFAP.

Les astrocytes réactifs peuvent être classés en deux catégories : les astrocytes produisant une « cicatrice » et les astrocytes hypertrophiques (Khakh and Sofroniew, 2015). En réponse à une lésion focale ou une inflammation, les astrocytes réactifs migrent et prolifèrent au niveau de la lésion pour former une barrière, « une cicatrice », permettant de séparer la région lésée du tissu sain adjacent (Burda and Sofroniew, 2014). A l'inverse, les astrocytes réactifs hypertrophiques sont présents principalement dans le cas de lésions diffuses. Ils ne sont pas prolifératifs, restent dans le même emplacement et gardent les mêmes connexions avec les cellules adjacentes (neurones, oligodendrocytes). Ces astrocytes présentent des modifications structurales et moléculaires dont les fonctionnalités sont encore indéterminées (Sofroniew, 2009; Sofroniew and Vinters, 2010). Des études récentes montrent qu'un faible nombre d'astrocytes réactifs sont prolifératifs et que cette propriété requiert un signal externe d'où la proximité de ces cellules avec les vaisseaux sanguins (Bardehle et al., 2013; Sirko et al., 2013; Wanner et al., 2013).

Une autre catégorisation, proposée par Liddel et al. (Liddel et al., 2017), est basée sur l'étude des transcriptomes d'astrocytes réactifs et propose l'existence de deux populations d'astrocytes réactifs dans le

cerveau adulte, les astrocytes A1 et A2. Les astrocytes A1 peuvent dégrader les neurones et les oligodendrocytes, et ainsi accentuer le phénotype pathologique. La présence d'astrocytes A1 a été suggérée dans de nombreuses pathologies neurodégénératives. Ces astrocytes A1 ont été montrés comme toxiques pour les neurones et les oligodendrocytes en raison de la libération d'un facteur encore non identifié. A l'inverse, les astrocytes A2 favorisent la survie des neurones en augmentant l'expression de gènes qui codent pour des facteurs neurotrophiques. L'activation de ces deux groupes d'astrocytes réactifs résulte de signaux émis par la microglie lors de pathologies.

Ces différentes classifications mettent en avant l'hétérogénéité des astrocytes même dans leur réponse à un élément nocif suggérant une possible adaptation de ces cellules aux différents types de situations pathologiques.

### *1.3.2 Maladies neurodégénératives*

La maladie d'Alzheimer est la cause principale de démence et touche particulièrement les personnes âgées. Cette pathologie se caractérise par la présence d'agrégats de peptides amyloïdes  $\beta$  (plaques amyloïdes) et par une dégénérescence neurofibrillaire, conduisant à la dégradation des synapses et à la perte de neurones (Lane et al., 2018). Dans cette maladie, les astrocytes sont touchés avant même l'apparition de mort neuronale. En effet, une atrophie de ces cellules gliales a été rapportée dans les étapes précoces de la maladie. Cette modification morphologique pourrait conduire à une perte de la couverture synaptique et vasculaire par les astrocytes et induire un dysfonctionnement métabolique et fonctionnel des synapses (pour revue, (Matias et al., 2019). Les astrocytes sont des cibles pour les oligomères d'amyloïde  $\beta$ . L'accumulation d'oligomères entraîne l'activation de ces cellules gliales et altère leur capacité à protéger les neurones (Diniz et al., 2017; Dossi et al., 2018). Dans les phases tardives de la pathologie, une hypertrophie des astrocytes a été décrite et pourrait contribuer à l'inflammation neuronale et à l'altération synaptique observées à ces stades (Ceyzériat et al., 2018; Orre et al., 2014).

La maladie de Parkinson touche également plus particulièrement les personnes âgées. Elle est définie par une perte de neurones dopaminergiques dans la substantia nigra pars compacta, associée à des troubles majeurs des fonctions motrices. De plus, les neurones présentent une accumulation d' $\alpha$ -synucléine dont le lien avec l'altération neuronale n'a pas encore été identifié (Gazerani, 2019). Dans la maladie de Parkinson, des astrocytes réactifs présentant des agrégats d' $\alpha$ -synucléine ont été décrits dans diverses régions du cerveau de patients. Cette large distribution pourrait suggérer une capacité des astrocytes à internaliser ce peptide libéré par les terminaisons axonales. L'accumulation d' $\alpha$ -synucléine dans les astrocytes conduit à leur hypertrophie et à des changements majeurs de leur profil d'expression génique. De plus, ces astrocytes libèrent des molécules pro-inflammatoires qui pourraient accentuer la perte des neurones dopaminergiques observée dans la pathologie (Booth et al., 2017; Chinta et al., 2018). L'ablation de ces astrocytes conduit à une amélioration des fonctions motrices et de la survie neuronale (Chinta et al., 2018). D'autre part, une collaboration des astrocytes avec la microglie a été mise en évidence par Yun et al. (Yun et al., 2018). Dans cette étude, les auteurs montrent qu'une réduction de l'inflammation microgliale permet de limiter la réactivité des astrocytes et ainsi de prévenir la perte de neurones dopaminergiques chez un modèle murin de maladie de Parkinson.

Dans la sclérose amyotrophique latérale, les neurones moteurs de la couche corticale V et de la moelle épinière dégénèrent progressivement conduisant à des altérations importantes des fonctions motrices (Haidet-Phillips and Maragakis, 2015). Les astrocytes présents dans la couche V du cortex présentent une diminution de l'expression du transporteur de glutamate GLT1 conduisant à une accumulation de glutamate dans le milieu extracellulaire. Cet excès de glutamate peut présenter une toxicité pour les neurones moteurs. Cette population astrocytaire subit également une réduction de l'expression de Kir4.1, qui pourrait amplifier les défauts d'hyperexcitabilité des neurones (Kaiser et al., 2006).

## 1.4 Cellules souches

Dans certaines régions du cerveau adulte sont retrouvées des cellules souches neurales (CSNs) qui participent à la production de nouvelles cellules (neurones, oligodendrocytes, astrocytes). Ces cellules présentent une morphologie semblable aux astrocytes et expriment certains marqueurs astrocytaires tels que GFAP et GLAST (Browd et al., 2006; Doetsch et al., 1999). Dans le cerveau de mammifère adulte, les CSNs sont présentes principalement dans la zone sous-ventriculaire des ventricules latéraux (ZSV) et la zone sous-granulaire du gyrus denté de l'hippocampe (ZSG) (pour revue, (Obernier and Alvarez-Buylla, 2019)). En plus de ces deux régions, la production de nouvelles cellules a été rapportée dans la zone ventriculaire de l'hypothalamus médiobasal. L'identité des CSNs de cette région est débattue. Cette neurogénèse potentielle serait influencée par des signaux environnementaux (hormones, nutriments) (Yoo and Blackshaw, 2018). Une neurogénèse très faible a également été proposée dans d'autres régions du cerveau telles que le striatum mais reste à démontrer (Qin et al., 2015).

Dans la ZSV, deux populations de CSNs ont été décrites : les CSNs quiescentes et activées (Albizu et al., 2010). Les CSNs quiescentes sont caractérisées par un faible taux de prolifération, une résistance aux drogues antimétaboliques et aux irradiations et par leur capacité à pouvoir régénérer la ZSV entièrement. À l'inverse, les CSNs activées se divisent activement et sont sensibles aux drogues antimétaboliques et à l'irradiation (Daynac et al., 2013; Doetsch et al., 1999; Pastrana et al., 2009). Un autre modèle de la neurogénèse au sein de la ZSV définit les CSNs quiescentes et activées sous la même appellation, cellules B1, et décrit des cellules astrocytaires prolifératives, les cellules B2, dont la fonction est indéterminée (Obernier and Alvarez-Buylla, 2019).

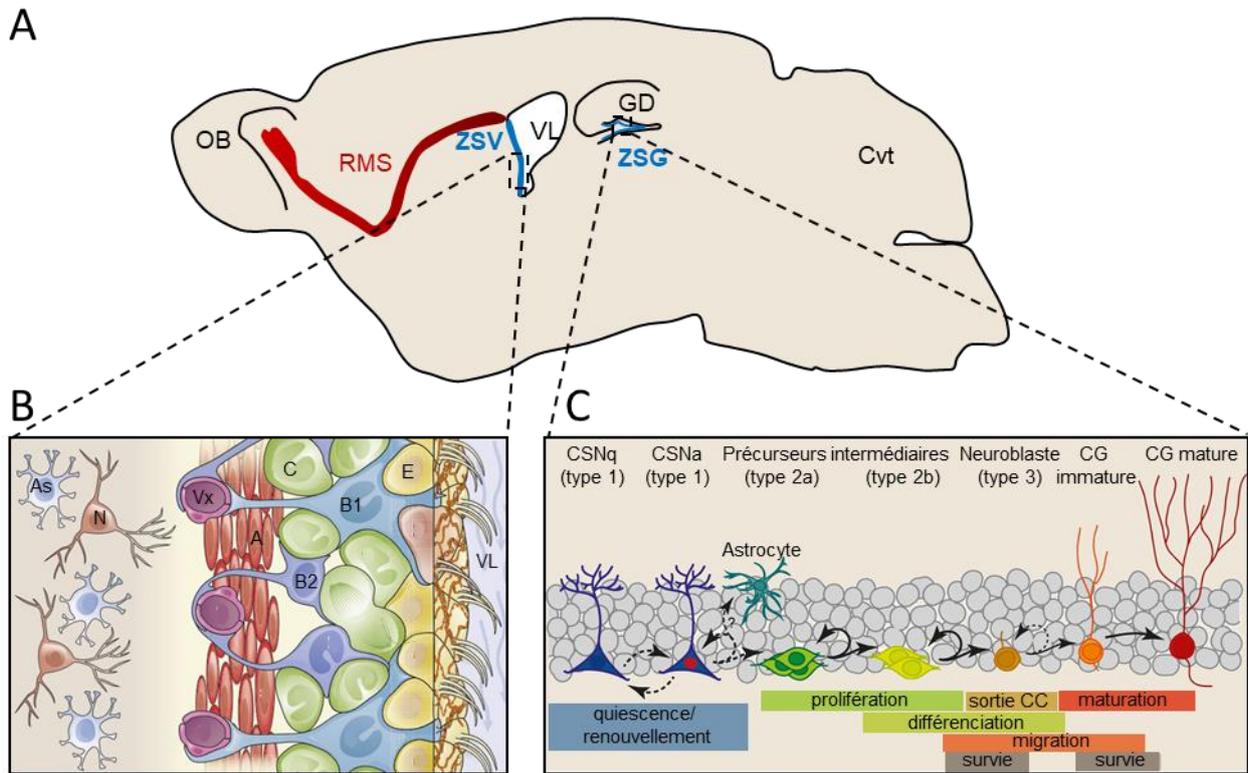
Le processus de neurogénèse au sein de la ZSV débute par l'entrée en prolifération des CSNs quiescentes qui deviennent alors activées. Les CSNs activées produisent ensuite des précurseurs, les cellules à amplification transitoire (TACs ou cellules C) qui effectuent trois à quatre divisions (Doetsch et al., 1999; Ponti et al., 2013). Les TACs se différencient ensuite en précurseurs neuronaux, nommés neuroblastes immatures, qui prolifèrent avant de générer des neuroblastes migrants. Les neuroblastes sont également nommés cellules A.

Ils forment des chaînes et migrent le long du flux de migration rostrale, voie bordée d'astrocytes conduisant jusqu'au bulbe olfactif (Lepousez et al., 2013). Ils se différencient en interneurons granulaires ou périglomérulaires qui vont s'intégrer dans les couches granulaires et glomérulaires du bulbe olfactif. Ces nouveaux neurones vont ainsi participer à la régulation de certaines fonctions olfactives (Grelat et al., 2018; Li et al., 2018; Lledo and Saghatelian, 2005) (**Figure 3A-B**). Selon leur position dorso-ventrale et antéro-postérieure le long de la ZSV, les CSNs peuvent générer jusqu'à dix sous-types différents d'interneurones intégrant le bulbe olfactif (Chaker et al., 2016). Il est à noter qu'une petite population de TACs produit également des précurseurs oligodendrocytaires qui migrent jusqu'au corps calleux ou dans le cortex (Obernier and Alvarez-Buylla, 2019).

Dans l'hippocampe, les CSNs sont présentes dans la ZSG, région localisée entre la couche de cellules granulaires et le hile. Dans cette région, les CSNs sont nommées cellules gliales radiales de type 1 (RGLs). Elles prolifèrent et génèrent des progéniteurs à amplification transitoire (cellules de type 2a et 2b). A leur tour, ces précurseurs se multiplient et produisent des neuroblastes (cellules de type 3) qui vont se différencier en neurones granulaires glutamatergiques excitateurs (Lugert et al., 2010; Suh et al., 2007; Urbach and Witte, 2019). Les neurones produits s'intègrent dans la couche de cellules granulaires du gyrus denté (**Figure 3A, C**). Ces nouveaux neurones excitateurs participent à certaines fonctions de l'hippocampe dans l'apprentissage et la mémoire (Ming and Song, 2011). Les RGLs sont également capables de produire quelques astrocytes mais pas d'oligodendrocytes (Encinas et al., 2011; Steiner et al., 2004). La neurogénèse hippocampique régule plusieurs fonctions telles que la mémoire à long terme et la modulation de l'humeur. Ainsi, des drogues agissant sur cette neurogénèse pourraient présenter un intérêt pour le traitement des déficits cognitifs et symptômes dépressifs.

Pour assurer une neurogénèse sur le long terme, un renouvellement de la réserve de CSNs doit avoir lieu. Ce phénomène repose sur le mode de division cellulaire des CSNs qui peut être symétrique ou asymétrique. Lors d'une division symétrique, deux cellules souches ou deux précurseurs vont être obtenus. La division asymétrique des CSNs conduit à l'obtention d'une cellule souche et d'un précurseur (Hormoz, 2013; Shahriyari and Komarova, 2013). Une séquence constituée de plusieurs divisions symétriques, permettant le renouvellement de la réserve de CSNs, suivies d'une division asymétrique, générant des progéniteurs, a été proposée

pour les CSNs de la ZSV (Obernier et al., 2018). Divers facteurs provenant des cellules voisines mais également de la périphérie sont capables de moduler la neurogénèse adulte. Les CSNs de ces régions sont en contact avec les vaisseaux sanguins à proximité (Palmer et al., 2000; Seri et al., 2004) et avec les ventricules pour les CSNs de la ZSV. Ces cellules sont donc en contact direct avec des molécules de la périphérie, ce qui est d'autant plus important dans le cadre de situations pathologiques.



**Figure 3 : Les principales aires de neurogène dans le cerveau adulte de souris**

(A) Schéma d'une coupe sagittale de cerveau de rongeur adulte centrée sur les deux principales niches de cellules souches neurales : la zone sous-ventriculaire des ventricules latéraux (ZSV) et la zone sous-granulaire du gyrus denté de l'hippocampe (ZSG). OB, bulbe olfactif; RMS, flux de migration rostrale; VL, ventricule latéral; GD, gyrus denté; Cvt, cervelet, d'après (Ruat et al, *Top. Med. Chem.*, 2015). (B) Schéma de l'organisation et de la composition de la ZSV des ventricules latéraux. Les cellules B1 (bleu clair) présentent des caractéristiques astrogliales et constituent les cellules souches neurales (CSNs) dans la ZSV. Elles donnent les cellules B2 (bleu foncé), qui présentent de nombreuses propriétés astrogliales similaires aux cellules B1 dont leur contact avec les vaisseaux sanguins (Vx, violet). Les cellules B1 produisent également des précurseurs à amplification transitoire (cellules C, vert) qui forment des neuroblastes (cellules A, rouge). Ces derniers migrent le long du flux de migration rostrale jusqu'au bulbe olfactif où ils se différencient en interneurones et s'intègrent dans les circuits neuronaux existants. Des cellules épendymales (cellules E, jaune) bordent le ventricule latéral. Des astrocytes (As) et des neurones (N) sont présents dans le parenchyme jouxtant la ZSV, d'après (Obernier et Alvarez-Buylla, *Development*, 2019). (C) Dans la ZSG, les cellules souches neurales quiescentes (CSNq) deviennent actives (CSNa) avant de générer des précurseurs intermédiaires (type 2a et 2b). Ces derniers prolifèrent et produisent des neuroblastes, qui sortent du cycle cellulaire (CC) et se différencient en cellules granulaires (CG), d'après (Urbach et Witte, *Front. Cell Dev. Biol.*, 2019).

## 2. L'oligodendrocyte

Chez l'adulte, les oligodendrocytes (OLs) sont présents dans la matière grise et blanche. Ce sont des éléments clés dans la conduction du message nerveux de par leurs différentes fonctions (formation de la myéline, apport de substrats énergétiques) (**Figure 4A-B**). Les OLs sont produits à partir de précurseurs oligodendrocytaires (OPCs) (Chapman and Hill, 2020). Les signaux induisant la formation d'OLs sont encore indéterminés dans le cerveau adulte même si l'influence de facteurs environnementaux a été proposée. A l'inverse des OPCs, les OLs matures ne sont pas des cellules prolifératives, ni migratoires (pour revue, (Foerster et al., 2019).

### 2.1 Le lignage oligodendrocytaire

Au cours du développement, trois vagues de formation d'OPCs ont lieu (Goldman and Kuypers, 2015). La première série est produite proche du stade embryonnaire E12.5 chez la souris, à partir de deux régions ventrales du cerveau antérieur, l'éminence ganglionnaire médiane et la future aire pré-optique (Tekki-Kessarar et al., 2001). Une fois formés, ces progéniteurs migrent tangentiellement et dorsalement pour coloniser le cerveau antérieur. Quelques jours après cette première vague, une deuxième émerge des éminences ganglionnaires latérale et dorsale. Les OPCs nouvellement formés se déplacent dorsalement vers le cortex, se répandant à travers le cerveau antérieur au cours de leur migration (Kessarar et al., 2006; Klämbt, 2009). Enfin, peu après la naissance, des OPCs sont produits par le cortex et migrent dans le corps calleux adjacent. Ils envahissent également le reste du cortex, où sont déjà présents des progéniteurs dérivés des vagues précédentes (Kessarar et al., 2006). Ainsi les précurseurs formés lors des deux premières vagues sont distribués dans tout le cerveau antérieur, tandis que ceux de la troisième série ont uniquement peuplé les régions dorsales. Dans le cerveau postnatal, la majorité des OPCs provenant de l'éminence ganglionnaire médiane (première vague) est éliminée (Kessarar et al., 2006). Une fois leur migration terminée, ces OPCs peuvent sortir du cycle cellulaire et se différencier en OLs myélinisants ou rester des précurseurs oligodendrocytaires.

Différents facteurs de transcription sont exprimés spécifiquement à chaque étape du lignage oligodendrocytaire (**Figure 4C**). La production d'OPCs fait intervenir une diminution de l'expression de facteurs neuroépithéliaux tels que Sox2 au sein des cellules souches au cours des vagues de production décrites plus haut. Cet évènement est suivi par une augmentation de l'expression de protéines de la famille Sox associées au lignage glial, dont Sox8 et Sox9 (Wegner and Stolt, 2005). Par la suite, plusieurs facteurs de transcription sont induits, dont Olig1, Olig2 et Sox10, puis l'expression du récepteur alpha au PDGF (platelet-derived neurotrophic factor) (PDGFR $\alpha$ ). L'acquisition du récepteur PDGFR $\alpha$  est un évènement clé marquant l'entrée des cellules dans le lignage d'OPCs et est indispensable à leur survie (Goldman and Kuypers, 2015). Le PDGF, sécrété par les cellules voisines, notamment les astrocytes, entraîne la prolifération de ces progéniteurs. Cet effet du PDGF implique des composants de la matrice extracellulaire tels que le protéoglycane NG2 et les intégrines (Bergles and Richardson, 2015). Chez l'adulte, NG2 est un marqueur exprimé par les OPCs (Chang et al., 2000; Dawson et al., 2000; Levine et al., 2001). Lors de la transition des OPCs en OLs, une condensation de la chromatine au sein des précurseurs a été rapportée et serait associée à l'inhibition de plusieurs gènes notamment ceux impliqués dans la réponse à des signaux prolifératifs comme le PDGF (Barca-Mayo and Lu, 2012; Huang et al., 2015; Yu et al., 2010). Les OPCs vont ainsi diminuer leur expression de NG2 et de PDGFR $\alpha$ . Cependant, ils continuent à exprimer Olig2 et Sox10 qui participent au guidage des cellules vers le devenir oligodendrocytaire, et à consolider le phénotype oligodendrocytaire, une fois acquis (Emery and Lu, 2015; Li et al., 2007; Weider et al., 2013; Yu et al., 2013). Suite à la différenciation de l'OPC en OL, la transcription de MYRF (myelin regulator factor) et de ses gènes cibles codant pour les protéines MBP (myelin basic protein), PLP (myelin proteolipid protein) et CNP (2',3'-Cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase) initie le processus de myélinisation (Emery et al., 2009). L'expression continue d'Olig2 et Sox10 est nécessaire au maintien de l'expression de MYRF. La maturation de l'OL, se préparant pour la myélinisation, est accompagnée de modifications dans la composition de sa membrane. Il exprime notamment des lipides de surface reconnus par l'anticorps O4 et devient plus ramifié. Chacun de ses prolongements va pouvoir envelopper un axone individuellement (Sherman and Brophy, 2005).

Chez l'adulte, une large population d'OPCs persiste, distribuée uniformément dans le cerveau (Chang et al., 2000; Dawson et al., 2003; Levine et al., 2001; Pringle et al., 1992). Les OPCs sont des cellules très dynamiques, balayant le milieu avec leurs prolongements et se déplaçant dans le parenchyme. Le maintien de cette population de précurseurs reposerait sur la présence d'interactions entre les différents OPCs présents dans l'environnement. Ainsi, l'ablation par laser d'un OPC conduit à la division rapide d'un OPC adjacent (Hughes et al., 2013). L'activité neuronale et les stimuli sensoriels seraient également capables de moduler la prolifération et la production d'OLs et de précurseurs (Etxeberria et al., 2016; Gibson et al., 2014; Hughes et al., 2018; Mitew et al., 2018; Simon et al., 2011). Les OPCs sont sensibles aux forces mécaniques notamment produites par la matrice extracellulaire qui intervient dans l'induction de leur différenciation (Domingues et al., 2018; Rosenberg et al., 2008). Il est à noter que les OPCs pourraient également donner des astrocytes dans des conditions particulières comme lors d'une lésion (Dimou et al., 2008; Komitova et al., 2011; Tripathi et al., 2010). Cependant, ces progéniteurs conduisent principalement à la formation d'OLs (Franklin and Goldman, 2015).

## 2.2 La myélinisation des axones

### *2.2.1 Formation de la gaine de myéline*

L'acquisition de myéline autour des axones est une étape de l'évolution des vertébrés et serait survenue simultanément dans le système nerveux central et périphérique. La myéline est une membrane riche en lipides qui permet de protéger la portion d'axone qu'elle recouvre, empêchant la circulation de tout stimulus électrique (**Figure 4A-B**). Cette gaine isolante étroitement associée à l'axone permet ainsi la conduction saltatoire des potentiels d'action le long de l'axone (pour revue, (Stadelmann et al., 2019)). La myéline est produite par les OLs qui vont envelopper une portion d'axone avec des couches concentriques de myéline (Iglesias-Rozas and Garrosa, 2012; Jackman et al., 2009). La gaine de myéline est ainsi composée de l'accumulation de plusieurs épaisseurs avec une alternance caractéristique de couches denses aux électrons et couches claires. Les premières correspondent aux surfaces cytoplasmiques condensées de l'oligodendrocyte tandis que l'apposition étroite des membranes forme les couches claires (Aggarwal et al., 2011; Sampaio-Baptista et al., 2013). Pour la synthèse de la myéline, les lipides qui constitueront ce composé s'associent à la

PLP au sein de vésicules qui migrent, à l'aide de moteurs protéiques, jusqu'à la gaine de myéline en formation (Baron et al., 2015; Baron and Hoekstra, 2010; White and Krämer-Albers, 2014).

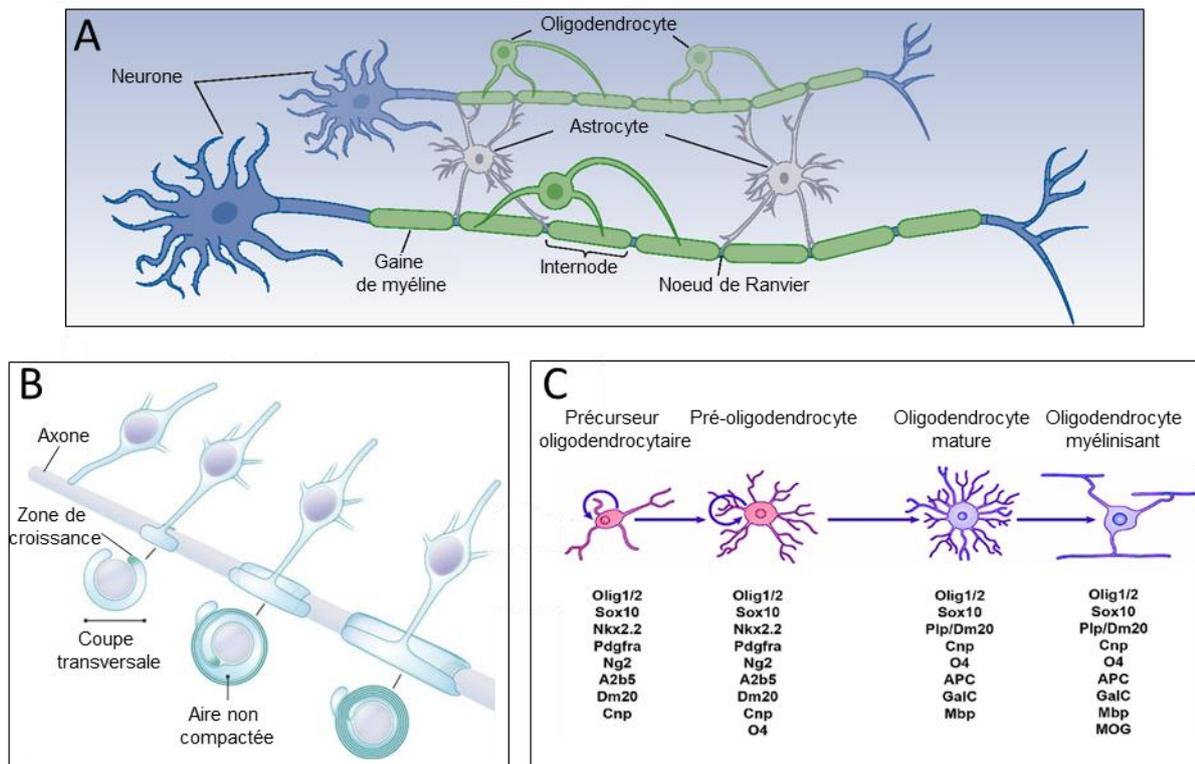
La formation d'une gaine de myéline est un processus discontinu se déroulant sur un laps de temps restreint (Czopka et al., 2013) (**Figure 4B**). Durant cette période, les OLs pré-myélinisants balayent l'environnement à l'aide de leurs prolongements, à la recherche des axones présents. Ils stabilisent le contact avec l'axone choisi (pour revue, (Chapman and Hill, 2020)). Une partie des prolongements de ces OLs se transforment alors pour former la gaine de myéline. Ils vont générer des couches concentriques de membranes composées de myéline autour de l'axone (Sherman and Brophy, 2005). En parallèle, le reste de leurs prolongements n'interagissant avec aucun axone, se rétracte et disparaît. Plusieurs points de contrôle ont été proposés afin de réguler la production de myéline. Ils seraient répartis tout au long du processus, de la sélection initiale des axones jusqu'à la maturation et l'élongation de la gaine de myéline. Différentes protéines vont participer au maintien de la structure de la gaine de myéline telles que la PLP et la MBP. Ces deux protéines favorisent la stabilité des membranes de myéline (Aggarwal et al., 2013; Bakhti et al., 2013; Raasakka et al., 2017). Afin d'être isolante, la gaine de myéline doit subir une compaction correspondant à la connexion d'un feuillet extracellulaire et d'un feuillet cytoplasmique, cette apposition est si étroite que l'eau est évacuée. La MBP participe à la compaction de la gaine en liant les membranes cytoplasmiques adjacentes via un mécanisme semblable à une « fermeture en zip » entraînant l'exclusion du cytosol (Aggarwal et al., 2011; Stadelmann et al., 2019). A l'inverse, une autre protéine de la myéline, la CNP, retarde la compaction des membranes de la gaine de myéline (Snaidero et al., 2014). Le cytosquelette de l'OL intervient pour permettre l'enroulement et le maintien de la myéline autour de l'axone. Les microtubules vont servir de support structural et participer au transport d'organites tandis que les filaments d'actine permettront la détection et la création de forces importantes lors du processus de myélinisation, phénomène d'enroulement de la myéline autour de l'axone. Des études ont, en effet, proposé l'implication de forces créées par l'actine et permettant de surmonter les forces d'adhésion induites par le frottement des couches nouvellement formées sur celles déjà présentes. En plus de ces forces, la dépolymérisation d'actine intervient également dans le guidage des processus de

formation, d'extension et également de déformation de plusieurs couches de myéline (Nawaz et al., 2015; Zuchero et al., 2015). La matrice extracellulaire est un autre élément important dans la régulation de l'élongation de la gaine de myéline.

Différents modèles ont été proposés pour décrire le processus de myélinisation, Snaidero et al. (Snaidero et al., 2014) présentent ainsi un modèle de myélinisation axonale dans lequel, les couches supplémentaires sont ajoutées par l'extérieur de la gaine. Ainsi, la première couche formée ne se déplace pas et reste en contact avec l'axone.

### *2.2.2 Facteurs modulant la myélinisation*

La gaine de myéline entourant les axones est dynamique et peut changer au cours du temps (Chang et al., 2016). Des études, chez la souris, mettent en évidence la capacité de remodelage de la myéline au sein de la couche I du cortex cérébral (Hill et al., 2018; Hughes et al., 2018). De plus, les différents internodes (segments d'axone enveloppés de myéline) formés par un OL sont hétérogènes, certains se rétractant, d'autres s'allongeant ou restant stables. Des différences de myélinisation des axones peuvent permettre une synchronisation précise des potentiels d'action induits par différents stimuli, par exemple lors de signaux provenant des deux oreilles, facilitant l'intégration des signaux et l'activation de la réponse neurologique correspondante (Seidl, 2014).



**Figure 4 : Lignage oligodendrocytaire et formation de la gaine de myéline**

(A) Les prolongements de l'oligodendrocyte s'enroulent autour d'axones pour former la gaine de myéline. Les aires myélinisées de l'axone sont nommées internodes. Elles sont interrompues par des régions non myélinisées, les noeuds de Ranvier, où viennent s'apposer les prolongements astrocytaires, d'après (Jackman et al, *Physiology*, 2009). (B) Modèle de myélinisation d'un axone. Un oligodendrocyte nouvellement différencié envoie un prolongement vers un axone non myélinisé. Suite à ce contact, l'oligodendrocyte commence à envelopper l'axone en étendant sa membrane. La zone de croissance où est incorporée la myéline est indiquée en vert. La membrane de myéline s'accroît radialement (augmentation des couches autour de l'axone) et longitudinalement (augmentation de la longueur de la gaine). La compaction intracellulaire s'étend à partir de la couche la plus externe, permettant de conserver les canaux cytoplasmiques pour le transport de composés entre le prolongement oligodendrocytaire et la zone de croissance située au centre. Au cours de la myélinisation, une rétraction des prolongements oligodendrocytaires non impliqués dans le processus, peut être observée, d'après (Chang et al, *Nat. Neurosci.*, 2016). (C) Représentation schématique des différentes étapes du lignage oligodendrocytaire. La morphologie (en haut) et le profil d'expression (en bas) caractéristiques du précurseur oligodendrocytaire, du pré-oligodendrocyte et de l'oligodendrocyte mature et myélinisant sont présentés, d'après (Traiffort et al, *J. Dev. Biol.*, 2016).

Comme on pourrait s'y attendre, plus la gaine de myéline est épaisse, plus l'isolation électrique de l'axone est importante facilitant ainsi la conduction saltatoire du signal électrique. Au cours du processus de myélinisation, les OLs reçoivent des signaux axonaux les instruisant sur l'épaisseur nécessaire pour la gaine de myéline. De nombreux facteurs modulant la prolifération des OPCs et la formation des OLs agiraient également sur l'épaisseur de la gaine de myéline, tels que l'activité neuronale (Gibson et al., 2014; Mitew et al., 2018). Des études ont ainsi rapporté la présence de courants calciques au sein des OLs en réponse à l'activité électrique neuronale afin de moduler la myélinisation (Jensen and Yong, 2016). L'hyperstimulation de neurones par des approches optogénétiques ou chémogénétiques conduit également à une augmentation de l'épaisseur de la gaine de myéline (Gibson et al., 2014; Mitew et al., 2018). En retour, ces modifications de la myéline peuvent influencer l'activité neuronale (Fields, 2008; Forbes and Gallo, 2017; Monje, 2018).

Le diamètre de l'axone est un autre paramètre capable de moduler le processus de myélinisation. En effet, l'induction de la myélinisation d'un axone a été rapportée suite à l'augmentation, par des techniques expérimentales, de son diamètre. Une augmentation de la sécrétion de facteurs pro-myélinisants tels que le BDNF (brain-derived neurotrophic factor) a également été décrite lors de cet effet (Goebbels et al., 2017). Il est à noter que l'épaisseur de la myéline pourrait varier au cours du temps et ne dépendrait donc pas uniquement du diamètre de l'axone.

La compaction des membranes entre les différentes couches de la gaine de myéline et l'exclusion du cytoplasme oligodendrocytaire sont également des paramètres critiques pour la fonctionnalité de cette gaine. Des changements structuraux au niveau des nœuds de Ranvier peuvent également intervenir dans la vitesse de transmission des potentiels d'action. En effet, le nombre et la densité des canaux à chaque nœud assurent un rôle crucial dans la capacité de la membrane à dépolariser. Cette propriété est directement liée à la distribution des internodes et au nombre de canaux présents dans les nœuds de Ranvier les espaçant (Arancibia-Cárcamo et al., 2017).

### 2.2.3 Plasticité de la myéline

La plasticité de la myéline correspond à une adaptation de la structure et/ou des fonctions de la myéline en réponse à des événements ayant lieu au cours de la vie de l'organisme. Cette propriété est donc conservée tout au long de la vie de l'animal grâce à la capacité des OPCs à produire des OLs en continu (Young et al., 2013). Les OLs nouvellement formés chez l'adulte participent à la myélinisation d'axones dans le corps calleux, région contenant de nombreux axones non myélinisés, mais également dans des aires avec de nombreux axones myélinisés telles que le nerf optique (Dimou et al., 2008; Tripathi et al., 2017; Young et al., 2013). Cette nouvelle myélinisation est associée à l'apprentissage et à l'acquisition de nouveaux comportements (McKenzie et al., 2014; Schneider et al., 2016). Des modifications de la structure de la myéline ont ainsi pu être observées lors de l'apprentissage chez les rongeurs et chez l'Homme. Une dérégulation de cette plasticité de la myéline peut conduire à des altérations de ses fonctions ou une prolifération incontrôlée des OPCs. La formation et la maturation des OLs sont également des processus dynamiques permettant d'ajuster les circuits neuronaux en réponse aux stimuli extérieurs.

### 2.3 Support trophique du neurone

L'étanchéité importante apportée par la gaine de myéline empêche l'axone d'avoir accès aux nutriments présents dans le milieu extracellulaire. Ainsi, les OLs assurent l'approvisionnement de l'axone en substrats métaboliques via la gaine de myéline (Fünfschilling et al., 2012; Y. Lee et al., 2012; Nave, 2010) (**Figure 5**). Les OLs sont, par exemple, capables de produire du lactate. En effet, la détection de glutamate par les OLs, lors de l'activité neuronale, entraîne la translocation des transporteurs de glucose GLUT1 à la membrane plasmique. L'augmentation des niveaux intracellulaires de glucose qui s'ensuit conduit à la production de lactate qui est alors transporté à l'axone via le transporteur monocarboxylate 1 (MCT1) (Morrison et al., 2013; Saab et al., 2016). Cette action peut être modulée par l'activité neuronale et la libération de NT.

L'apport de substrats énergétiques se fait par le biais de canaux cytoplasmiques qui permettent de connecter les différentes couches de la gaine de myéline entre elles, et avec le corps cellulaire de l'OL (Snaidero

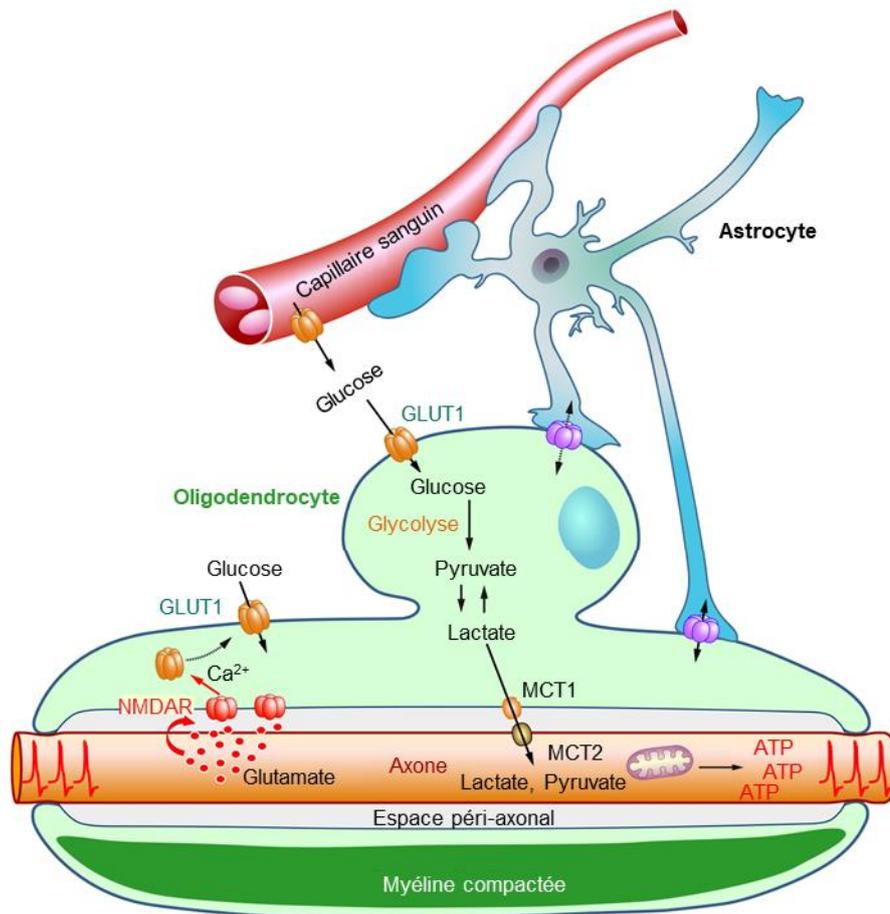
et al., 2014). Ces canaux cytoplasmiques permettent le transport de molécules et organelles au sein de l'internode (Richert et al., 2014). Comme décrit précédemment, les astrocytes assurent également un rôle de soutien métabolique. Cependant, les nœuds de Ranvier, régions non myélinisées où peuvent s'accoler les prolongements astrocytaires, sont courts et ne permettent donc pas aux astrocytes d'exercer cette fonction (Stadelmann et al., 2019). La gaine de myéline présente également des jonctions communicantes ou « gap junctions » qui connectent le milieu entourant l'axone à la myéline. En permettant des interactions entre la myéline et les cellules gliales environnantes (Rash, 2010), les jonctions communicantes sont une voie alternative pour le transport de substrats métaboliques. Les échanges entre OL/myéline et axone pourraient également passer par le transfert de microvésicules (Frühbeis et al., 2013).

## 2.4 Oligodendrocytes et pathologies

Les OLs assurent un rôle important dans le maintien de la transmission neuronale et des neurones. La mort de cellules oligodendrocytaires peut ainsi entraîner une démyélinisation accompagnée d'une dégénération neuronale. La perte d'oligodendrocytes peut être causée par un trauma, une ischémie ou un dysfonctionnement du système immunitaire et, dans de rares cas, des mutations génétiques. De façon intéressante, l'existence de populations oligodendrocytaires spécifiques à certaines pathologies, comme la sclérose en plaque, a été mise en évidence lors d'études transcriptomiques (Falcão et al., 2018).

### *2.4.1 Atteintes de la myéline*

Dans le cadre de traumatisme et d'ischémie, la lésion conduit à la dégradation des OLs et à l'apparition d'une lésion démyélinisante (Assinck et al., 2017; Fancy et al., 2011). En effet, selon la sévérité d'un trauma crânien, la survie des OLs et l'intégrité de la myéline peuvent être affectées. Lorsque le traumatisme provoque la destruction de substance blanche, la perte d'axones et la mort d'OLs qui s'ensuivent peuvent conduire à l'effondrement des gaines de myéline et à leur dégradation (Armstrong et al., 2016).



**Figure 5 : Le rôle métabolique de l'oligodendrocyte**

Représentation schématique du couplage métabolique entre oligodendrocytes, astrocytes et neurones. Le glucose, une fois entré dans l'oligodendrocyte (en vert), conduit à la formation de lactate et pyruvate. Ces composés sont envoyés à l'axone via les transporteurs monocarboxylates (MCT) comme source d'énergie. L'activité neuronale entraîne la libération de glutamate dans l'espace péri-axonal et l'activation des récepteurs NMDA (N-méthyl-D-aspartate) présents sur la membrane interne de la myéline. Cette activation conduit au transfert de transporteurs de glucose (GLUT1) à la surface de la gaine de myéline et/ou du corps cellulaire de l'oligodendrocyte afin d'augmenter l'entrée de glucose et la production de lactate et pyruvate par la cellule. L'astrocyte (en bleu) communique avec l'oligodendrocyte par des jonctions communicantes permettant l'échange de métabolites entre les deux cellules, d'après (Stadelmann et al, *Physiol. Rev.*, 2019).

Les pathologies basées sur des mutations génétiques conduisant à une dégradation des OLs, sont rares (Helman et al., 2015). Dans les leucodystrophies, la mutation de PLP1 (myelin proteolipid protein 1), une protéine constitutive de la myéline, empêche son transport à la membrane plasmique de l'OL. La protéine mutée s'accumule et la cellule oligodendrocytaire entre en apoptose. Ce phénomène serait la cause principale de la perte d'OLs dans cette pathologie (Simons et al., 2002; Torii et al., 2014).

Des défauts de la myéline peuvent aussi être retrouvés dans des pathologies telles que la schizophrénie, le désordre bipolaire ou l'autisme (Stedehouder and Kushner, 2017; Xekardaki et al., 2011). De plus, des liens entre altérations de la myéline et maladies neurodégénératives, notamment pour la maladie d'Alzheimer, ont été proposés (Bartzokis, 2011; Dean et al., 2017).

Dans les pathologies démyélinisantes telles que la sclérose en plaque, le dysfonctionnement ou la mort d'OLs entraîne une perte de myéline conduisant à des désordres neurologiques. La sclérose en plaque est la maladie démyélinisante la plus répandue, affectant principalement les jeunes adultes (Reich et al., 2018). Cette pathologie est caractérisée par une réponse immunitaire altérée s'attaquant à la gaine de myéline et aux OLs (Saxena et al., 2008). Ce phénomène conduit à une démyélinisation des structures avec une destruction des gaines de myéline et une perte d'OLs (Duncan and Radcliff, 2016). L'inflammation autoimmune induite par l'invasion de cellules immunitaires provenant de la périphérie pourrait conduire à la dégradation des OLs et des neurones.

Il est à noter que l'âge a un effet sur les OLs qui produisent des gaines de myéline plus courtes et en moins grand nombre (Lasiene et al., 2009). L'accumulation de débris de myéline chez l'animal âgé peut affecter la gaine de myéline (longueur, remodelage) et la stabilité des nœuds de Ranvier. De plus, une altération de l'apport de substrats métaboliques par les OLs peut apparaître avec l'âge (Nave, 2010; Saab et al., 2016).

#### *2.4.2 Le processus de remyélinisation et les approches thérapeutiques*

En réponse à la démyélinisation, les OPCs présents deviennent actifs, migrent vers la lésion et se différencient en OLs matures capables de produire la myéline et de réparer les dommages (Kuhn et al., 2019). Des facteurs libérés par les astrocytes et la microglie présents au niveau de la lésion vont guider les OPCs lors de leur migration (Franklin and Ffrench-Constant, 2017; Hammond et al., 2014). L'OL nouvellement formé remplace la myéline détruite par une gaine de myéline plus courte et plus fine. Ce processus est appelé remyélinisation et permettrait de protéger les neurones tout en restaurant leurs fonctions (Duncan et al., 2009). Les OPCs sont un élément clé dans la remyélinisation. Ils génèrent de nouveaux OLs pour pallier à la dégradation induite par la lésion démyélinisante (Crawford et al., 2016). La remyélinisation de lésions par des OLs déjà formés, et non par des cellules nouvellement différenciées, a été rapportée dans différents modèles de démyélinisation tels que des chats soumis à une nourriture irradiée, des primates non humains déficients en vitamine B12 et des tissus post-mortem d'individus atteints de sclérose en plaque (Duncan et al., 2018; Yeung et al., 2019). La vitamine B12 est un facteur participant à la formation de la myéline et dont la déficience a des conséquences inflammatoires et neurodégénératives similaires à celles observées dans la sclérose en plaque (Nemazannikova et al., 2018). L'induction du processus de remyélinisation fait intervenir l'expression de facteurs similaires à ceux décrits lors de la myélinisation des structures au cours du développement, tels que MYRF (Duncan et al., 2017). Chez les patients atteints de sclérose en plaque, la perte d'OLs et l'incapacité des OPCs à se différencier en OLs participeraient à l'absence d'une remyélinisation efficace des lésions (Chang et al., 2002; Kuhlmann et al., 2008). Les signaux émis par les astrocytes et la microglie présents, notamment dans les lésions démyélinisantes de la sclérose en plaque, sont capables de moduler le processus de remyélinisation (Traiffort et al., 2020).

Les OPCs présentent un grand intérêt thérapeutique en servant de vecteur pour la restauration de myéline en cas de démyélinisation (Fox et al., 2014; Franklin and Goldman, 2015). Actuellement, les stratégies thérapeutiques pour le traitement de la sclérose en plaque visent à promouvoir la remyélinisation par le remplacement de cellules ou leur reprogrammation en OPCs, et le développement de molécules contrôlant la

spécification et la différenciation des OPCs (Deshmukh et al., 2013; Lopez Juarez et al., 2016; Najm et al., 2015; S. Wang et al., 2013). Cependant, le remplacement des oligodendrocytes manquants par transplantation d'OPCs ou par le recrutement de progéniteurs endogènes, est une stratégie thérapeutique prometteuse (Goldman et al., 2012).

La mobilisation des cellules souches endogènes est une autre voie thérapeutique étudiée pour promouvoir le processus de remyélinisation. Le recrutement des CSNs de la ZSV a ainsi été rapporté dans divers modèles de démyélinisation. En effet, une lésion démyélinisante, induite suite à l'administration de lysolécithine (LPC) dans le corps calleux, est capable d'induire la différenciation des neuroblastes de la ZSV vers un devenir oligodendrocytaire (Jablonska et al., 2010; Nait-Oumesmar et al., 1999). De même, lors d'une démyélinisation induite par l'administration de cuprizone, une migration importante de cellules provenant de la ZSV vers la lésion a été décrite. Ces cellules se différencient en OLs et participent au processus de réparation (Xing et al., 2014). Cependant, lorsque l'administration de cuprizone est maintenue sur le long terme, une démyélinisation chronique se met en place et la contribution des cellules de la ZSV au processus de réparation est fortement réduite (Brousse et al., 2015). Ce phénomène serait associé à un épuisement de la population de CSNs de la ZSV avec le temps (Calzolari et al., 2015). La mobilisation de ces cellules a également été rapportée dans le modèle viral de démyélinisation TMEV (Theiler's Murine Encephalomyelitis Virus) et dans le cadre de l'EAE (Experimental Autoimmune Encephalomyelitis), un modèle de sclérose en plaque largement utilisé et basé sur l'immunisation de l'animal, notamment avec des peptides de la myéline (pour revue, (Xiao et al., 2018)). Les cellules de la ZSV qui migrent et se différencient au sein de la lésion démyélinisante, constituent ainsi une source supplémentaire d'OLs myélinisants en complément des OPCs déjà présents dans le tissu.

Plusieurs facteurs et voies de signalisation sont capables de promouvoir le recrutement des CSNs de la ZSV pour la production de nouveaux OLs. Des études ont ainsi rapporté une augmentation de la prolifération des CSNs de la ZSV et de leur différenciation en OLs suite à l'injection d'EGF (epidermal growth factor) dans une lésion démyélinisante induite par LPC (Cantarella et al., 2008; Gonzalez-Perez and Alvarez-Buylla, 2011). A

l'inverse, dans un modèle murin d'EAE, l'apport d'un anticorps neutralisant dirigé contre l'EGF entraîne une augmentation de la production de nouvelles cellules, notamment des OLs, par les cellules de la ZSV permettant l'amélioration des symptômes (Amir-Levy et al., 2014). Ainsi, l'EGF présente différentes propriétés selon le contexte pathologique. Ce paramètre est donc à considérer lors du développement de thérapies basées sur la stimulation des CSNs. La modulation de la voie Hedgehog est un autre moyen de promouvoir le recrutement des cellules de la ZSV lors de lésions démyélinisantes et de favoriser la réparation (voir §II.3.2.5).

### *2.4.3 Autres pathologies*

En raison de leur potentiel de prolifération, les OPCs pourraient participer au développement de tumeurs. Dans certains gliomes humains, des cellules exprimant des marqueurs du lignage oligodendrocytaire ont été rapportées (Alcantara Llaguno and Parada, 2016). De plus, l'excès de PDGF, par injection ou surproduction transgénique, conduit à la formation de gliomes présentant des cellules aux mêmes caractéristiques que les OPCs suggérant que ces précurseurs pourraient être à l'origine de ces tumeurs (Assanah et al., 2006; Lindberg et al., 2009; Nazarenko et al., 2011).

## II. LA VOIE DE SIGNALISATION HEDGEHOG

### 1. Les principaux acteurs de la voie Hedgehog

Au cours du développement, l'expression différentielle de protéines telles que celles appartenant à la famille des protéines Wnt et Hedgehog (Hh) permet la spécification des tissus embryonnaires (Briscoe and Théron, 2013; Logan and Nusse, 2004; Toyoda et al., 2010). Les protéines Hh, membres de la voie de signalisation éponyme, sont ainsi connues pour leurs fonctions morphogénétiques au sein de nombreuses espèces, de la drosophile aux vertébrés (Briscoe and Small, 2015; Placzek and Briscoe, 2018; Tickle and Towers, 2017). La voie de signalisation Hh fait également intervenir les récepteurs membranaires, Patched (Ptc) et Smoothed (Smo), et de nombreuses composantes cytoplasmiques qui vont participer à la modulation de cette voie (Kong et al., 2019; Ruat et al., 2014).

#### 1.1 Les protéines Hedgehog

Le gène Hh a été découvert au cours d'une étude génétique cherchant à identifier les mutations responsables d'une altération des tissus épidermiques de larve de drosophile (Nüsslein-Volhard and Wieschaus, 1980). L'aspect semblable à un hérisson du mutant a ainsi donné son nom à la signalisation Hh. Chez les vertébrés, trois gènes Hh ont été identifiés : Sonic Hedgehog (Shh), Indian Hedgehog (Ihh) et Desert Hedgehog (Dhh). Les protéines codées par ces gènes suivent les mêmes étapes de maturation post-traductionnelle leur conférant des structures similaires. Cependant, elles présentent des activités biologiques et des domaines d'expression distincts (Ingham et al., 2011; Varjosalo and Taipale, 2008).

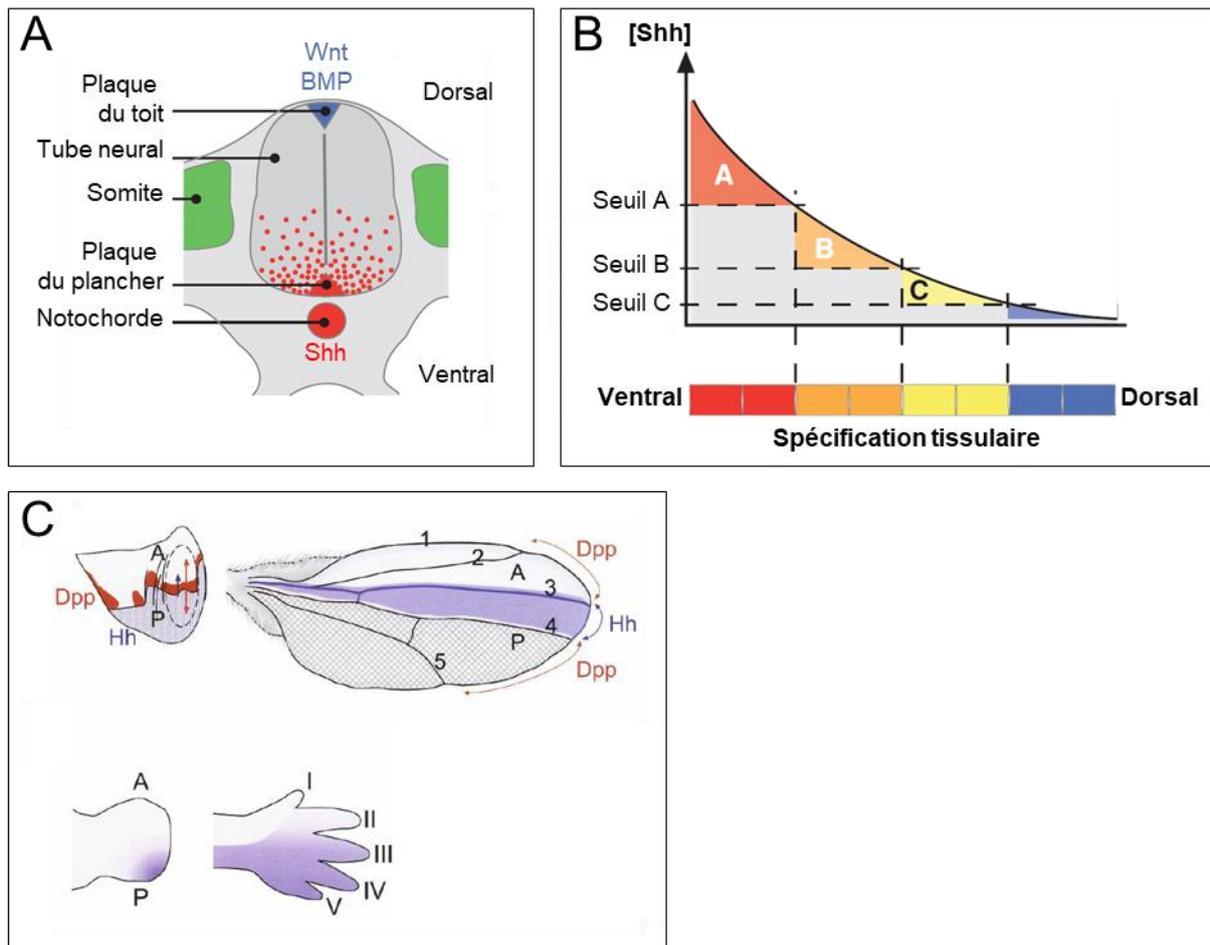
##### *1.1.1 Fonction morphogénétique*

Les protéines Hh sont des facteurs sécrétés dans le milieu extracellulaire pouvant agir sur les cellules adjacentes (action paracrine) mais également sur les cellules productrices (action autocrine). Elles ont une fonction morphogénétique qui repose sur la formation d'un gradient de concentration (**Figure 6A-C**). L'intensité et la durée d'activation de la voie Hh va varier le long de ce gradient conduisant à la transcription de divers

groupes de gènes au sein des cellules cibles selon leur position (Dessaud et al., 2008, 2007). Cela va permettre l'établissement d'un motif de spécification cellulaire dans les tissus en développement (Echelard et al., 1993; Krauss et al., 1993; Riddle et al., 1993; Roelink et al., 1994). Comme pour d'autres morphogènes, tels que ceux appartenant à la famille Wnt, ce gradient va participer au rôle clé de la protéine Hh dans les processus d'induction et de modelage d'organes chez l'embryon (McMahon et al., 2003) (**Figure 6**).

### *1.1.2 Synthèse et maturation*

Les protéines Hh sont produites sous la forme d'un précurseur de 45 kDa composé d'une séquence d'adressage au réticulum endoplasmique (RE); d'un domaine amino-terminal (N-ter) porteur de l'activité signalétique et d'un domaine carboxy-terminal (C-ter) ayant une activité autoprotéolytique semblable à celle identifiée dans les intéines (**Figure 7A**). Ce précurseur, produit dans le RE, va effectuer un clivage autocatalytique porté par l'activité intéine de son domaine C-ter. Cette autoprotéolyse aboutit à la formation d'un peptide C-ter (HhC) et d'un peptide N-ter (HhN) (Heal et al., 2011; Lee et al., 1994; Porter et al., 1996b). Le peptide HhN, très conservé parmi les espèces, subit des modifications lipidiques supplémentaires pour porter l'activité signalétique. Ainsi, une O-acyltransférase (Hh acyltransférase, Hhat, chez les vertébrés) procède, au sein du RE, à l'addition d'un palmitate à l'extrémité N-ter du peptide HhN. L'addition de ce lipide va amplifier considérablement l'activité biologique du peptide (Pepinsky et al., 1998). Indépendamment, un cholestérol va également être ajouté, par liaison covalente à l'extrémité C-ter de HhN (Buglino and Resh, 2008; Chamoun et al., 2001; Pepinsky et al., 1998). Cette réaction est également catalysée par l'activité intéine du peptide HhC (Porter et al., 1996b, 1996a). D'autres stérols avec un groupe  $3\beta$ -OH peuvent se substituer au cholestérol ajouté au peptide HhN (Cooper et al., 1998; Mann and Beachy, 2000). Cependant, l'absence de cholestérol au sein du peptide HhN conduit à des altérations de spécification tissulaire chez l'embryon. Cela suggère que l'apport de ce fragment hydrophobe serait nécessaire pour la formation du gradient morphogénétique de HhN (Porter et al., 1996b, 1996a, 1995).



**Figure 6 : Propriétés morphogénétiques de la protéine Hedgehog au cours du développement**

(A) Schéma d'une coupe transversale d'embryon d'amniotes. Au sein du tube neural, la protéine Sonic Hedgehog (Shh, rouge), sécrétée par la notochorde et la plaque du plancher, va se propager. Le gradient de concentration, ainsi créé, va contribuer à la génération de différents types de neurones. Les membres de la famille Bone Morphogenetic Protein (BMP) et Wnt (bleu), produits dorsalement, sont d'autres signaux clés dans la spécification de ces neurones, d'après (Dessaud et al, *Development*, 2008). (B) Graphique représentant la spécification dorso-ventrale des cellules du tube neural en fonction de la concentration de Shh. Des quantités distinctes de protéine Shh vont induire l'expression de différents groupes de gènes, représentés ici par les blocs de différente couleur. Le gradient de concentration de Shh fournit ainsi une information positionnelle aux cellules du tube neural permettant la mise en place de l'axe dorso-ventral, d'après (Dessaud et al, *Development*, 2008). (C) La protéine Hedgehog (Hh) participe à la mise en place de l'axe antéro-postérieur au cours du développement. L'expression localisée des protéines Hh (violet) et decapentaplegic (Dpp) dans le disque imaginal d'aile de drosophile (haut, gauche), permet ainsi la définition des différents segments d'aile chez l'adulte (haut, droite). Chez les vertébrés, le gradient de protéines Hh intervient dans la formation des doigts (bas), d'après (Varjosalo and Taipale, *Genes Dev.*, 2008). A, antérieur; P, postérieur.

Le peptide HhC diffère entre les protéines Shh, Ihh et Dhh. Aucune activité signalétique n'a été décrite pour ce peptide chez les mammifères dont la seule fonction semble être dans l'hydrolyse du précurseur et la cholestérylation du peptide HhN. Suite à l'autoprotéolyse du précurseur, les formes solubles de HhC seraient supprimées par le complexe de dégradation du RE (ERAD) (Chen et al., 2011). De façon intéressante, le peptide HhC peut entraîner l'élimination du précurseur en l'adressant au complexe ERAD. Ainsi, le devenir du précurseur balance entre maturation post-traductionnelle et dégradation. Une altération de cet équilibre pourrait jouer un rôle important dans le développement de maladies associées à des mutations du gène Hh (Chen et al., 2011).

### *1.1.3 Transport*

Au niveau cellulaire, le peptide HhN a été retrouvé au sein de radeaux lipidiques, des microdomaines de la membrane plasmique enrichis en cholestérol et sphingolipides (Coulombe et al., 2004; Traiffort et al., 2001). Cette localisation du peptide serait liée à sa double lipidation (cholestérol et palmitate) qui, en lui conférant un caractère hydrophobe, l'empêcherait d'être libéré de façon incontrôlée (Briscoe and Thérond, 2013). Cependant, ces propriétés de rétention membranaire interrogent sur les mécanismes de transport du peptide HhN à travers l'espace interstitiel entre des cellules parfois éloignées de plusieurs centaines de micromètres (Lee et al., 2016; Lewis et al., 2001).

Des protéines, telles que Dispatched (Disp), Scube 2 (signal peptide, cubulin domain, epidermal-growth-factor-like domain-containing protein 2) et les protéoglycanes à héparane sulfate (HSPG), vont ainsi jouer le rôle de médiateurs permettant de décrocher le peptide HhN de la membrane. D'autres molécules ont été proposées comme cargo protégeant le peptide lors de son transport dans l'environnement extracellulaire aqueux telles que les vésicules extracellulaires et les lipoprotéines (**Figure 7B**).

Le rôle de Disp, protéine à douze domaines transmembranaires, dans la sécrétion de la protéine Hh a été mis en avant dans des modèles de souris et de drosophile déficientes pour cette protéine. Chez ces mu-

tants, l'absence de Disp n'affecte pas l'expression ni la maturation de la protéine Hh mais entraîne son accumulation à la surface de la cellule (Burke et al., 1999; Kawakami et al., 2002; Ma et al., 2002). La protéine Disp interagirait avec le fragment cholestérol du peptide HhN pour le décrocher de la bicouche lipidique (Tukachinsky et al., 2012). Un mécanisme similaire est retrouvé dans le transport de cholestérol à travers la membrane par les pompes bactériennes de la famille Resistance Nodulation Division (RND), avec lesquelles Disp présente une homologie (Elkins and Mullis, 2006; Ma et al., 2002; Tseng et al., 1999). Le peptide HhN serait, ensuite, pris en charge par Scube 2, une glycoprotéine sécrétée dans le milieu extracellulaire, qui jouerait le rôle de chaperonne protégeant le peptide du milieu interstitiel aqueux. Bien qu'une interaction directe entre Scube 2 et le fragment cholestérol de HhN ait été rapportée, le mécanisme de transfert du peptide entre Disp et Scube 2 reste encore à élucider (Creanga et al., 2012; Tukachinsky et al., 2012).

Il est à noter que les protéines de la famille Scube sont présentes exclusivement chez les vertébrés. De plus, la libération d'une protéine Hh artificielle dépourvue de lipide ne nécessite pas Disp, ni Scube 2 (Burke et al., 1999). En effet, un autre mécanisme, faisant intervenir les protéines ADAM (A disintegrin and metalloprotease) permettrait la sécrétion de protéines Hh dépourvues de lipides (Briscoe and Thérond, 2013). Cette libération est indépendante de la protéine Disp mais est potentialisée par Scube 2 et les glypicans (Jakobs et al., 2014; Ortmann et al., 2015).

La sécrétion de la protéine Hh est facilitée par l'action des HSPGs, en particulier ceux de la famille des glypicans tels que Dally et Dally-like (Bellaïche et al., 1998; Han et al., 2004; Lin et al., 2000; Rubin et al., 2002; The et al., 1999). L'étude de mutants déficients pour ces glycoprotéines suggère un lien entre un défaut des HSPGs et l'accumulation de protéines Hh à la surface cellulaire. Ainsi, la mutation chez la drosophile, d'enzymes nécessaires à la synthèse des HSPGs, telles que la glycosyltransférase codée par le gène *toutvelu* ou la déshydrogénase UDP-glucose codée par le gène *sugarless*, entraîne une diminution de la diffusion du signal Hh et est associée à des altérations du développement embryonnaire (Bellaïche et al., 1998; Gallet et al., 2003; Häcker et al., 1997; The et al., 1999). Des résultats similaires sont rapportés chez les vertébrés pour des mutations du

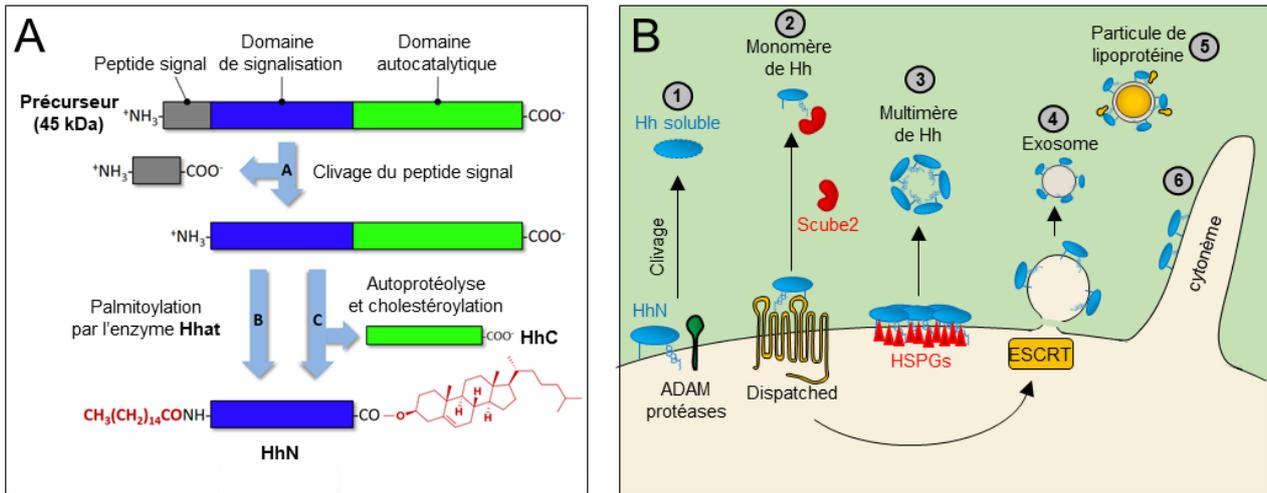
gène *EXT1*, homologue vertébrés de *toutvelu* (Lin, 2004; Lin et al., 2000). Un autre argument du rôle de ces glycoprotéines est apporté par la présence d'une séquence Cardin-Weintraub au sein de la protéine Hh, lui permettant de se lier aux HSPGs. La mutation de cette séquence entraîne une diminution de la prolifération des précurseurs de cellules granulaires du cervelet, mécanisme dépendant de la signalisation Hh (Rubin et al., 2002).

Une fois libérée de la membrane plasmique, la protéine Hh va devoir circuler dans un milieu extracellulaire aqueux. Des vésicules, telles que des exosomes et microvésicules, ont été proposées comme des cargos potentiels de cette protéine participant à la propagation du signal Hh sur une longue distance. En effet, des études en microscopie électronique du disque d'aile de drosophile, mettent en évidence des vésicules présentant la protéine Hh mais également la protéine Disp et des composants de l'ESCRT (endosomal sorting complex required for transport) (Gradilla et al., 2014; Matusek et al., 2014; Parchure et al., 2015). D'autre part, l'accumulation de protéines Hh au sein d'endosomes a été rapportée lors de déficience du complexe ESCRT (Callejo et al., 2011; D'Angelo et al., 2015). Ce complexe serait donc nécessaire à la sécrétion de protéines Hh et à l'activité à longue distance de la voie Hh. La protéine Disp interviendrait également en facilitant le chargement des protéines Hh dans ces vésicules (D'Angelo et al., 2015). Plusieurs exemples du transport vésiculaire de la protéine Hh et des fonctions associées ont été décrits en périphérie. Dans les cellules stellaires hépatiques, la sécrétion de microvésicules contenant la protéine Hh permettrait de stimuler l'angiogénèse dans le foie (Witek et al., 2009). La libération de microvésicules Hh<sup>+</sup> a également été rapportée suite à la stimulation de cellules T (Martínez et al., 2006), processus ayant servi à établir un modèle de production de ces microvésicules Hh<sup>+</sup> afin d'examiner leurs propriétés. L'étude de ces microvésicules démontre ainsi une capacité à promouvoir la néovascularisation (Benameur et al., 2010; Soleti et al., 2009) et à inhiber la différenciation adipocytaire *in vitro* (Fleury et al., 2016). Enfin, des microvésicules transportant la protéine Hh ont été identifiées au sein de la circulation sanguine suggérant une signalisation Hh à très longue distance (Soleti et al., 2009).

La présence de protéines Hh associées à des lipoprotéines a été rapportée chez la drosophile et également chez les mammifères (Eaton, 2008; Palm et al., 2013; Panáková et al., 2005; Swierczynska et al., 2013; Willnow et al., 2007). Ce mécanisme de transport n'est pas spécifique au ligand Hh, il est aussi retrouvé pour les protéines de la famille Wnt (Panáková et al., 2005). Le transport de protéines Ihh au sein de lipoprotéines de faible densité, issues de plasma humain, a également été rapporté (Queiroz et al., 2010).

La protéine Hh circulerait aussi sous forme de multimères. Au sein de ces multimères, les fragments lipidiques des protéines Hh seraient isolés et protégés du milieu aqueux environnant. Cette hypothèse est basée sur l'observation de signaux de haut poids moléculaire pouvant correspondre à des multimères de Hh identifiés dans le surnageant de culture de cellules HEK293T (lignée de cellules épithéliales de rein d'embryon humain) transfectées par la protéine Hh (Chen et al., 2004; Gallet et al., 2006; Goetz et al., 2006; Palm et al., 2013; Zeng et al., 2001). La formation de ces multimères de protéines Hh serait facilitée par les HSPGs, proposés comme plateforme d'assemblage de ces complexes protéiques (Manikowski et al., 2018; Ortmann et al., 2015; Vyas et al., 2008; Zeng et al., 2001).

Lorsque les cellules sont adjacentes, un simple contact des surfaces cellulaires pourrait suffire au transfert de protéine Hh et à l'activation de la voie Hh dans la cellule cible (Strigini and Cohen, 1997). Alternativement, le transport de la protéine Hh par l'intermédiaire de cytonèmes, des protrusions membranaires à base d'actine (Ramírez-Weber and Kornberg, 1999), a été rapporté au cours du développement chez la drosophile (Bilioni et al., 2013; Bischoff et al., 2013; Gradilla et al., 2014; Rojas-Ríos et al., 2012) et les vertébrés (Cardozo et al., 2014; Sanders et al., 2013). Cependant les mécanismes exacts de déplacement de la protéine Hh le long du cytonème sont encore mal définis. En effet, des vésicules Hh<sup>+</sup> ont été identifiées à la surface de ces extensions membranaires (Sanders et al., 2013) mais également à l'intérieur (Gradilla et al., 2014). Enfin, l'altération du gradient de protéines Hh observée lors de mutations du cytonème suggère un rôle de ces protrusions membranaires dans la mise en place de ce gradient (Bischoff et al., 2013).



**Figure 7 : Maturation et transport des protéines Hedgehog**

(A) La protéine Hedgehog (Hh) est produite sous la forme d'un précurseur de 45 kDa. Après clivage de sa séquence d'adressage au réticulum endoplasmique (peptide signal) par une peptidase, le précurseur va réaliser une autoprotéolyse catalysée par son domaine C-terminal et faisant intervenir une molécule de cholestérol. Ce clivage conduit à la formation d'un peptide N-terminal (HhN) cholestéroylé et un peptide C-terminal (HhC). En parallèle, une Hh acyltransférase (Ski chez les invertébrés et Hhat chez les mammifères) va effectuer l'ajout d'un palmitate en N-terminal du fragment HhN. Le peptide HhN est responsable des activités biologiques attribuées à Hh, d'après (Heal et al, *Chem. Commun.*, 2011). (B) Plusieurs mécanismes de sécrétion de HhN ont été proposés : (1) une protéolyse des fragments lipidiques du peptide HhN par des protéases de la famille ADAM aboutissant à la sécrétion d'un peptide soluble dépourvu de lipide. (2) Le peptide HhN pourrait être décroché de la membrane par la protéine Dispatched (Disp) qui le transférerait ensuite à la glycoprotéine Scube 2, jouant le rôle de chaperone pour le peptide. (3) Les protéoglycanes à héparane sulfate (HSPGs) interviendraient également en servant de plateforme d'assemblage à des groupes de protéines Hh permettant la formation de multimères. (4) La protéine Disp permettrait également le chargement du peptide HhN dans des vésicules formées via le complexe ESCRT (endosomal sorting complex required for transport). (5) Des lipoprotéines peuvent également servir de cargo aux peptides Hh. (6) Les cytonèmes, protrusions membranaires composés d'actine, constitueraient un autre moyen de transport permettant aux cellules productrices de transférer les protéines HhN aux cellules cibles, d'après (Lee et al, *Development*, 2016; Manikowski et al, *J. Dev. Biol.*, 2018).

## 1.2 Le récepteur Patched

Chez les vertébrés, les gènes Patched1 (Ptc1) et Patched2 (Ptc2) sont les homologues du gène Ptc de drosophile (Carpenter et al., 1998; Motoyama et al., 1998b; Nieuwenhuis et al., 2006). Les protéines Ptc1 et Ptc2 présentent des séquences très similaires et sont, toutes deux, capables d'inhiber l'activité de la protéine Smo et de répondre au ligand Hh (Alfaro et al., 2014; Holtz et al., 2013; Klein et al., 2016; Lee et al., 2006; Zhulyn et al., 2015). Cependant, tandis que la souris mutée homozygote Ptc<sup>-/-</sup> ne survit pas au-delà du stade embryonnaire E9.5 et présente des altérations en accord avec une activation de la voie Hh (Ellis et al., 2003; Goodrich et al., 1997), les souris Ptc2<sup>-/-</sup> sont viables et ne présentent aucun défaut majeur de développement (Adolphe et al., 2014; Holtz et al., 2013; Lee et al., 2006). Ainsi Ptc1 est considéré comme le régulateur principal de la voie Hh *in vivo* (Motoyama et al., 1998a, 1998b). Dans ce manuscrit, le terme « Ptc » sera utilisé pour désigner « Ptc1 ».

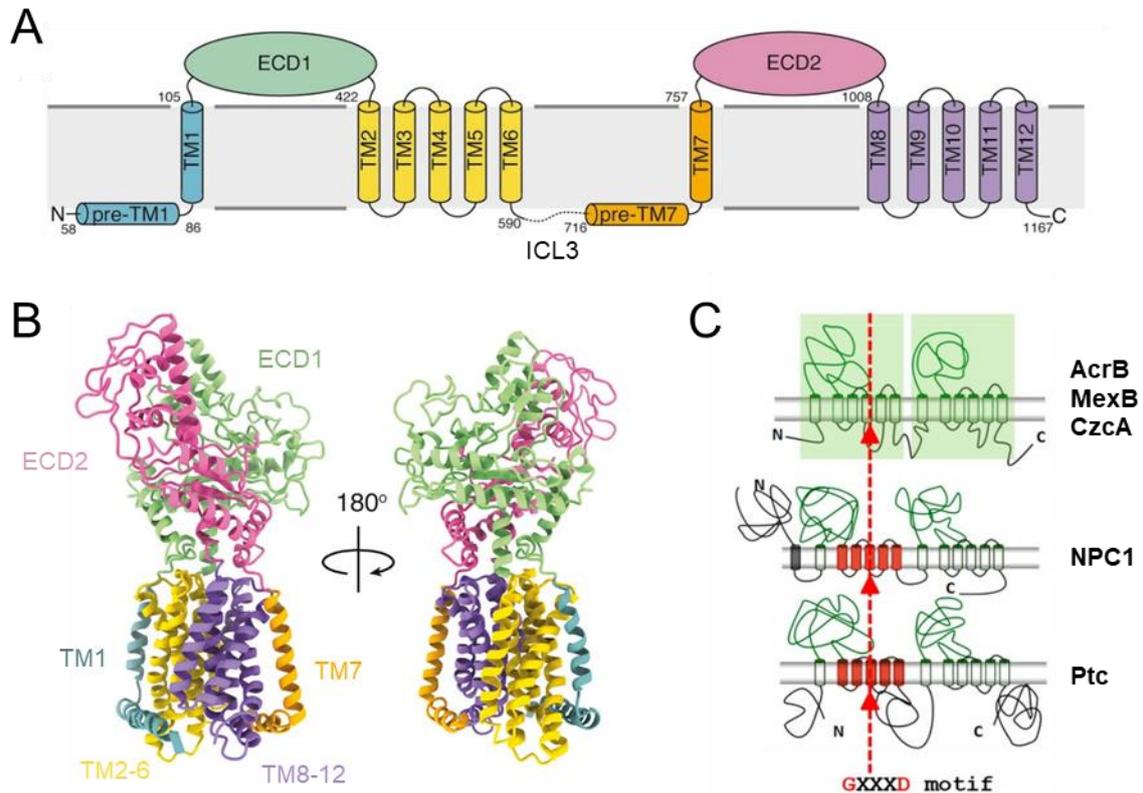
### *1.2.1 Structure*

Le récepteur Ptc est constitué de douze domaines transmembranaires (TM1-12), de deux domaines extracellulaires (ECD1 et ECD2) et d'une partie intracellulaire comprenant ses extrémités N-ter et C-ter et une boucle intracellulaire (ICL3) (**Figure 8A-C**). Les domaines ECD1 et ECD2 se situent entre les parties TM1-TM2 et TM7-TM8 de la protéine, respectivement. Les domaines TM2-6 forment une région senseur de stérol (SSD), structure caractéristique retrouvée dans les protéines transportant et détectant le cholestérol telles que la protéine Niemann-Pick C1 (NPC1) et SCAP (SREBP cleavage-activating protein) (Davies and Ioannou, 2000; Pfeffer, 2019; Tseng et al., 1999). Des analyses en microscopie cryo-électronique ont également permis l'identification de sites potentiels de liaison de stérol au sein de ce récepteur. Ces sites se situent dans le domaine ECD1, entre les domaines ECD1 et ECD2 et au sein du domaine transmembranaire près du domaine SSD de la protéine Ptc. Une structure en forme de tunnel hydrophobe capable de relier ces deux sites de liaison, a également été mise en évidence (Gong et al., 2018; C. Qi et al., 2019; Qi et al., 2018b, 2018a; Zhang et al., 2018). Ces études structurales mettent en avant une homologie de Ptc avec les transporteurs membranaires de la famille RND, des

perméases bactériennes utilisant le gradient de protons de la membrane pour le rejet de molécules. Le récepteur Ptc présente également une forte homologie avec la protéine NPC1, un transporteur impliqué dans le transfert de cholestérol de la lumière des lysosomes au cytoplasme (Carstea et al., 1997; Loftus et al., 1997; Pfeffer, 2019; Tseng et al., 1999) (**Figure 8C**).

L'homologie de Ptc avec des transporteurs de cholestérol suggère une activité de transport de stérol par cette protéine. Des arguments sont également apportés par Bidet et al. (Bidet et al., 2011) qui démontrent la capacité de la protéine Ptc purifiée à lier le cholestérol, interaction inhibée par la liaison de Shh à son récepteur. D'autre part, une réduction de l'efflux de BODIPY-cholestérol, analogue fluorescent du cholestérol, associée à l'augmentation de la concentration intracellulaire de ce lipide a également été rapportée suite à la liaison de Shh à son récepteur Ptc dans les cellules de la lignée fibroblastique murine NIH3T3. En accord avec ces effets, la surexpression d'une protéine Ptc humaine chez la levure *S. Cerevisiae* conduit à une amplification de la sortie de cholestérol hors de la cellule renforçant l'hypothèse d'une activité de transport de cholestérol par Ptc (Bidet et al., 2011). Cette étude met en avant l'implication du récepteur de Shh dans le transport de cholestérol et suggère un rôle de cette activité dans la répression de Smo. L'identification des oxystérols 24(S),25-epoxycholestérol et 24-keto-cholestérol lors de la purification de la protéine Ptc (X. Qi et al., 2019), la présence d'un domaine SSD et la caractérisation de sites potentiels de liaison de stérol au sein de ce récepteur sont en accord avec une activité de transporteur de Ptc. La protéine Ptc passerait ainsi par plusieurs conformations correspondant aux différentes étapes d'un cycle de transport de stérol, impliquant le tunnel hydrophobe au sein du récepteur (Kowatsch et al., 2019).

En accord avec ce transport de stérol, les mutations de Ptc qui bloqueraient ce tunnel, entraînent une diminution de l'activité du récepteur (Qi et al., 2018a; Zhang et al., 2018). De plus, la surexpression de la protéine Ptc conduit à une réduction de l'accessibilité du cholestérol au sein de la membrane cellulaire (Zhang et al., 2018). Ptc serait également capable d'évacuer certains agents thérapeutiques via cette activité de transporteur (Hasanovic and Mus-Veteau, 2018).



**Figure 8 : Structure de Patched, récepteur de la protéine Hedgehog**

(A) Schéma de l'architecture pseudo-symétrique de la protéine Patched (Ptc) comprenant deux domaines extracellulaires (ECD1 et ECD2), un domaine composé de douze segments transmembranaires (TM1-12), les extrémités N-ter et C-ter intracellulaires et une boucle intracellulaire (ICL3). Les deux domaines extracellulaires, ECD1 et ECD2, sont placés entre les segments TM1-2 et TM7-8, respectivement. Le domaine senseur de stéroïdes est compris au sein des segments TM2-6, d'après (Zhang et al, *Cell*, 2018). (B) Modèle atomique d'un récepteur murin Ptc basé sur les résultats de cristallographie électronique et coloré selon (A), d'après (Zhang et al, *Cell*, 2018). (C) Homologie du récepteur Ptc avec les transporteurs bactériens de la famille RND (Resistance Nodulation Division) et les protéines de type C1 de la maladie de Niemann-Pick (NPC1). Les protéines de la famille RND, dont AcrB, MexB et CzcA, sont des perméases à gradient de protons. Les protéines NPC1 permettent le transport de cholestérol. Ces protéines partagent avec Ptc un domaine senseur de stéroïde, en rouge, comprenant le motif conservé GXXXD, d'après (Hasanovic and Mus-Veteau, *Cells*, 2018).

Il est à noter que la majorité des structures de Ptc identifiées par des techniques de cristallographie portent sur des protéines Ptc dépourvues de partie intracellulaire. L'absence de ce domaine permet d'obtenir des niveaux d'expression de la protéine suffisants pour ces études. Cette partie intracellulaire serait impliquée dans l'oligomérisation du récepteur mise en avant lors d'expériences de co-immunoprécipitation (Fleet et al., 2016; Lu et al., 2006). De plus, des mutants perte de fonction seraient capables d'agir comme dominants négatifs avec les protéines Ptc sauvages (Johnson et al., 2000; Martín et al., 2001) suggérant une interaction de ces formes mutantes et sauvages dans d'éventuels oligomères. Plus récemment, la protéine Ptc a pu être purifiée sous forme de dimère symétrique, en l'absence de son ligand Hh (Zhang et al., 2018) (**Figure 9A-B**). Cependant cette oligomérisation du récepteur ne lui serait pas nécessaire pour répondre au signal Hh ni pour réprimer l'activité de Smo (Fleet et al., 2016) questionnant sur l'état du récepteur *in vivo* lors de la liaison du ligand Hh.

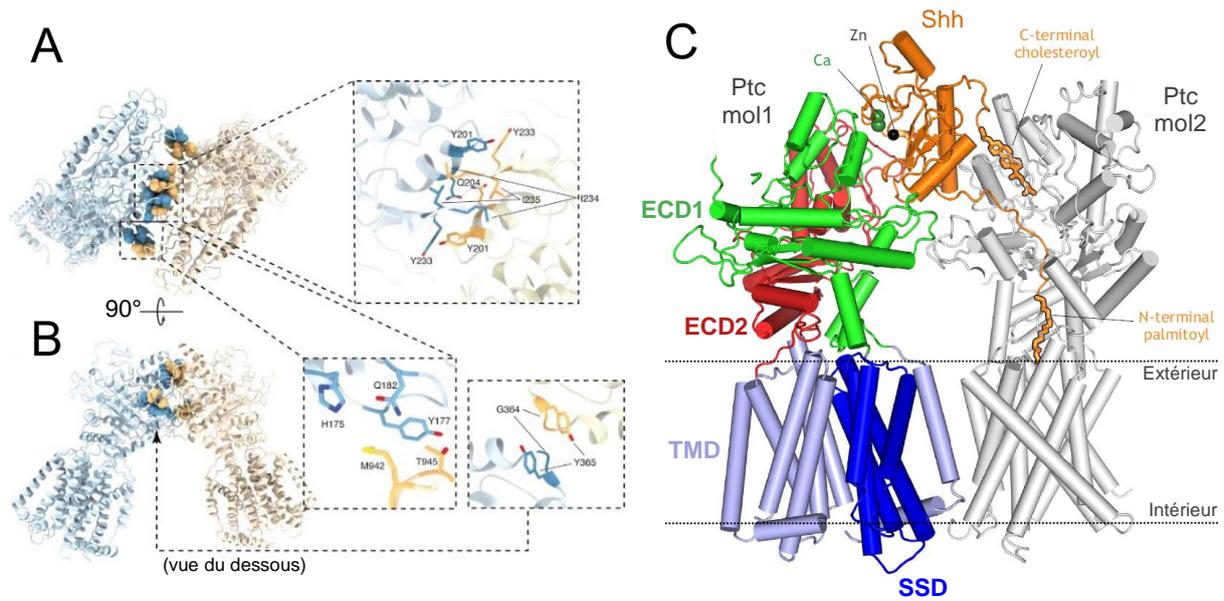
### 1.2.2 Récepteur de la protéine Hh

La co-cristallisation du récepteur Ptc avec son ligand Shh a permis la construction de divers modèles d'interaction de ces protéines (Allen et al., 2011; Gong et al., 2018; Izzi et al., 2011; X. Qi et al., 2019; Qian et al., 2019). Une étude, réalisée avec des concentrations physiologiques de calcium, propose ainsi la formation d'un complexe asymétrique impliquant une molécule de Shh et deux molécules de Ptc (Qi et al., 2018a) (**Figure 9C**). Ce complexe s'organise autour de deux sites d'interaction (Gong et al., 2018; Qi et al., 2018a) :

- une interface protéine/protéine : entre le site de liaison au calcium et au zinc de ShhN et les boucles extracellulaires d'une première molécule de Ptc

- une interface lipidique : consistant en l'insertion de l'extrémité N-ter palmitoylée de ShhN entre les domaines ECD1 et ECD2 d'une deuxième molécule de Ptc.

L'extrémité C-ter cholestéroylée de ShhN, non identifiée dans les premières études de co-cristallisation (Qi et al., 2018b, 2018a), interagirait également avec le domaine ECD1 de Ptc (Qian et al., 2019). L'emplacement des parties lipidiques de ShhN dans ce modèle permettrait un blocage du tunnel hydrophobe présent au sein des protéines Ptc et inhiberait ainsi leur activité de transporteur de stérol. Ce modèle asymétrique est appuyé par



**Figure 9 : Modèle d'interaction du récepteur Patched et de son ligand Sonic Hedgehog**

(A-B) Organisation putative en dimère de Patched (Ptc) murin vu du dessus (A) et latéralement (B) basée sur des études de cristallographie par microscopie électronique. La surface d'interaction entre les deux protéines Ptc se situe au niveau de leurs domaines extracellulaires. Les encarts en pointillés mettent en avant les acides aminés impliqués dans cette interaction, d'après (Zhang et al, *Cell*, 2018). (C) Modèle asymétrique d'interaction de Ptc/Shh impliquant une molécule de Sonic Hedgehog (Shh) et deux molécules de Ptc humain (Ptc mol1 et Ptc mol2). Le contact entre Ptc mol1 et Shh est médié par une interface protéine/protéine impliquant le domaine de liaison au calcium (Ca) et au zinc (Zn) du ligand et le domaine extracellulaire 1 de Ptc mol1. Les groupements palmitate et cholestérol de Shh interagissent avec les domaines extracellulaires de la deuxième molécule, Ptc mol2, d'après (Kong et al, *Development*, 2019; Qi et al, *Science*, 2018). ECD, domaine extracellulaire; TMD, domaine transmembranaire; SSD, domaine senseur de stérols.

la diminution d'activité de la voie Hh observée suite à la mutation de l'une ou l'autre de ces interfaces Shh/Ptc (Gong et al., 2018; Qi et al., 2018b).

Comme décrit précédemment, les lipides greffés au ligand ShhN ont un rôle important dans son activité biologique (Pepinsky et al., 1998; Porter et al., 1996b, 1996a, 1995). Ainsi la palmitoylation de ShhN augmente fortement son potentiel signalétique *in vitro* (Pepinsky et al., 1998). Cette addition de palmitate n'est pas nécessaire à la liaison de ShhN à Ptc ni à l'activation de la voie Hh (Chen et al., 2004; Pepinsky et al., 1998). De plus, bien qu'un peptide synthétique, comportant les vingt-deux premiers acides aminés de ShhN et palmitoylé à l'extrémité amino-terminale, soit capable d'endiguer la répression de Smo en se liant à Ptc, il n'entraînera pas l'endocytose de son récepteur ni sa dégradation, observées habituellement avec la protéine ShhN entière (Tukachinsky et al., 2016).

En plus de son rôle de récepteur du signal Hh et de transporteur de stéroïdes, Ptc exerce une inhibition sur l'activité de la protéine Smo en l'absence de protéine Hh. Plusieurs hypothèses ont été émises sur les mécanismes de cette répression. Ces modèles et les arguments associés, basés sur l'activité de transporteur de Ptc, sont traités plus loin dans ce manuscrit (voir §II.1.3).

### 1.2.3 Les co-récepteurs de la protéine Hh

Bien que Ptc soit le récepteur principal des protéines Hh, plusieurs autres protéines transmembranaires, dont les protéines Boc, Cdo et Gas1, peuvent lier ce ligand et vont intervenir pour moduler la réception du signal Hh par Ptc.

Les protéines de surface Cdo (Cell adhesion molecule Down-regulated by Oncogene) et Boc (Brother of Cdo) appartiennent à la superfamille des immunoglobulines. Elles sont composées d'un domaine extracellulaire constitué d'une répétition de séquences de type immunoglobulines et de fibronectine, d'un segment transmembranaire et d'un large domaine intracellulaire (Kang et al., 2002, 1997). Ces répétitions de fibronectine seraient essentielles à la liaison de la protéine Shh (McLellan et al., 2008, 2006; Tenzen et al., 2006; Yao et al., 2006). Les protéines Cdo et Boc sont les homologues vertébrés les plus proches des protéines Ihog

(interference Hh) et Boi (Brother of Ihog) de drosophile (Kang et al., 2002; Zhang et al., 2006). Elles ont une structure similaire et sont conservées de la drosophile aux mammifères (Okada et al., 2006; Tenzen et al., 2006; Yao et al., 2006; Zhang et al., 2006). A l'inverse, Gas1 (Growth Arrest Specific 1), une protéine à ancre glycosylphosphatidylinositol, est présente uniquement chez les vertébrés (Allen et al., 2007; Lee and Fan, 2001; Martinelli and Fan, 2007). Cette protéine n'est pas apparentée à Cdo, ni à Boc et son domaine extracellulaire présente une homologie avec les récepteurs au GDNF (glial cell-line derived neurotrophic factor) (Cabrera et al., 2006; Schueler-Furman et al., 2006).

Les souris mutantes  $Boc^{-/-}$  sont viables et fertiles malgré des défauts de spécification neuronale et de guidage axonal (Fabre et al., 2010; Harwell et al., 2012; Okada et al., 2006; Sánchez-Arrones et al., 2013; Zhang et al., 2011). De même, les déficiences touchant uniquement Cdo ou Gas1 n'entraînent que des effets minimes sur la voie Hh. Cependant, la délétion simultanée des trois protéines Cdo, Boc et Gas1 au cours du développement provoque une réduction importante de la signalisation Hh, entraînant de graves défauts de ventralisation mimant le phénotype observé chez les souris  $Shh^{-/-}$  (Allen et al., 2011, 2007; Izzi et al., 2011). Ainsi les protéines Cdo, Boc et Gas1 sont collectivement nécessaires pour les fonctions de la voie Shh lors du développement de la moelle épinière et du cervelet, de la spécification des doigts et du développement craniofacial (Allen et al., 2011, 2007; Cole and Krauss, 2003; Izzi et al., 2011; Zhang et al., 2011). Ces données sont en accord avec la redondance fonctionnelle rapportée pour ces protéines (Allen et al., 2011; Tenzen et al., 2006).

Les protéines Cdo, Boc et Gas1 ont été décrites comme des régulateurs positifs de la voie Hh. Elles joueraient le rôle de co-récepteurs en facilitant la liaison du ligand Shh à son récepteur Ptc. Ce rôle dépendrait du type cellulaire et du stade de développement (Allen et al., 2011; Izzi et al., 2011). Un mécanisme indirect a été proposé pour que ces protéines assurent cette fonction : en liant le ligand Shh, les protéines Cdo, Boc et Gas1 permettraient d'augmenter la concentration locale en protéine Shh et augmenteraient ainsi la probabilité d'interaction entre Ptc et Shh.

La formation d'un complexe engageant les protéines Ptc, Shh et un de ces co-récepteurs a également

été proposé. Ce complexe ternaire serait nécessaire pour médier les effets cellulaires du signal Shh (Allen et al., 2011; Bae et al., 2011; Izzi et al., 2011; Zheng et al., 2010). Lors de leur analyse par cristallographie du dimère de Ptc, Qi et al. (Qi et al., 2018a) proposent que la liaison de Shh à Cdo ou Boc laisse libre le fragment palmitate du ligand, segment impliqué dans l'inhibition de la protéine Ptc, rendant possible la formation d'un complexe Shh/Ptc/co-récepteur. La capacité de ces co-récepteurs à lier Ptc est un autre argument supportant l'existence d'un tel complexe (Izzi et al., 2011; Zheng et al., 2010).

#### *1.2.4 Hedgehog interacting protein*

Hhip (Hedgehog interacting protein) est une glycoprotéine capable de lier les protéines Hh avec une affinité de l'ordre du nanomolaire (Chuang and McMahon, 1999). Elle interagit également avec les protéoglycanes à héparanes sulfates de la matrice extracellulaire, lui permettant de séquestrer les protéines Shh à la surface de la cellule et ainsi de limiter la propagation du signal Shh, rôle connu de la protéine Hhip au cours du développement (Holtz et al., 2015; Jeong and McMahon, 2005). La protéine Hhip est ainsi considérée comme un régulateur négatif de la voie de signalisation Hh.

La compétition entre Hhip et le récepteur Ptc pour lier le ligand Shh participe également à l'action antagoniste de cette glycoprotéine sur la voie Hh. En effet, des études de cristallographie du complexe Hhip/Shh proposent une interaction engageant le site de liaison au zinc de la protéine Shh, interface servant également pour la liaison du ligand à son récepteur Ptc (Bishop et al., 2009; Bosanac et al., 2009).

La protéine Hhip est exprimée spécifiquement chez les vertébrés. Elle se présente sous forme soluble ou liée à la membrane. Ces deux formes sont fortement exprimées dans le cerveau de rat adulte (Coulombe et al., 2004). La localisation de la protéine Hhip diffère des sites d'expression de son transcrite suggérant un transport possible de la protéine. La forme soluble de Hhip conserve ses propriétés antagonistes : elle est capable d'inhiber la différenciation de la lignée fibroblastique C3H10T1/2 induite par Shh (Coulombe et al., 2004).

Une protéine transmembranaire endosomale, la mégaline, est également capable de séquestrer Shh.

En restreignant localement le ligand, cette protéine module la voie Shh et participe ainsi au développement du cerveau antérieur chez la souris. En accord avec son rôle dans le contrôle de la voie Shh, les souris mutées pour la mégaline présentent des malformations des structures craniofaciales (Xavier et al., 2016).

### 1.3 Smoothened, activateur clé des étapes cytoplasmiques

La protéine Smo est un médiateur essentiel de la transmission du signal Hh. Il permet d'induire des événements intracellulaires en réponse à la liaison du ligand sur son récepteur Ptc. La structure de cette protéine comprend un domaine N-ter extracellulaire riche en cystéine (CRD), un domaine de liaison (LD), suivi d'un domaine transmembranaire comprenant sept segments (TMD) et d'une partie C-ter intracellulaire (ICD) (Kristiansen, 2004) (**Figure 10A-B**). La protéine Smo appartient à la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs) et son domaine TMD partage des similarités avec la classe A des RCPGs. Cependant, cette protéine est répertoriée dans la classe F, sous-groupe comportant également les protéines Frizzled, récepteurs des protéines de la famille Wnt (C. Wang et al., 2013). Des analyses en cristallographie de la protéine Smo ont mis en évidence des sites de liaisons, pour des ligands potentiels, localisés dans les domaines CRD et TMD de la protéine (Byrne et al., 2016; Huang et al., 2018) (**Figure 10A-B**). Bien qu'elles ne soient pas physiquement en contact, ces deux régions interagissent de manière allostérique (Nachtergaele et al., 2012).

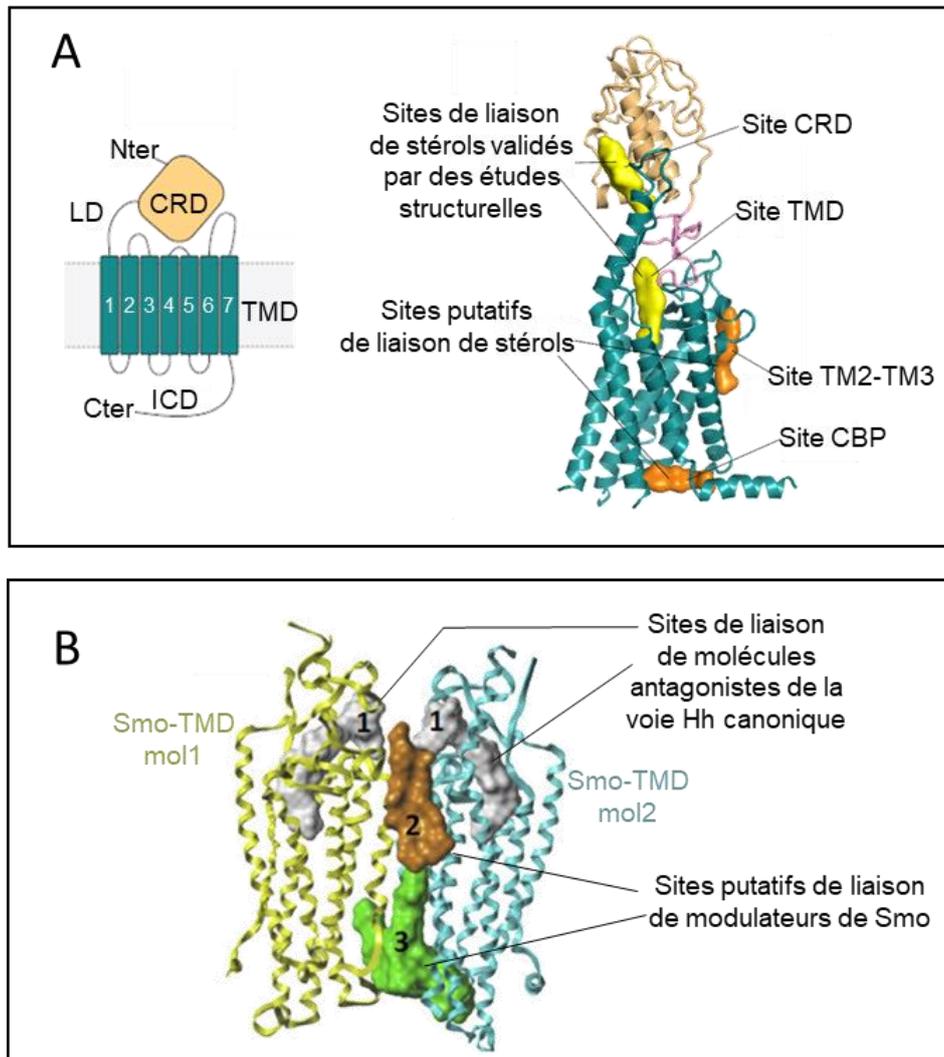
Des études récentes suggèrent que le ligand endogène de Smo pourrait être le cholestérol ou un stérol. Ainsi, l'identification de cholestérol au sein de structures cristallisées de cette protéine est en faveur de cette hypothèse (Byrne et al., 2016; Deshpande et al., 2019). Les oxystérols, des dérivés oxydés du cholestérol, ont aussi été proposés comme ligands potentiels de Smo, en raison de leur capacité à activer le récepteur dans certains contextes développementaux ou cancéreux (Corcoran and Scott, 2006; Dwyer et al., 2007; Nachtergaele et al., 2012; Raleigh et al., 2018). Initialement, la liaison des oxystérols et du cholestérol a été décrite au niveau du domaine CRD de la protéine Smo (Byrne et al., 2016; Huang et al., 2018). Cependant des études de simulation de dynamique moléculaire d'une protéine Smo membranaire ont mis en évidence d'autres sites

potentiels de liaison des stérols dans le domaine TMD du récepteur (Hedger et al., 2019) (**Figure 10A**). Plus précisément, deux sites ont été rapportés :

-au niveau des extrémités extracellulaires des segments transmembranaires 2 et 3 (TM2 et TM3) : site potentiel de liaison au cholestérol (Hedger et al., 2019)

-au niveau de la face interne du domaine TMD, au sein d'une poche de liaison cytoplasmique : site potentiel de liaison aux oxystérols (Raleigh et al., 2018).

De façon intéressante, les mutations du domaine CRD de Smo affectant la liaison des oxystérols, ne parviennent pas à bloquer l'activation de la voie Hh induite par le ligand Shh (Nachtergaele et al., 2013). A l'inverse, une altération du domaine CRD entravant la liaison du cholestérol, sans perturber celle des oxystérols, diminue l'effet activateur de la protéine Shh sur la voie éponyme (Byrne et al., 2016; Huang et al., 2016; Luchetti et al., 2016; Xiao et al., 2017). Le cholestérol représente ainsi un meilleur candidat comme ligand endogène pour la protéine Smo. En accord avec cette hypothèse, la déplétion pharmacologique ou génétique des niveaux de cholestérol dans la cellule réduit l'activation de la voie de signalisation Hh (Blassberg et al., 2016; Cooper et al., 2003; Incardona and Roelink, 2000). De plus, plusieurs études mettent en avant la nécessité de la présence de cholestérol pour l'activation du récepteur Smo dans les cellules (Byrne et al., 2016; Huang et al., 2016; Luchetti et al., 2016). Il faut également noter qu'une mutation du site potentiel de liaison aux stérols au sein du domaine TMD de Smo, inhibe l'activation de la voie Hh induite par le ligand Shh mais également par le cholestérol (Deshpande et al., 2019). Ces données mettent en avant l'importance de ce site de liaison dans l'activation de la voie Hh et la possibilité pour le cholestérol d'activer la voie Hh en se liant à cette région.



**Figure 10 : Structure de la protéine Smoothened**

(A, gauche) Schéma de la structure de Smoothened (Smo), récepteur couplé aux protéines G, composé d'une partie amino-terminale (Nter) extracellulaire comprenant un domaine riche en cystéines (CRD) et un domaine de liaison (LD), d'un domaine de sept segments transmembranaires (TMD) et d'un domaine intracellulaire (ICD) en carboxy-terminal (Cter). (A, droite) Modèle atomique du récepteur Smo basé sur les résultats de cristallographie électronique et coloré selon (A, gauche). Les données biochimiques et structurales sur la protéine Smo ont permis d'identifier deux sites de liaisons aux stérols (jaune) : dans le domaine CRD (liaisons des oxystérols et du cholestérol) et dans le domaine TMD (liaison de la cyclopamine, alcaloïde stérol d'origine végétale). Deux autres sites de liaisons de stérols (orange) ont été modélisés à l'aide d'analyses computationnelles : un site impliquant les segments transmembranaires 2 et 3 (site TM2-TM3) et une poche de liaison cytoplasmique (CBP) localisée au niveau de la face cytoplasmique du TMD, d'après (Kowatsch et al, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2019). (B) Structure de l'homodimère de protéines Smo humaines. L'interface d'interaction entre les deux monomères (monomère A en jaune et B en cyan) implique les segments transmembranaires 4 et 5 de chaque récepteur. Le dimère présente quatre poches de liaisons potentielles identifiées par le programme VolSite et pouvant être ciblées par des drogues. En plus du site de liaison des antagonistes canoniques (surface 1, en blanc) présent sur chaque monomère, deux poches de liaison supplémentaires (surface 2 en orange et surface 3 en vert) sont présentes à l'interface de contact des deux monomères, d'après (Ruat et al, *Trends Pharmacol. Sci.*, 2014).

En l'absence de ligand Hh, l'activité du récepteur Smo est réprimée par la protéine Ptc. Suite à l'identification du cholestérol comme ligand endogène potentiel de Smo, la régulation de ce récepteur par la protéine Ptc via la modulation de ce ligand a été proposée. L'homologie de la protéine Ptc avec des transporteurs de cholestérol tels que la protéine NPC1 et l'absence d'interaction directe entre les protéines Ptc et Smo, supportent cette hypothèse. Plusieurs modes d'action ont ainsi été suggérés (**Figure 11A-C**):

-la protéine Ptc pourrait modifier la distribution du cholestérol au sein de la membrane plasmique, le rendant inaccessible pour le récepteur Smo, en pompant le cholestérol en dehors de la membrane plasmique (Zhang et al., 2018) ou en agissant comme une flippase (Kowatsch et al., 2019). Le cholestérol étant largement présent au sein de la membrane plasmique, l'action de Ptc devrait être restreinte à un compartiment cellulaire, comme le cil primaire, plateforme importante pour la signalisation Hh chez les vertébrés (Corbit et al., 2005; Haycraft et al., 2005; Huangfu et al., 2003; Rohatgi et al., 2007)

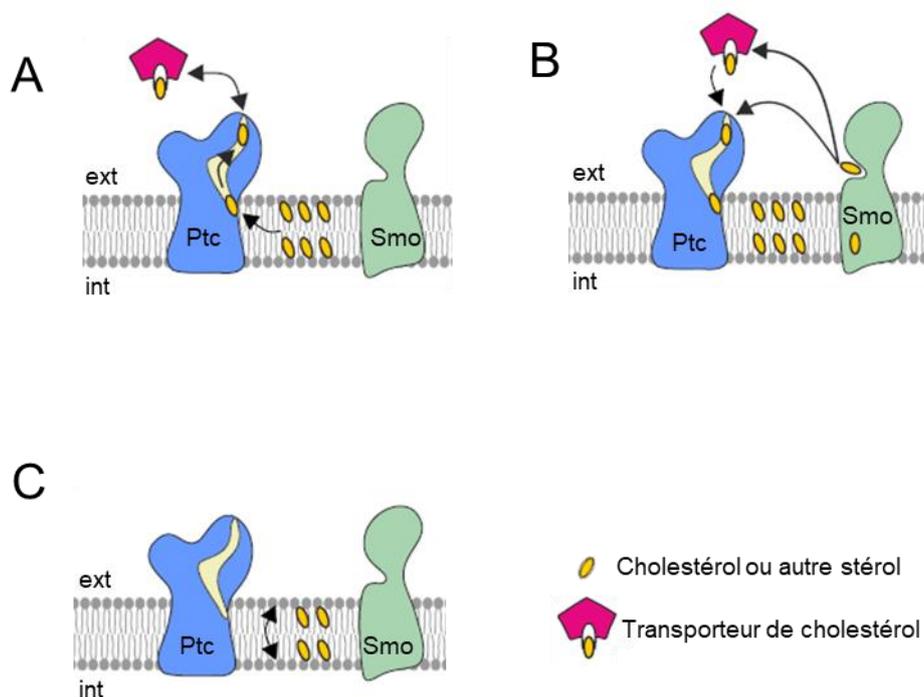
-la protéine Ptc pourrait retirer le cholestérol du domaine CRD du récepteur Smo, directement ou à l'aide d'une protéine de liaison aux stérols (Kowatsch et al., 2019)

-la protéine Ptc pourrait permettre l'entrée d'une molécule bloquant les modifications structurales de Smo induites par le cholestérol (Hu and Song, 2019).

Ainsi, la liaison du ligand Hh à la protéine Ptc empêcherait ce récepteur de moduler la distribution de cholestérol ou d'un autre stérol qui serait alors accessible pour activer le récepteur Smo. Des études supplémentaires seront nécessaires pour tester la validité de ces différents scénarios.

Un grand intérêt a été porté à la compréhension des transitions structurales associées à l'activation du récepteur Smo. Une altération du domaine de liaison ou l'ajout de glycosylation à l'interface des domaines CRD-TMD induit une augmentation de l'activité constitutive de Smo (Byrne et al., 2016) révélant l'importance de l'interaction entre ces deux domaines pour stabiliser la protéine Smo dans un état inactif. Une possible conformation active de Smo impliquerait un lien cation-pi, appelé « serrure ionique », localisé à l'extrémité cytoplasmique des segments TM6 et TM7 du domaine TMD (Huang et al., 2018). Chez des mutants constitutivement actifs du récepteur Smo, cette « serrure ionique » est brisée par des mutations oncogéniques connues

(Wright et al., 2019). En situation physiologique, l'activation de la protéine Smo romprait également cette liaison entraînant un déplacement des segments du domaine TMD, accompagné d'un léger mouvement du domaine CRD, permettant d'exposer une nouvelle surface d'interaction avec des seconds messagers (Deshpande et al., 2019; Wright et al., 2019). Xiao et al. (Xiao et al., 2017) proposent ainsi que la liaison de cholestérol à Smo entraînerait des modifications structurales telles que la rupture de la « serrure ionique ». Cette cholestéroylation de la protéine Smo est inhibée par la protéine Ptc et jouerait un rôle crucial dans la translocation ciliaire de Smo et sa signalisation chez l'embryon (Xiao et al., 2017).



**Figure 11 : Modèles de répression de l'activité du récepteur Smoothened par la protéine Patched**

(A) Le récepteur Patched (Ptc) pompe le cholestérol à l'extérieur de la cellule, le rendant inaccessible pour la protéine Smoothened (Smo). (B) Ptc retire le cholestérol du domaine riche en cystéines (CRD) de Smo, directement ou via une protéine de liaison au stérol telle qu'un transporteur de cholestérol. (C) Ptc exerce une action flippase modifiant la distribution membranaire de cholestérol et son accès à la protéine Smo. ext, milieu extracellulaire; int, milieu intracellulaire; d'après (Kowatsch et al, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2019; Hu and Song, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2019).

Comme de nombreux RCPGs, Smo est capable de former des homodimères (Zhao et al., 2007). En effet, une forme dimérique de la protéine Smo a été mise en évidence lors de la cristallographie de son domaine TMD (C. Wang et al., 2013). Cet homodimère a été proposé comme étant la forme fonctionnelle de la protéine Smo, responsable de ses effets biologiques. Cette hypothèse est soutenue par la présence de formes oligomériques de Smo dans les radeaux lipidiques de la membrane plasmique, localisation préférentielle du ligand Hh, pour permettre la transmission du signal Hh (D. Shi et al., 2013). De plus, la phosphorylation de la protéine Smo, induite lors de l'activation de la voie par la protéine Hh, conduit à la dimérisation du récepteur (Chen et al., 2010; Zhao et al., 2007). L'existence de cette forme dimérique fait apparaître la possibilité d'un autre site de liaison pour un potentiel ligand de Smo, à l'interface entre les deux monomères (**Figure 10B**).

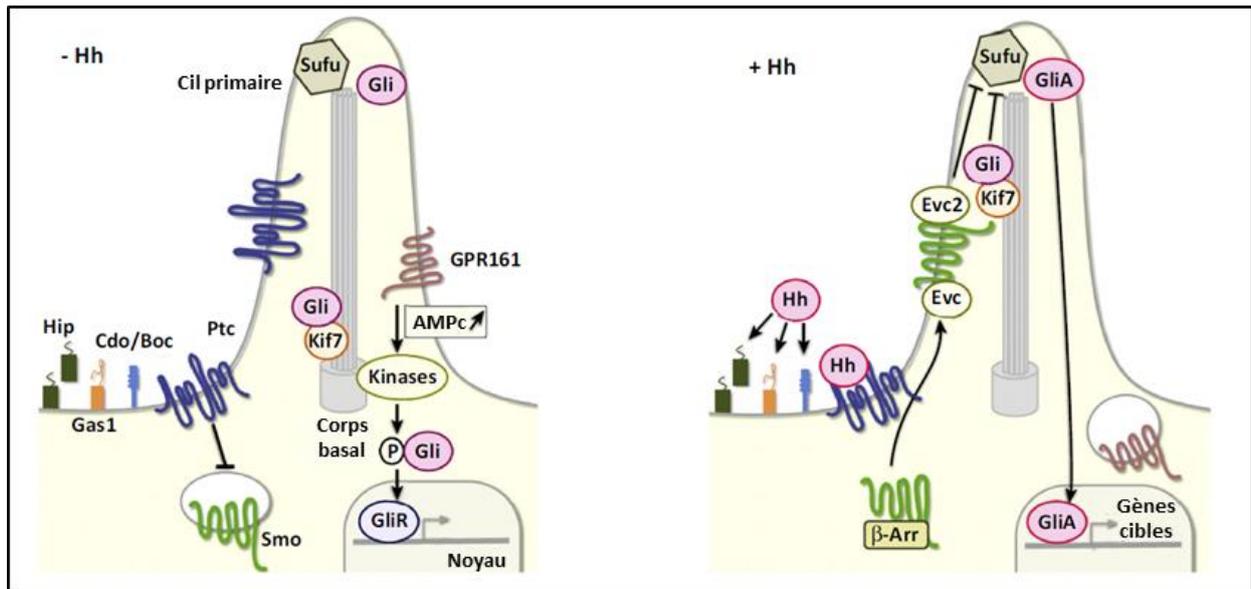
## **2. Transduction du signal**

La voie de signalisation Hh se distingue par la présence de nombreuses répressions : l'activité de la protéine Smo est inhibée par le récepteur Ptc, lui-même réprimé lors de la liaison de son ligand Hh. Cette voie présente également des boucles de régulations positives et négatives passant par la transcription de facteurs agonistes (Cdo, Boc, Gas1) et antagonistes (Ptc, Hhip), respectivement. Ces caractéristiques traduisent un contrôle subtil et complexe du niveau d'activation de cette voie.

### 2.1 Voie canonique

#### *2.1.1 Définition*

La voie Hh canonique s'apparente à la transmission du signal Hh passant par la liaison du ligand sur son récepteur Ptc, l'activation de la protéine Smo et des effecteurs cytoplasmiques, aboutissant à la transcription des gènes cibles de la voie Hh par les protéines à doigts de zinc Gli1, Gli2, Gli3 (glioma-associated oncogene) (Briscoe and Théron, 2013; Ruat et al., 2015) (**Figure 12**).



**Figure 12 : La voie Hedgehog canonique chez les vertébrés**

(-Hh) En absence de la protéine Hedgehog (Hh), le récepteur Patched (Ptc), présent dans le cil primaire, inhibe l'activité de la protéine Smoothened (Smo), notamment en empêchant sa translocation dans le cil primaire. Les facteurs de transcription Gli sont en complexe avec la kinésine Kif7, moteur protéique antérograde. La protéine Sufu (Suppressor of Fused) et des kinases telles que la PKA (protein kinase A) favorisent la transformation des protéines Gli en répresseurs transcriptionnels (GliR) qui vont inhiber la transcription des gènes cibles de la voie Hh. Un récepteur couplé aux protéine G (RCPG), GPR161, augmenterait les niveaux d'AMPc (Adenosine MonoPhosphate cyclique), entraînant l'activation de ces kinases. (+Hh) La liaison de la protéine Hh à son récepteur Ptc lève la répression exercée sur Smo. Les protéines transmembranaires Cdo/Boc et Gas1 sont capables de lier le ligand Hh et faciliteraient l'interaction Ptc/Hh. La protéine Hhip, existant sous forme transmembranaire et soluble, est un régulateur négatif de la voie Hh, qui séquestre la protéine Hh, l'empêchant de se lier à Ptc. La protéine Smo libre interagit avec la  $\beta$ -arrestine, qui, en association avec le complexe Evc-Evc2, va permettre la translocation de Smo dans le cil primaire. Ce déplacement conduit à l'inhibition de la protéine Sufu et la transformation des protéine Gli en activateurs transcriptionnels (GliA) qui vont induire la transcription des gènes cibles de la voie Hh, d'après (Ruat et al, *Trends Pharmacol. Sci.*, 2014).

Les facteurs Gli1-3 diffèrent par leur extrémité N-ter : Gli2 et Gli3 présentent un domaine répresseur absent chez Gli1 (Riobo and Manning, 2007; Ruiz i Altaba et al., 2007; Varjosalo et al., 2006). Ce dernier agit ainsi exclusivement comme activateur transcriptionnel tandis que Gli2 et Gli3 peuvent avoir une action activatrice ou répressive selon le contexte. Cependant, Gli2 est principalement un activateur tandis que Gli3 fonctionne majoritairement comme répresseur (Riobo and Manning, 2007; Ruiz i Altaba et al., 2007; Varjosalo et al., 2006). Les protéines Gli2 et Gli3 existent ainsi sous trois formes : répresseurs transcriptionnels clivés (Gli2/3R), précurseur inactif non clivé (Gli2/3FL) et activateurs transcriptionnels non clivés (Gli2/3A) (Aza-Blanc et al., 1997; Hui and Angers, 2011; Méthot and Basler, 1999; Wang et al., 2000).

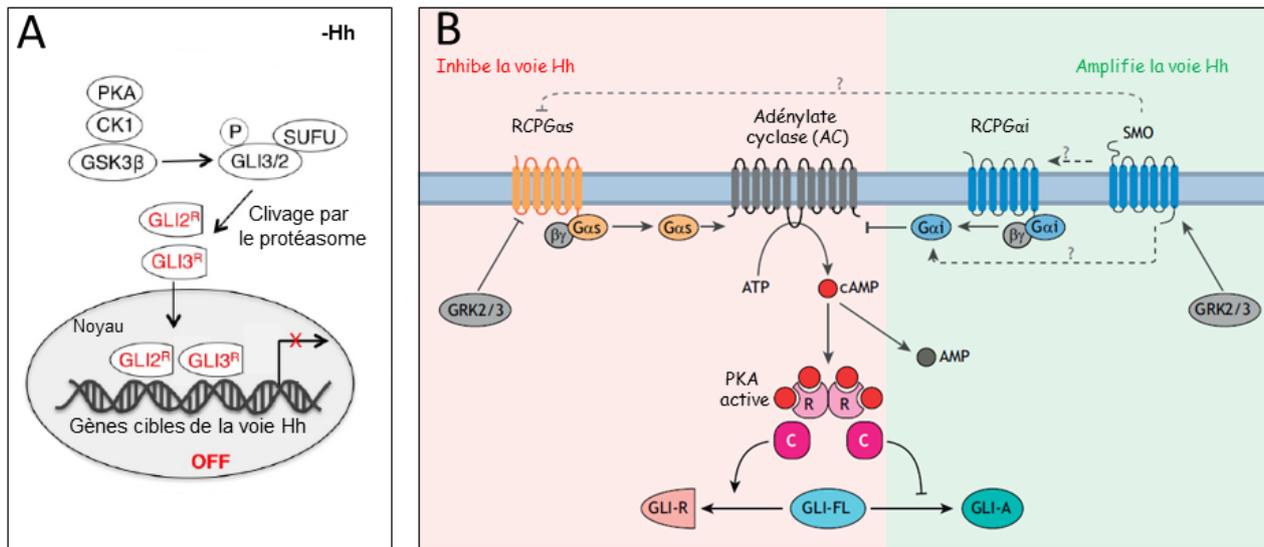
En situation physiologique, lors de l'absence de son ligand Hh, le récepteur Ptc exerce une inhibition sur l'activité de la protéine Smo. En parallèle, les facteurs de transcription Gli2-3 sont maintenus physiquement dans le cytoplasme par la protéine SuFu (Suppressor of Fused), les empêchant d'atteindre le noyau pour exercer leur fonction (Jia et al., 2009; Merchant et al., 2005). Les protéines Gli2-3 vont également être phosphorylées par les enzymes PKA (protéine kinase A), GSK3 (glycogène synthase kinase-3) et CK1 (casein kinase 1) (Kogerman et al., 1999; Niewiadomski et al., 2014; Pan and Wang, 2007; Wang and Li, 2006). Cette phosphorylation entraîne leur protéolyse partielle par le protéasome les transformant en répresseurs transcriptionnels qui, après translocation dans le noyau, inhiberont la transcription des gènes cibles de la voie Hh (Niewiadomski et al., 2014) **(Figure 13A)**.

La liaison de la protéine Hh à Ptc, interrompt la répression de l'activité de la protéine Smo. Le récepteur Smo actif va induire la dissociation du complexe SuFu/Gli2-3 et favoriser la formation de formes activatrices de ces facteurs de transcription (Humke et al., 2010). Les protéines Gli2-3 vont ainsi se diriger vers le noyau pour activer la transcription des gènes cibles de la voie Hh dont Gli1, activateur transcriptionnel, qui va permettre l'amplification du signal Hh (Ruat et al., 2015).

### 2.1.2 Les effecteurs intracellulaires

Les évènements cytoplasmiques ayant lieu entre la levée d'inhibition du récepteur Smo et l'activation des facteurs de transcription Gli2/3 sont encore mal connus chez les vertébrés. Comme d'autres RCPGs, la protéine Smo est capable d'interagir avec des protéines G $\alpha$ i hétérotrimériques (DeCamp et al., 2000; Masdeu et al., 2006; Riobo et al., 2006; Shen et al., 2013). En effet, Qi et al. (X. Qi et al., 2019) rapportent que la liaison du SAG, agoniste synthétique de Smo, induit le couplage du récepteur avec une protéine G $\alpha$ i. La toxine pertussique (PTX), un agent empêchant les protéines G $\alpha$ i de se lier aux RCPGs, a également permis de mettre en évidence l'importance de ce couplage Smo/G $\alpha$ i dans l'activation des protéines de la famille Gli dans les lignées fibroblastique NIH3T3 et mésenchymateuse C3H10T1/2 (Riobo et al., 2006; Shen et al., 2013). De même, la répression par cet agent de la prolifération des précurseurs de cellules granulaires induite par la protéine Shh, démontre la nécessité de protéines G $\alpha$ i pour ce processus (Barzi et al., 2011). Chez le poisson-zèbre, la PTX phénotype les altérations retrouvées lors d'une délétion de Shh. De même, dans les cellules S2 de drosophile, la délétion de protéine G $\alpha$ i par siRNA empêche l'activation par le ligand Hh de Ci, homologue invertébré des protéines Gli1-3, démontrant l'importance de ces protéines hétérotrimériques dans la voie Hh chez les invertébrés (Ogden et al., 2008). L'activation de ces protéines G $\alpha$ i induit une diminution des niveaux intracellulaires d'AMPc (adenosine monophosphate cyclique) (Ogden et al., 2008; Riobo et al., 2006) entraînant une inhibition de l'activité de la PKA, régulateur négatif des protéines Gli2/3 (**Figure 13B**). Le couplage Smo/G $\alpha$ i serait donc une des premières étapes se produisant après l'activation du récepteur.

D'autres effecteurs de la voie ont été identifiés tels que la protéine GPR161, un RCPG localisé à la membrane du cil primaire, qui participerait également à la régulation de l'activité de la PKA. Ce RCPG active la protéine hétérotrimérique G $\alpha$ s permettant d'augmenter les niveaux d'AMPc et ainsi de promouvoir l'activation de la PKA. Il favoriserait également la production de la forme répressive du facteur de transcription Gli3 (Mukhopadhyay et al., 2013). Le récepteur GPR161 et la protéine G $\alpha$ s sont donc des régulateurs négatifs de la voie Hh (**Figures 12 et 13B**). La liaison du ligand Hh va induire l'exclusion de GPR161 du cil primaire par l'intermédiaire de la protéine GRK2 (RCPG kinase 2) (Pal et al., 2016; Pitcher et al., 1998).



**Figure 13 : La régulation des facteurs de transcription Gli**

(A) En absence de ligand Hedgehog (Hh), les protéines GLI2 et GLI3 sont phosphorylées par les kinases PKA (proteine kinase A), CK1 (casein kinase 1) et GSK3 $\beta$  (glycogen synthase kinase 3 $\beta$ ). Ces phosphorylations créent des sites de liaisons pour des ubiquitine ligases sur les protéines GLI2 et GLI3 entraînant leur protéolyse partielle par le protéasome et ainsi la formation de leurs formes de répresseurs transcriptionnels (GLI3/2R). Après translocation dans le noyau, les protéines GLI3/2R inhibent la transcription des gènes cibles de la voie Hh, d'après (Pietrobono et al, *Front. Genet.*, 2019). (B) La PKA est un inhibiteur des facteurs de transcription GLI, composée de sous-unités catalytiques (C) et régulatrices (R). Elle inhibe la formation de leurs formes activatrices (GLI-A) et favorisent la production des formes répressives (GLI-R) à partir des précurseurs non clivés (GLI-FL). Ainsi, les protéines qui augmentent l'activité de la PKA (fond rouge) inhibent la voie Hh tandis que celles qui la diminuent (fond vert) amplifient la voie Hh. Les récepteurs couplés aux protéines G $\alpha$ i (RCPG $\alpha$ i) réduisent la synthèse d'AMPc (Adenosine MonoPhosphate cyclique) par l'adénylate cyclase (AC) entraînant une diminution de l'activité de la PKA et sont donc des régulateurs positifs de la voie Hh. A l'inverse, les récepteurs couplés aux protéines G $\alpha$ s (RCPG $\alpha$ s), comme GPR161, augmentent la synthèse d'AMPc par l'AC favorisant donc l'activité de la PKA. Ce sont donc des inhibiteurs de la voie Hh. Les kinases GRK2 et GRK3 sont décrites comme de puissants régulateurs positifs de la voie Hh. Elles agiraient en réduisant l'activité des RCPG $\alpha$ s ou directement en favorisant l'activité de Smoothened (Smo). Le récepteur Smo pourrait moduler l'activité de la PKA de façon directe, en activant des protéines G $\alpha$ i, en inhibant l'activité de RCPG $\alpha$ s ou en stimulant des RCPG $\alpha$ i, d'après (Kong et al, *Development*, 2019).

Des travaux supplémentaires sont nécessaires pour examiner une éventuelle régulation de ces protéines (GPR161, *Gαs*, GRK2) par la protéine Smo afin de permettre la transmission du signal Hh dans le cytoplasme de la cellule cible et parvenir à l'activation des facteurs Gli1-3.

### *2.1.3 Importance du cil primaire chez les vertébrés*

Le cil primaire est une structure microtubulaire unique semblable à une antenne immobile présente sur la surface de la plupart des types cellulaires chez l'embryon et l'adulte (Bettencourt-Dias et al., 2011; Louvi and Grove, 2011). Il détecte les signaux externes permettant à la cellule de s'informer sur son environnement (Gerdes et al., 2009; Satir and Christensen, 2007). Cette structure est constituée d'un corps basal et d'un axonème séparés par des fibres de transition formant une barrière perméable avec le reste de la cellule. Le transport de protéines le long du cil se fait via une machinerie constituée de deux complexes A et B faisant intervenir le moteur rétrograde dynéine et le moteur antérograde kinésine (aussi appelé complexe Kif3) (Rosenbaum and Witman, 2002; Taschner et al., 2012). Huangfu et al. (Huangfu et al., 2003) ont démontré que la voie Hh est dépendante du cil primaire qui constitue une plateforme de transduction pour cette voie et qui est indispensable au cours du développement neural mais également dans la mise en place de maladies génétiques et de cancers. En effet, certains composants de la machinerie de transport intraflagellaire sont cruciaux pour la spécification ventrale par la voie Hh des cellules du tube neural chez la souris (Huangfu et al., 2003). Cette importance du cil primaire est spécifique à la voie Hh chez les vertébrés.

De façon intéressante, Smo, Ptc, Gli1-3 et SuFu sont présents au sein du cil primaire (Corbit et al., 2005; Haycraft et al., 2005; Huangfu and Anderson, 2006; Rohatgi et al., 2007). Le ligand Shh a également été identifié à proximité de la base du cil primaire dans les progéniteurs neuraux, suite à l'activation de la voie Hh dans le tube neural (Chamberlain et al., 2008). Il a ainsi été proposé que la répression de Smo par Ptc soit médiée par son exclusion hors du cil primaire. Suite à la liaison de Shh, Ptc quitte le cil primaire et Smo s'y introduit. La  $\beta$ -arrestine, une protéine de structure, va médier l'interaction de Smo avec le moteur kinésine Kif3a et le complexe Evc-Evc2 pour permettre la translocation du récepteur dans le cil (Kovacs et al., 2008; Rohatgi et al., 2007; Ruat

et al., 2014). La phosphorylation de l'extrémité C-ter de Smo par les sérine/thréonine kinases GRK2 et CK1 intervient également pour induire l'activation du récepteur et son accumulation dans le cil primaire (Friedland-Little et al., 2011). Une fois dans le cil, Smo va bloquer l'action de SuFu, régulateur négatif des protéines Gli et ainsi promouvoir la formation de formes activatrices de ces facteurs de transcription. Le moteur kinésine Kif7, appartenant à la machinerie de transport intraflagellaire, participe également à la transduction de la voie Hh. En absence de Shh, Kif7 est localisé à la base du cil où il forme un complexe notamment avec les protéines Gli et favorise leur transformation en répresseurs transcriptionnels. Lorsque Shh est présent, Kif7 se déplace au sommet du cil, bloque SuFu permettant l'accumulation et l'activation des protéines Gli (Endoh-Yamagami et al., 2009; Liem et al., 2009) (**Figure 12**). Enfin, des études sont en cours pour analyser le lien entre la voie Hh et le cil primaire dans les ciliopathies humaines et les modèles murins correspondants.

## 2.2 Voies non canoniques

Parallèlement à la voie canonique, des signalisations Hh souvent caractérisées par une absence de transcription médiée par les facteurs Gli, ont été décrites (Ruat et al., 2015). Ces voies, dites « non canoniques », correspondent souvent à des événements rapides et non transcriptionnels. Elles font intervenir au moins un des acteurs principaux de la signalisation Hh : les protéines Smo, Ptc ou Hh (**Figure 14A-J**).

### *2.2.1 Chez l'embryon*

Au cours de l'embryogénèse, plusieurs voies Hh non canoniques participent à la régulation du guidage axonal des neurones de la moelle épinière. En effet, la protéine Shh exerce une action répulsive sur les axones post-commissuraux le long de la moelle épinière, indépendamment des protéines Gli, Smo et Ptc. Cet effet est médié uniquement par son partenaire Hhip (Bourikas et al., 2005). Une régulation négative de la croissance d'axones, par la protéine Shh, a également été rapportée au niveau de la rétine d'embryon de poulet. Cette activité est associée à une réduction des niveaux intracellulaires d'AMPc et semble spécifique aux axones rétiniens. En effet, la protéine Shh n'affecte pas les neurites au sein d'explants de tube neural, ni de ganglion de

racine dorsale. Ces effets suggèrent que le ligand Shh, présent aux abords du chiasma optique, pourrait participer au bon cheminement des axones des cellules ganglionnaires rétiniennes dans la ligne médiane (Trousse et al., 2001). Une autre voie Hh non canonique est initiée par l'activation du récepteur Smo suite à la liaison de Shh aux protéines Ptc et Boc (Charron et al., 2003; Okada et al., 2006). La protéine Smo induit alors l'activation de kinases Src, au sein du cône de croissance des axones commissuraux. Ces enzymes entraînent des modifications du cytosquelette poussant les axones vers le gradient de Shh et ainsi vers la ligne médiane (Yam et al., 2009). L'activation du récepteur Smo par la protéine Shh induit également une voie dépendante des protéines liant le GTP, permettant de mobiliser le  $Ca^{2+}$  issu de stocks intracellulaires mais également de sources externes. La protéine Shh entraîne ainsi des pics de  $Ca^{2+}$  au niveau du cil primaire des neurones de la moelle épinière en développement (Belgacem and Borodinsky, 2011). Cette activité pourrait être impliquée dans la modulation de neurotransmetteurs par le ligand Shh dans ces neurones. Chez l'embryon de poulet, des travaux ont également mis en évidence une signalisation, médiée par le récepteur Ptc, conduisant à une mort cellulaire par apoptose en absence de ligand Shh. Cette voie, indépendante de Smo (Thibert et al., 2003) et des facteurs Gli, engage un complexe pro-apoptotique comprenant la caspase 9, recrutée par le récepteur Ptc. En complément de l'effet positif de Shh, cette réponse de Ptc participerait à la différenciation cellulaire et au bon développement de la moelle épinière (Mille et al., 2009; Thibert et al., 2003). En accord avec cette action pro-apoptotique de Ptc, une inhibition de la prolifération cellulaire a été rapportée suite à l'interaction du récepteur avec la cycline B1, sous-unité régulatrice du MPF (mitosis promoting factor) (Barnes et al., 2001).

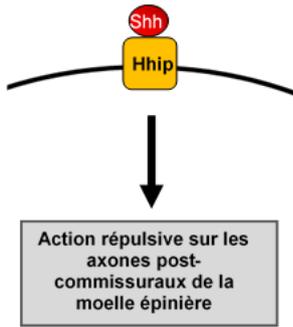
### *2.2.2 Chez l'adulte*

Des travaux, réalisés principalement sur des lignées cellulaires, décrivent des voies Hh non canoniques présentes chez l'adulte. De façon similaire à l'embryon, l'activation de la protéine Smo dans les lignées de fibroblastes embryonnaires murins NIH3T3 et MEFs conduit à des modifications de leur cytosquelette. Le récepteur Smo actif interagit avec des protéines  $G\alpha i$  entraînant l'activation des GTPases Rac et RhoA. Ces enzymes vont induire des changements de cytosquelette aboutissant à la migration de ces cellules (Bijlsma et al., 2007; Polizio et al., 2011). Cette voie indépendante de l'activité transcriptionnelle des protéines Gli, est également rapportée

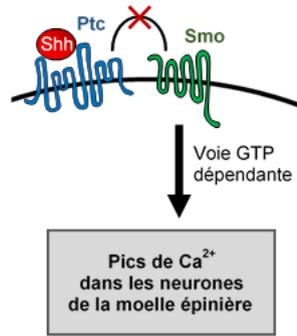
dans des lignées cellulaires de cholangiocarcinomes humains et rongeurs où l'activation du récepteur Smo conduit à la formation de filopodes et lamellipodes (Razumilava et al., 2014). En utilisant une signalisation non canonique similaire, les protéines Hh induisent la formation de fibres de stress au sein des cellules endothéliales (Chinchilla et al., 2010; Kanda et al., 2003). D'autre part, l'application du fragment N-ter de la protéine Shh sur des neurones du noyau subthalamique induit une inhibition de leur activité électrique, suivie d'une forte et courte stimulation. Cette réponse apparaît seulement quelques minutes suite à l'application du ligand la rendant incompatible avec un effet transcriptionnel (Bezard et al., 2003; Pascual et al., 2005). Elle serait impliquée dans la modulation de NT par la protéine Hh au sein des neurones subthalamiques.

Enfin, une voie Hh non canonique a également été rapportée, au sein d'adipocytes matures obtenus par différenciation de la lignée de précurseurs adipocytaires 3T3-L1, où le récepteur Smo actif entraîne une entrée rapide de  $Ca^{2+}$  via des canaux calciques de type L. L'augmentation des niveaux de  $Ca^{2+}$  permet l'activation de la kinase Camkk2 (Calcium/Calmodulin Dependent protein Kinase Kinase 2) conduisant à la phosphorylation et à l'activation de l'AMPK. Cette cascade aboutit à une entrée rapide, insulino-indépendante de glucose via les transporteurs de glucose GLUT4. Cette voie non canonique pousse les cellules à adopter un métabolisme basé sur une glycolyse aérobie (Teperino et al., 2012; Warburg, 1956; Ward and Thompson, 2012). Cette réponse nécessite une translocation de Smo au niveau du cil primaire et a également été rapportée dans des myocytes humains, dans le tissu adipeux brun et le tissu musculaire murin (Teperino et al., 2012). Une étude ultérieure démontre l'activation de cette signalisation non canonique par des microparticules contenant le ligand Shh, au sein des précurseurs adipocytaires 3T3-L1 où elle exerce des effets anti-adipogéniques (Fleury et al., 2016). Un agoniste de Smo, le GSA-10, peut également stimuler cette voie non canonique dans les cellules 3T3-L1 et est traité plus loin (voir §II.3.3). De façon intéressante, l'axe non canonique Smo-AMPK a également été décrit dans l'induction de la prolifération des précurseurs de cellules granulaires du cervelet (CGP). Dans cet autre type cellulaire, la voie Shh stimule la synthèse de polyamines via la signalisation non canonique Smo-AMPK entraînant la phosphorylation de la protéine CNBP (Cellular Nucleic acid Binding Protein) et son association stabilisatrice avec SuFu. L'activation de CNBP induit l'expression de l'ornithine décarboxylase (ODC), enzyme à l'origine du métabolisme des polyamines conduisant à la prolifération des CGP (D'Amico et al., 2015).

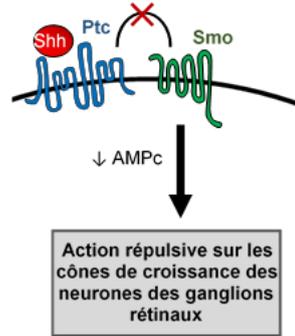
A



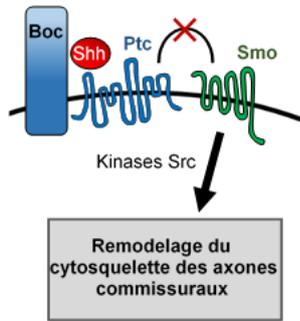
B



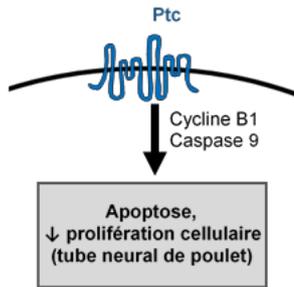
C



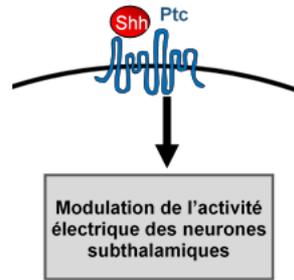
D



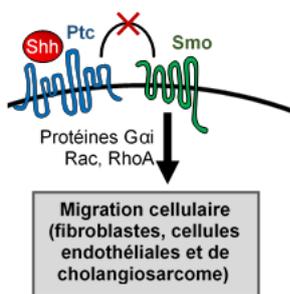
E



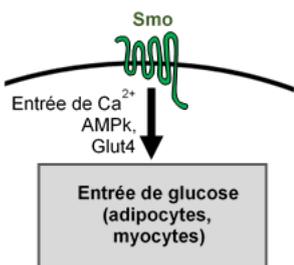
F



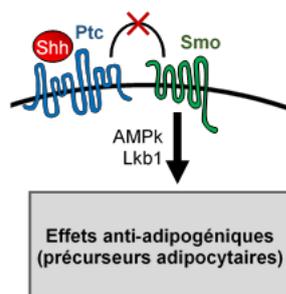
G



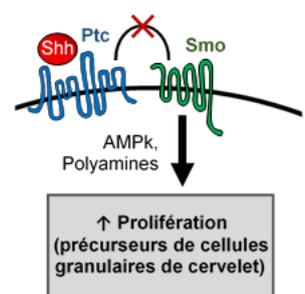
H



I



J



## Figure 14 : Les voies Hedgehog non canoniques

(A) La liaison de Sonic Hedgehog (Shh) à la protéine Hhip (Hedgehog interacting protein) permet une action répulsive du ligand sur les axones post-commissuraux de la moelle épinière chez l'embryon (Bourikas et al, *Nat. Neurosci.*, 2005). (B) Le récepteur Smoothened (Smo) activé suite à la liaison de Shh à Patched (Ptc), induit des pics de  $Ca^{2+}$  dans le cil primaire des neurones post-mitotiques de la moelle épinière au cours du développement (Belgacem and Borodinsky, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2011). (C) Dans la rétine d'embryon de poulet, la protéine Shh exerce un effet chémorépulseur sur la croissance des axones des cellules ganglionnaires de la rétine et influence ainsi leur migration. Cet effet s'accompagne d'une diminution des niveaux d'AMPc (Adenosine MonoPhosphate cyclique) (Trousse et al, *Development*, 2001). (D) La chémoattraction du ligand Shh sur les axones pré-commissuraux des neurones de la moelle épinière en développement, implique les kinases Src stimulées par le récepteur Smo actif conduisant à des modifications du cytosquelette de ces axones (Yam et al, *Neuron*, 2009). (E) En l'absence de protéine Shh, le récepteur Ptc recrute un complexe pro-apoptotique comprenant la caspase 9 et entraîne l'apoptose de la cellule (Thibert et al, *Science*, 2003). De plus, Ptc séquestre la cycline B1, composant du MPF (mitosis promoting factor) conduisant à une diminution de la prolifération cellulaire (Barnes et al, *EMBO J.*, 2001). (F) L'application de protéine Shh sur des tranches de cerveau adulte, comprenant les noyaux subthalamiques, induit une inhibition suivie d'une forte augmentation de l'activité électrique de ces neurones démontrant la capacité du ligand Shh à moduler l'activité électrique de neurones matures (Pascual et al, *Eur. J. Neurosci.*, 2005; Bezard et al, *FASEB J.*, 2003). (G) L'interaction du récepteur Smo actif avec des protéines G $\alpha$ i entraîne l'activation des GTPases Rac et RhoA modulant le cytosquelette d'actine pour induire une migration cellulaire (Polizio et al, *J. Biol. Chem.*, 2011; Chinchilla et al, *Cell Cycle*, 2010; Razumilava et al, *J Heptal*, 2013). (H) L'activation de Smo stimule l'entrée de glucose dans la cellule par le transporteur GLUT4. Cette réponse, indépendante de l'insuline, est médiée par une voie non canonique impliquant l'entrée de  $Ca^{2+}$  et un complexe comprenant l'AMPK (AMP kinase) et Lkb1 (Teperino et al, *Cell*, 2012). (I-J) L'axe Smo-AMPK est impliqué dans les effets anti-adipogéniques de microvésicules Hh<sup>+</sup> dans les précurseurs adipocytaires (I) et permet la prolifération des précurseurs de cellules granulaires du cervelet (J) (Fleury et al, *Sci. Rep.*, 2016; D'Amico et al, *Dev. Cell*, 2015).

### 3. La voie de signalisation Hh est présente dans le cerveau de rongeurs

Dès 1998, notre équipe a mis en évidence la présence d'une signalisation Shh active dans le cerveau de rat adulte (Traiffort et al., 1998). Cette découverte a ouvert la voie à de nombreux travaux afin de déterminer les fonctions de cette signalisation chez l'adulte (pour revue, (Garcia et al., 2018)).

#### 3.1 Les rôles de la voie Hh dans le cerveau de rongeur postnatal et adulte

##### *3.1.1 Etablissement des communications synaptiques dans le cortex*

Des études portant sur différentes lignées reportrices ( $Shh^{CreER-R26YFP}$ ,  $Shh^{CreER-R26^{lacZ}}$ ), des analyses par hybridation *in situ* (HIS) ou des expériences d'immunohistochimie et de Western blot ont suggéré l'expression des transcrits et de la protéine Shh dans des neurones localisés dans la couche V du cortex, chez la souris adulte (Dorota Charytoniuk et al., 2002; Garcia et al., 2010; Ihrie et al., 2011; Traiffort et al., 2001) (**Figure 15A**).

Le co-récepteur de Shh, Boc, a été identifié dans des neurones des couches corticales II/III dont les projections contactent les cellules  $Shh^+$  de la couche V. Le ligand Shh modulerait l'activité de Boc et la mise en place de connexions entre les neurones de la couche V et des partenaires pré-synaptiques présents dans les couches superficielles (II/III) (Harwell et al., 2012) (**Figure 15A**). Hill et al. (Hill et al., 2019) ont mis en évidence l'expression de *Gli1*, gène cible de la voie Shh, dans une sous-population d'astrocytes, localisée dans les couches IV et V du cortex. La délétion de *Smo* dans ces astrocytes entraîne une altération de l'organisation synaptique au sein de la couche V du cortex. Ainsi le ligand Shh produit par les neurones corticaux participerait au rôle clé des astrocytes  $Gli1^+$  dans l'architecture synaptique au sein du cortex, chez l'animal en postnatal. Il est à noter que la perte de *Smo* entraîne l'acquisition par les astrocytes de certains traits caractéristiques d'une réaction inflammatoire (surexpression de la GFAP et hypertrophie) suggérant un rôle de la voie Shh dans le maintien de l'homéostasie de ces cellules gliales (Garcia et al., 2010).

##### *3.1.2 Régulation des cellules souches neurales adultes*

Dans la zone sous-granulaire du gyrus denté de l'hippocampe, les cellules souches neurales (CSNs) expriment *Ptc*, *Smo* et *Gli1* et sont ainsi capables de répondre au signal Shh (Ahn and Joyner, 2005; Balordi and

Fishell, 2007; Masdeu et al., 2007; Palma et al., 2005). En modulant la prolifération de ces cellules, la voie de signalisation Shh participe à la régulation de la neurogénèse hippocampique (Breunig et al., 2008; Y.-G. Han et al., 2008; Lai et al., 2003). Chez la souris adulte, l'expression de Shh a été mise en évidence dans des neurones calrétinine<sup>+</sup> (CR<sup>+</sup>) présents dans le hile du gyrus denté (Gonzalez-Reyes et al., 2019) (**Figure 15B**). Des travaux antérieurs ont également rapporté la présence de Shh dans cette région en postnatal (Li et al., 2013; Machold et al., 2003). Le ligand pourrait également provenir de la région subpalliale du septum ou de l'épiderme, et serait alors acheminé par transport axonal ou par les plaquettes du sang, respectivement (Choe et al., 2015; Traiffort et al., 2001). D'autres rôles ont été proposés pour le ligand Shh produit par ces neurones CR<sup>+</sup>, notamment dans la migration des précurseurs neuronaux dans la couche de cellules granulaires. Le ligand serait également capable de moduler la libération de glutamate par les neurones hippocampiques et pourrait exercer un effet neuroprotecteur (Feng et al., 2016; Gonzalez-Reyes et al., 2019).

La voie de signalisation Shh a été décrite dans la zone sous-ventriculaire des ventricules latéraux (ZSV), autre aire de neurogénèse chez l'adulte (Ahn and Joyner, 2005; Balordi and Fishell, 2007; D. Charytoniuk et al., 2002; Garcia et al., 2010; R. Petrova et al., 2013). Des études portant sur la délétion de Smo dans les CSNs Nestin<sup>+</sup> de cette région ont démontré l'importance de la voie Shh dans l'établissement de la ZSV mais également dans son bon fonctionnement chez l'adulte (Balordi and Fishell, 2007; Machold et al., 2003). En effet, l'activation de la voie dans les CSNs de cette région favorise les divisions symétriques de ces cellules entraînant l'augmentation de cette population cellulaire (Ferent et al., 2014). La voie Shh intervient également dans la multiplicité des sous-types d'interneurones produits par les cellules de la ZSV et s'intégrant dans le bulbe olfactif (Ihrie et al., 2011; Merkle et al., 2014). L'expression élevée de Gli1 dans une population restreinte de CSNs et progéniteurs dans la partie ventrale de la ZSV est ainsi spécifiquement associée à la production d'interneurones s'intégrant dans la couche granulaire profonde du bulbe olfactif (Ihrie et al., 2011). D'autre part, le ligand Shh présente des propriétés chémoattractives vis-à-vis des neuroblastes de la ZSV et va ainsi moduler la migration de ces cellules Ptc<sup>+</sup> (Angot et al., 2008; D. Charytoniuk et al., 2002). L'expression du ligand Shh à l'origine de ces activités a été rapportée au sein de la ZSV et dans le liquide céphalorachidien adjacent

(Angot et al., 2008) mais également dans quelques neurones présents à l'extrémité ventrale des ventricules latéraux (Ihrie et al., 2011) (**Figure 15C**).

La modulation pharmacologique des cellules de la ZSV par un agoniste de Smo serait associée à une induction de l'expression de Gli1 et une augmentation de la prolifération cellulaire dans la ZSV (Machold et al., 2003). A l'inverse, l'injection systémique de cyclopamine, un antagoniste de Smo, entraîne une diminution de Gli1 et de Gli3 tandis que la prolifération des cellules de la ZSV est également réduite (Banerjee et al., 2005). Ces expériences mettent en avant le potentiel d'utilisation de ces cellules en thérapeutique via une modulation pharmacologique de la voie Shh.

### *3.1.3 Spécification des astrocytes du cervelet*

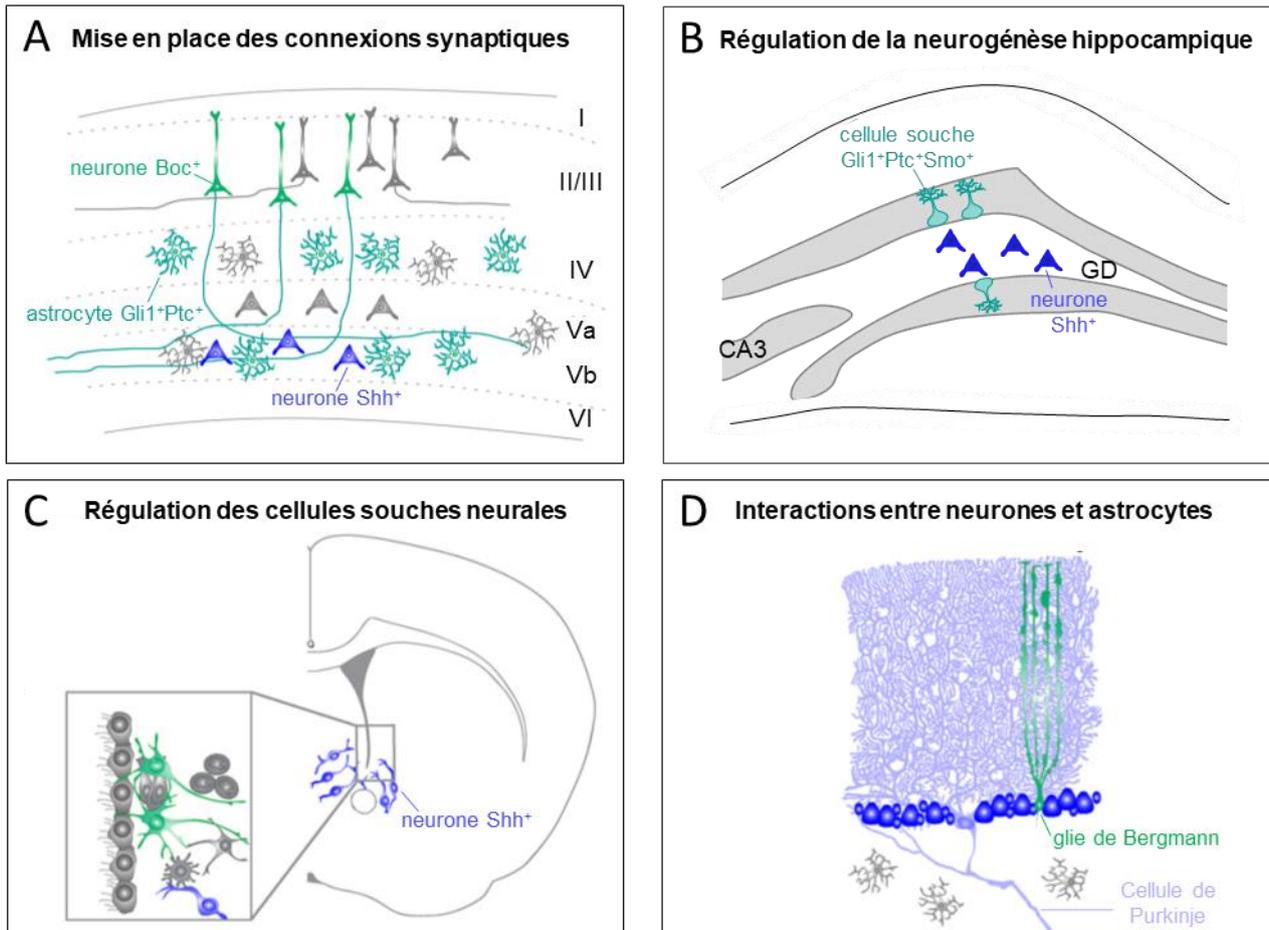
Au sein du cervelet de rat adulte, notre équipe a décrit la distribution des transcrits de Shh, Ptc et Smo dans la couche des cellules de Purkinje (Traiffort et al., 1999). La présence de la protéine Shh a également été suggérée dans des neurones à l'aide de l'anticorps monoclonal 5E1, produit chez la souris et dirigé contre la forme active de Shh (Dahmane and Ruiz i Altaba, 1999; Gritli-Linde et al., 2001). Avec un autre anticorps dirigé contre Shh (produit par Scales S.J., Genentech, #AB\_2716569), Farmer et al. (Farmer et al., 2016) mettent en évidence un marquage des cellules de Purkinje. Des signaux immunoréactifs sont également présents dans la couche de cellules granulaires, cependant dépourvue de transcrit Shh.

Dans le cervelet de souris adulte, l'expression de Smo, Ptc et Gli1 a été identifiée au sein d'astrocytes (Cahoy et al., 2008; Farmer et al., 2016; Garcia et al., 2010; Ihrie et al., 2011). Dans cette région, deux classes d'astrocytes sont présentes : la glie de Bergman et les astrocytes velates. Ces deux populations se distinguent par leur profil d'expression génomique et par leur morphologie (Farmer and Murai, 2017). Contrairement aux astrocytes velates, la glie de Bergman présente une proximité importante avec les cellules de Purkinje Shh<sup>+</sup>. Le ligand jouerait ainsi un rôle important dans le maintien de l'identité cellulaire de ces astrocytes (Bellamy, 2007; Saab et al., 2012; Takayasu et al., 2006; F. Wang et al., 2012). En effet, l'activation de la voie Shh dans la glie de Bergman induit l'expression de marqueurs enrichis dans cette population astrocytaire tels que GLAST et Kir4.1. Au sein des astrocytes velates, l'induction de la voie Shh entraîne également l'expression de gènes

caractéristiques de la glie de Bergman (Farmer et al., 2016). La voie Shh interviendrait donc dans le maintien des différentes populations astrocytaires au sein du cervelet adulte (**Figure 15D**).

### 3.1.4 Lignage oligodendrocytaire

La voie Shh participe à la régulation de la vague d'oligodendrogénèse ayant lieu en période postnatale (Traiffort et al., 2016). En effet, des études suggèrent que des oligodendrocytes seraient produits à partir de progéniteurs neuraux Gli1<sup>+</sup> présents dans la ZSV (Sanchez and Armstrong, 2018; Tong et al., 2015). De plus, la suppression de Smo au sein des progéniteurs Gli1<sup>+</sup> entraîne une diminution de la production d'oligodendrocytes matures dans le corps calleux (Tong et al., 2015) mettant en avant l'importance de la voie Shh pour le lignage oligodendrocytaire. En accord avec ces travaux, le traitement de culture d'OPCs issus de stades embryonnaires tardifs, avec un agoniste de Smo montre une augmentation des cellules Olig2<sup>+</sup> (Kessar et al., 2004). De plus, une augmentation de précurseurs oligodendrocytaires a été rapportée lors de l'administration de Shh dans le cortex et le corps calleux chez l'adulte (Loulier et al., 2006). L'action de la voie Shh sur la production d'OPCs dans le cerveau antérieur ne fait pas intervenir Gli2 (Qi et al., 2003) et passerait par la diminution de l'acétylation des histones (Wu et al., 2012). L'action de Shh sur les OPCs dépend également des facteurs FGF. En effet, la phosphorylation des MAPk (mitogen-activated protein kinases) par FGF est nécessaire à la génération d'OPC, induite par Shh (Furusho et al., 2011; Kessar et al., 2004). Cependant une contradiction sur l'importance de la voie Shh dans le lignage oligodendrocytaire, est apportée par la présence de myélinisation chez des mutants Gli1<sup>-/-</sup> (Samanta et al., 2015). En effet, ces résultats indiquent que l'absence de Gli1, et par conséquent d'une voie Shh canonique, ne serait pas délétère pour la formation d'oligodendrocytes ni leur fonction de myélinisation. L'utilisation de modèles génétiques avec des délétions de Gli1 à différents temps dans ces études pourrait expliquer cette divergence qui pourrait également être liée à l'activation de voies Shh non canoniques dans différents types cellulaires (astrocytes, cellule souches, OPCs) selon le modèle de démyélinisation étudié (Laouarem and Traiffort, 2018). Chez l'Homme, l'obtention d'oligodendrocytes *in vitro* à partir de progéniteurs neuraux de fœtus dérivés de la ZSV est dépendante de la voie Shh (Jakovcevski et al., 2009; Mo and Zecevic, 2009; Ortega et al., 2013).



**Figure 15 : Les fonctions de la voie Sonic Hedgehog dans le cerveau de rongeur postnatal et adulte**

(A) Dans le cortex postnatal, les neurones situés dans la couche corticale profonde V expriment Sonic Hedgehog (Shh, bleu). Le ligand guide la formation de synapses entre ces neurones et les projections de neurones  $Boc^+$  (vert) localisés au sein des couches II/III. Une sous-population d'astrocytes exprimant Gli1 (vert turquoise) est également présente dans le cortex. (B) Dans le hile du gyrus denté (GD) de l'hippocampe, des neurones exprimant Shh participent à la régulation des cellules souches neurales (CSNs) présentes dans cette région. (C) La voie Shh, indiquée par l'expression de Gli1 dans les CSNs et progéniteurs neuraux, est cruciale pour la régulation de la division cellulaire et la spécification de ces cellules. Dans la zone sous-ventriculaire, Gli1 est présent dans une population de CSNs/progéniteurs (vert) localisés dans la partie ventrale. Des neurones, situés à l'extrémité du ventricule latéral, constituent une source possible de ligand Shh (bleu). (D) Le ligand Shh produit par les cellules de Purkinje (mauve) induit l'expression de gènes spécifiques aux cellules de la glie de Bergmann (vert) les différenciant des astrocytes velates (gris), autre population gliale du cervelet. Les cellules  $Shh^+$  sont indiquées en bleu et les cellules répondant au ligand en vert, d'après (Garcia et al, *J. Neurosci.*, 2018).

## 3.2 Les pathologies associées à la voie Hedgehog

### *3.2.1 Malformations congénitales*

Durant l'embryogénèse, la voie Hh joue un rôle crucial dans la formation de la région craniofaciale dont les principaux acteurs sont les cellules de la crête neurale crânienne (CCN). Ces cellules, issues du tube neural dorsal, vont migrer antérieurement pour permettre l'établissement des différentes structures du visage (Cerny et al., 2004; Helms et al., 2005).

Des mutations génétiques, altérant la physiologie des CCN, peuvent conduire à des malformations des tissus dérivés. Elles constituent un groupe de pathologies nommées neurocristopathies (Bolande, 1974). La voie de signalisation Hh est impliquée dans plusieurs de ces affections. L'hypertélorisme est un exemple de neurocristopathie. Cette malformation est définie par un espacement plus important des yeux et un nez plus large. Ce défaut structural est causé par une surexpression de protéines Shh aux stades précoces de l'embryogénèse (Hu and Helms, 1999).

Des mutations du gène Shh ont été rapportées dans l'holoprosencéphalie (HPE), une neurocristopathie affectant le développement du cerveau et de la région craniofaciale (Abramyan, 2019; Roessler et al., 1997; Traiffort et al., 2004). Les individus atteints présentent une structure anormale du cerveau et du visage souvent accompagnée de malformations du palais et de la lèvre supérieure (fente labiale, palais fendu) (Roessler et al., 1997). La réduction de ligand Shh, observée dans cette pathologie, entraînerait l'apoptose des CCN et empêcherait ainsi la séparation des aires cérébrales en hémisphères. Selon l'importance de cette perte de cellules, les malformations sont très variables pouvant aller jusqu'à la cyclopie dans les cas les plus sévères (Muenke and Beachy, 2000). Plusieurs formes d'HPE sont causées par des mutations ne touchant pas le gène Shh directement, mais affectant d'autres acteurs de la voie tels que Hhat, Disp, Gas1, Gli2 (pour revue, (Sasai et al., 2019)). Un phénotype similaire à celui de l'HPE est retrouvé dans les cas extrêmes de certaines pathologies associées à une altération de la voie Hh au cours du développement, telles que le syndrome d'alcoolisme foetal (FAS) et le syndrome Smith-Lemli-Optiz. Ce dernier est causé par la mutation d'une des enzymes de

biosynthèse du cholestérol (Kelley et al., 1996; Kietzman et al., 2014).

Des malformations du palais et de la lèvre supérieure (proboscis, fente palatine, incisive médiane unique), peuvent apparaître en dehors de l'HPE et être associées à des dérégulations de la voie Hh. En effet, des mutations gain de fonction de Smo ou perte de fonction de Ptc ont été rapportées dans le développement de ces anomalies. L'activation de la voie Hh, qui s'ensuit, participerait aux défauts structuraux en régulant négativement les signalisations Wnt et BMP. L'absence de voie Hh peut également conduire à ces déformations, en altérant la prolifération des cellules mésenchymateuses nécessaires à la formation de ces tissus (pour revue, (Abramyan, 2019)).

### *3.2.2 Ciliopathies*

Les ciliopathies sont des pathologies caractérisées par des défauts de la fonction ou du développement du cil primaire (Badano et al., 2006; Eggenschwiler and Anderson, 2007). Les souris atteintes présentent souvent des phénotypes similaires aux mutants de la voie Hh (Huangfu et al., 2003; Liu et al., 2005). Ainsi, la souris mutée pour la protéine Kif3a, un moteur kinésine impliqué dans le transport intraflagellaire, présente une augmentation de la voie Hh. Chez ces animaux, l'activation de cette signalisation dans les cellules mésenchymateuses de la face conduit au développement d'un hypertélorisme (Brugmann et al., 2010; Wong et al., 2009). A l'inverse, l'altération des protéines de transport intraflagellaire ift88 et ift172 est associée à une réduction de la voie Hh conduisant à une absence de structures ventrales chez les souris mutées (Huangfu et al., 2003). La variabilité des effets de ces mutants sur la voie Hh pourrait être liée à la nature des éléments (modulateur positif ou négatif de la voie) transportés par ces protéines de la machinerie intraflagellaire.

La mutation *talpid* est un exemple de ciliopathie chez le poulet. Chez cet animal, la déficience d'une protéine du centrosome entraîne la dégradation du cil primaire et l'altération de la voie Hh. Le développement de la région craniofaciale et des membres antérieurs est alors affecté (Davey et al., 2007; Schock et al., 2016; Yin et al., 2009). En effet, les animaux mutés présentent une polydactylie au niveau des membres supérieurs, un fort raccourcissement du bec et de la mandibule tandis que les yeux ne sont pas affectés (Cole, 1942). Ces effets seraient dus à une surexpression de la protéine Shh et de la forme activatrice du facteur de transcription

Gli3 dans les structures frontales (Chang et al., 2014). A l'inverse, chez un mutant similaire *talpid3*, les malformations seraient causées par la perte de Shh et de Ptc dans les structures ventrales (Buxton et al., 2004; Davey et al., 2006). Ces pathologies mettent en évidence l'importance du cil primaire dans la modulation de la voie Hh chez les vertébrés. Chez l'Homme, le syndrome de Joubert est une ciliopathie associée à la mutation du gène *Kif7*, codant pour une protéine contrôlant l'architecture ciliaire et modulant la signalisation Hh (Dafinger et al., 2011; He et al., 2014).

### 3.2.3 Cancers

L'activation excessive de la signalisation Hh altère la physiologie des cellules et peut conduire au développement de tumeurs. Celles-ci peuvent être réparties en trois catégories en fonction du mode d'activation de la voie (Skoda et al., 2018) (**Figure 16A-D**):

- type I : activation indépendante du ligand Hh
- type II : activation suite à la sécrétion autocrine/juxtacrine du ligand Hh
- type III : activation suite à la sécrétion paracrine du ligand Hh

Les tumeurs de type I sont induites par une mutation perte de fonction d'un répresseur (Ptc, SuFu) ou gain de fonction d'un activateur (Smo) de la voie Hh. Ces mutations conduisent à l'activation constitutive de la voie même en absence de ligand (Reifenberger et al., 2005). Dans cette catégorie est retrouvé le syndrome de Gorlin ou naevomatose basocellulaire, une maladie héréditaire qui serait causée par une mutation inactivatrice du gène Ptc induisant la méthylation de son promoteur. Cette découverte a permis d'établir le premier lien entre la voie Hh et le développement de cancers. Les individus atteints présentent une prédisposition plus importante à certains cancers, dont le carcinome basocellulaire et le médulloblastome (Petrobono et al., 2019).

Le carcinome basocellulaire (BCC) est le plus fréquent des cancers de la peau, touchant près de 2 millions d'adultes par an aux Etats-Unis (Asgari et al., 2015) et environ 70 000 cas par an en France. L'étude de cas sporadiques a permis d'identifier des mutations activatrices de Smo dans ces tumeurs (Xie et al., 1998). Ces

formes mutantes du récepteur entraînent une augmentation de l'activité de la voie Hh et ne sont pas affectées par la répression exercée par Ptc (Taipale et al., 2000). Des mutations perte de fonction de Ptc ont également été mises en évidence lors de l'analyse de biopsies de patients atteints de BCC (Zhang et al., 2001).

Le médulloblastome (MB) est une des tumeurs cérébrales les plus fréquentes chez l'enfant. Cette pathologie est causée par une prolifération anormale des précurseurs des cellules granulaires dans le cervelet en développement (Scales and de Sauvage, 2009). Les MB dépendants de la voie Hh représentent 30% de l'ensemble de ces tumeurs et constituent une des quatre catégories de MB (Sasai et al., 2019). L'induction de la voie Hh observée dans ce groupe est due à des mutations de composants de la voie tels que Shh, Ptc, Smo et SuFu (Gulino et al., 2008; Scales and de Sauvage, 2009; Yin et al., 2019). La souris hétérozygote  $Ptc^{+/-}$  développe des tumeurs similaires au MB humain. L'utilisation des cellules tumorales de cette souris transgénique a permis le développement d'un modèle cellulaire afin de tester la capacité de drogues à bloquer la progression tumorale (Peukert and Miller-Moslin, 2010). L'analyse de ces cellules tumorales issues de MB de souris  $Ptc^{+/-}$  met en évidence un niveau élevé d'expression de Gli1, un fort taux de prolifération et une absence d'apoptose dans ces cellules indiquant une perte des mécanismes de protection censés empêcher l'expansion des cellules malignes (Galvin et al., 2008).

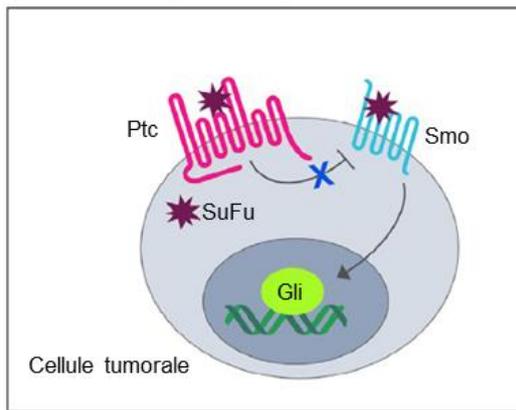
Un autre modèle murin de MB est induit par la délétion de Ptc spécifiquement dans les précurseurs des cellules granulaires (CGPs) dans le cervelet en développement. De façon intéressante, l'ablation de Ptc dans les CSNs GFAP<sup>+</sup> de la zone ventriculaire chez l'embryon de souris, cellules à l'origine des CGPs, conduit également à la formation de MB. Bien que la délétion soit induite chez l'embryon, les souris ne développent la tumeur qu'une fois adultes, lorsque les CSNs sont engagées dans un devenir de CGPs (Yang et al., 2008), suggérant que la formation de MB est associée à l'engagement au lignage neuronal. Les cellules tumorales, de certaines formes de MB humains, sont ciliées (Han et al., 2009). Cette caractéristique est importante à prendre en compte pour le traitement de ces MB qui pourraient répondre à des agents dirigés contre le cil primaire.

Le glioblastome est une tumeur cérébrale causée par la prolifération anormale des cellules gliales dans le cerveau mais également dans la moelle épinière. La dérégulation de la voie Hh, en plus d'autres signalisations

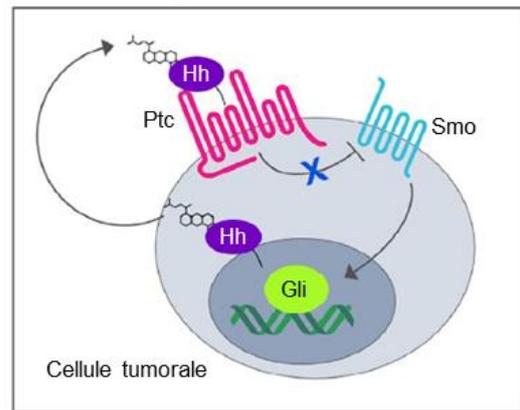
telles que celles des protéines Wnt, participerait à l'induction de cette tumeur (Laug et al., 2018; Palma and Ruiz i Altaba, 2004). Les cellules souches tumorales du glioblastome sont résistantes aux traitements anti-cancéreux conventionnels. Cependant, la perte d'expression de Gli1 et Gli2 au sein de ces cellules entraîne l'arrêt de leur prolifération et tumorigenèse, permettant d'envisager d'autres pistes thérapeutiques (Clement et al., 2007; Takezaki et al., 2011). Plusieurs antagonistes de la voie Hh combinés à d'autres molécules sont en cours d'essais cliniques pour le traitement de cette tumeur (Xie et al., 2019).

Les tumeurs dépendantes des ligands Hh (type II et III) sont causées par la surproduction de protéine Hh, sécrétée par la tumeur elle-même ou son environnement. Le ligand Hh, présent en quantité abondante va lever l'inhibition de Smo exercée par Ptc permettant ainsi l'activation des protéines Gli et conduisant à la transcription des gènes cibles impliqués, notamment, dans la prolifération cellulaire. Lorsque la protéine Hh est libérée par la tumeur et intervient sur les cellules tumorales la produisant, il s'agit d'une action autocrine. L'activation de la voie Hh dans la tumeur favorise la prolifération et la survie des cellules tumorales. En parallèle, la protéine Hh, sécrétée par la tumeur, peut induire l'activation de la voie dans les cellules voisines (action paracrine) qui vont favoriser la croissance de la tumeur en sécrétant, à leur tour, des facteurs de croissance tels que VEGF ou BMP (Jiang and Hui, 2008). Ces mécanismes sont retrouvés dans des tumeurs touchant des tissus périphériques tels que l'estomac, l'œsophage, le pancréas (Berman et al., 2003), le côlon (Gulino et al., 2009), le sein (Kubo et al., 2004) et la prostate (Sheng et al., 2004). Un mode d'action paracrine inverse a également été rapporté : le ligand Hh est libéré par l'environnement stromal pour agir sur les cellules tumorales (Theunissen and de Sauvage, 2009). Ce phénomène a été décrit dans les maladies du sang et dans le glioblastome où l'expression de Shh a été proposée dans les astrocytes et les cellules endothéliales constituant l'environnement stromal de la tumeur (Becher et al., 2008). Des actions croisées d'autres voies de signalisation avec la voie Hh peuvent intervenir dans le développement de tumeurs. Ce phénomène a été rapporté dans le cancer du côlon où la communication entre les voies Hh et Wnt joue un rôle important pour le développement et le maintien de la pathologie (Song et al., 2015).

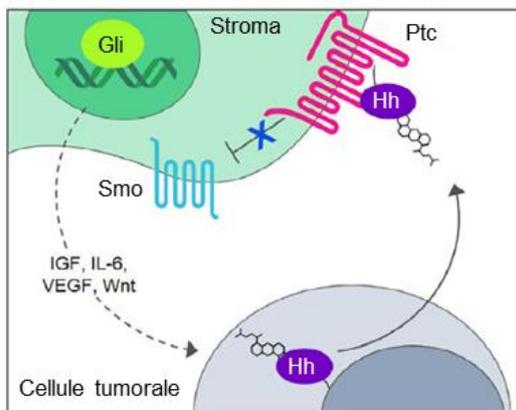
### A Mutations- activation indépendante du ligand



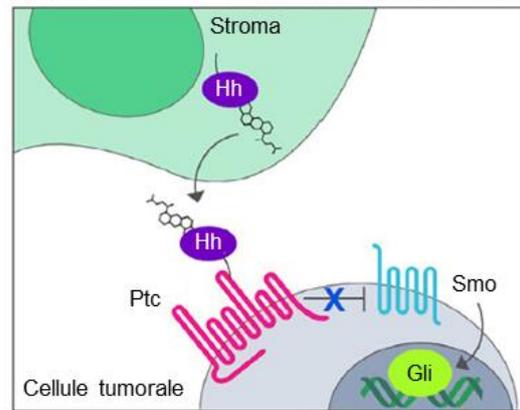
### B Autocrine- activation dépendante du ligand



### C Paracrine- activation dépendante du ligand



### D Paracrine Inverse - activation dépendante du ligand



**Figure 16 : Altérations de la signalisation Hedgehog dans les cancers**

(A) L'activation indépendante du ligand a lieu suite à des mutations inactivatrices dans les régulateurs négatifs Patched (Ptc) ou Suppressor of Fused (SuFu) ou des mutations activatrices dans le régulateur positif Smoothed. (B) L'activation dépendante de la sécrétion autocrine du ligand a lieu quand le ligand Hedgehog (Hh), produit par la cellule tumorale, active la voie Hh dans cette même cellule. (C) L'activation dépendante de la sécrétion paracrine du ligand intervient quand le ligand Hh, libéré par la cellule tumorale, active la voie Hh au sein des cellules stromales voisines entraînant la sécrétion de facteurs de croissance stimulant le développement de la tumeur. (D) Le modèle paracrine inverse consiste en la sécrétion du ligand Hh par les cellules stromales, entraînant l'activation de la voie Hh au sein des cellules tumorales, d'après (Cortes et al, *Cancer Treat. Rev.*, 2019). Gli, glioma-associated oncogene; Hh, hedgehog; IGF, insulin-like growth factor; IL-6, interleukin 6; Ptc, Patched; Smo, Smoothed; SuFu, Suppressor of fused; VEGF, vascular endothelial growth factor; Wnt, Wiggless/integrated.

### 3.2.4 Maladies neurodégénératives

La maladie de Parkinson est une pathologie neurodégénérative caractérisée par des troubles moteurs liés à la perte de neurones dopaminergiques au sein de la substantia nigra pars compacta (Kalia and Lang, 2015). Dans cette région, a été rapportée la présence des transcrits de Shh. L'expression du ligand permettrait le maintien des neurones dopaminergiques (Álvarez-Buylla and Ihrie, 2014; Gonzalez-Reyes et al., 2012). Chez un modèle primate de la maladie de Parkinson, une diminution de l'expression de Shh et Ptc a été décrite dans le globus pallidus et le noyau subthalamique, respectivement (Bezard et al., 2003), suggérant un lien entre cette pathologie et la voie Hh. De plus, l'injection de la forme active de la protéine Shh présente des effets bénéfiques sur le phénotype de modèles rongeurs et primates de la maladie de Parkinson. En effet, l'apport de cette protéine permet d'augmenter le nombre de neurones exprimant la tyrosine hydroxylase au sein de la substantia nigra et de préserver les axones des neurones dopaminergiques dans le striatum. Ces effets sont accompagnés d'une amélioration des fonctions locomotrices (Dass et al., 2002; Tsuboi and Shults, 2002). En accord avec ces résultats, la délétion de Shh dans les neurones dopaminergiques conduit à un modèle progressif de la maladie de Parkinson se traduisant par une dégradation de la neurotransmission cholinergique et dopaminergique et des troubles de la motricité (Gonzalez-Reyes et al., 2012).

Du point de vue thérapeutique, la protéine Shh utilisée en combinaison avec des facteurs de croissance fibroblastiques comme FGF8, permet l'obtention de cellules dopaminergiques à partir de cellules mésenchymateuses humaines adultes (Trzaska et al., 2009). Ces nouvelles cellules peuvent participer à la mise au point de thérapie par remplacement cellulaire dans la maladie de Parkinson. Les propriétés chémoattractives du ligand Shh pourraient également servir pour le guidage de ces cellules dopaminergiques au sein du cerveau atteint (Hammond et al., 2009). Un autre intérêt thérapeutique de Shh dans le cadre de la maladie de Parkinson repose sur l'activité neuromodulatrice du ligand dans le noyau subthalamique. En effet, l'apport de Shh pourrait permettre de réguler l'hyperactivité neuronale observée dans cette région au cours de la pathologie (Bezard et al., 2003).

Un lien a également été proposé entre la voie Hh et la maladie d'Alzheimer, pathologie caractérisée par une perte de neurones et synapses entraînant une altération des fonctions cognitives et de la mémoire (Masters et al., 2015). Le peptide neurotoxique amyloïde  $\beta$  ( $A\beta$ ), dont l'accumulation a été rapportée dans le cerveau des individus atteints, serait capable d'altérer le cil primaire et affecterait ainsi la voie de signalisation Hh (Vorobyeva and Saunders, 2018).

Le syndrome de Down, ou trisomie 21, est une maladie génétique induite par la réplication du chromosome 21 et associée à un retard mental. Chez la souris transgénique Ts65Dn, modèle murin de cette pathologie, une diminution des cellules granulaires du cervelet a été rapportée. Cette réduction est liée à la défaillance de la voie Hh causée par une augmentation de l'expression de Ptc dans ces cellules (Roper et al., 2006). En accord avec ces travaux, le traitement à la naissance des souris Ts65Dn, avec un agoniste de la voie Shh a permis de corriger partiellement le manque de cellules granulaires du cervelet. Les animaux, une fois adultes, présentent également une amélioration des fonctions d'apprentissage et de mémoire (Das et al., 2013).

Il est à noter que des modifications de la voie Hh ont été rapportées dans d'autres pathologies telles que la dépression (Banerjee et al., 2005) ou la sclérose systémique, une pathologie associée à un excès de matrice extracellulaire produite par les fibroblastes et affectant de nombreux organes (Beyer et al., 2012). Bien que l'altération de la voie Hh ne soit pas toujours la cause de ces pathologies, la modulation pharmacologique de la voie pourrait intervenir dans le développement de thérapie.

### *3.2.5 Réparation de la myéline*

Divers modèles de démyélinisation rapportent une augmentation de l'expression de Shh suggérant une implication de la voie Hh dans ce processus. Lors d'une démyélinisation induite par injection de lysolécithine dans le corps calleux, un rôle de la voie Shh a pu être démontré dans la prolifération et la différenciation des OPCs. Cette action, en plus de la réduction de l'inflammation, permet d'empêcher l'expansion de la lésion pendant le processus de réparation de la myéline (Feret et al., 2013).

Dans un autre modèle de démyélinisation induit par traitement à la cuprizone, l'injection d'un agoniste

de Smo dans le corps calleux permet d'augmenter la remyélinisation. Cependant, l'expression de Gli1 n'est pas modifiée indiquant que l'agoniste activerait une voie non canonique. De plus, aucune augmentation des populations oligodendrocytaires n'a été rapportée suggérant que la molécule agit sur d'autres types cellulaires (Sanchez et al., 2018).

Samanta et al. (Samanta et al., 2015) ont mis en évidence le recrutement de CSNs Gli1<sup>+</sup> de la ZSV pour participer au processus de réparation du corps calleux suite à un traitement à la cuprizone. Une fois parvenues dans la région démyélinisée, les cellules vont suivre un devenir oligodendrocytaire et voient leur niveau de Gli1 diminuer. La mobilisation de ces CSNs et leur différenciation en oligodendrocytes matures, peuvent être amplifiées par la réduction génétique ou pharmacologique de l'expression de Gli1 (Samanta et al., 2015).

Selon le modèle de démyélinisation, la régulation des niveaux de Gli1 est variable : expression modérée dans un modèle de lysolécithine, niveau augmenté initialement dans un modèle EAE (experimental autoimmune encephalomyelitis) puis diminué lors de la remyélinisation (Ferent et al., 2013; Y. Wang et al., 2008). Ces propriétés doivent donc être prises en compte lors du développement de thérapies pour les pathologies de la myéline telles que la sclérose en plaque.

### 3.2.6 Lésions aiguës

Les travaux de Sirko et al. (Sirko et al., 2013) mettent en avant le rôle clé de la voie Shh dans la réponse astrocytaire lors d'une lésion invasive. En effet, suite à une lésion telle qu'une entaille par scalpel ou suite à une ischémie, les niveaux élevés de Shh détectés dans le site de la lésion entraîneraient la prolifération des astrocytes présents. Cette réponse est dépendante de l'expression de Smo dans ces cellules gliales. De plus, *in vitro*, les astrocytes acquièrent des propriétés de CSNs, illustrées par leur capacité à former des neurosphères suite à l'application du ligand Shh (Sirko et al., 2013). Une expression plus importante de Gli1 a été rapportée dans plusieurs modèles d'ischémie et lésion aiguë, s'ajoutant à l'augmentation de Shh (Amankulor et al., 2009; Jin et al., 2015; Sims et al., 2009). En participant à la communication entre astrocytes et cellules endothéliales, la voie Shh permettrait de restreindre la perméabilité de la BHE (Alvarez et al., 2011). Plus récemment, Allahyari et al. (Allahyari et al., 2019) démontrent la régulation négative de Gli1 dans des

astrocytes présents à proximité d'une lésion aiguë et invasive, telle qu'une entaille par scalpel, dans le cortex. Ces réponses différentes pourraient être expliquées par l'activation d'une voie non canonique au sein des astrocytes réactifs tandis que la voie canonique Gli-dépendante est inhibée.

### 3.3 Pharmacologie de la voie Hh

L'implication de la voie Hh dans de nombreux cancers dont des tumeurs du système nerveux central telles que le MB a conduit au développement de nombreux inhibiteurs afin de bloquer cette voie de signalisation. Le récepteur Smo représente une cible privilégiée pour le développement de molécules visant à bloquer la croissance de tumeurs malignes (**Figures 17 et 18**) (Cortes et al., 2019; Ruat et al., 2015; Salaritabar et al., 2019).

#### *3.3.1 Les antagonistes du récepteur Smo*

La **cyclopamine**, un alcaloïde naturel, est la première molécule ayant été identifiée comme inhibiteur du récepteur Smo. Ce composé, purifié à partir de lys de maïs, a été découvert grâce à ses propriétés tératogéniques (Berman et al., 2003, 2002; Karhadkar et al., 2004; Watkins et al., 2003). En effet, la consommation de la plante par des brebis dans les pâturages de l'Idaho (Etats-Unis) s'est accompagnée de l'apparition de cyclopie chez les agneaux nouveau-nés, phénotype caractéristique d'une altération de la voie Hh (Bryden et al., 1971). La cyclopamine se lie aux boucles extracellulaires du domaine TMD de Smo (Chen et al., 2002b; Myers et al., 2013; C. Wang et al., 2013). Elle entraînerait l'accumulation du récepteur dans le cil primaire et le maintiendrait sous une forme inactive, bloquant ainsi la voie Hh canonique (Rohatgi et al., 2009; Roudaut et al., 2011; Wilson et al., 2009). L'administration de cette molécule a permis de ralentir la croissance de tumeurs dans plusieurs modèles animaux (Berman et al., 2003, 2002; Karhadkar et al., 2004; Watkins et al., 2003). Cependant, la relation entre cette réponse et l'inhibition de la voie Hh a été fortement débattue car les concentrations utilisées étaient importantes et pouvaient suggérer une activité non spécifique. Une forme dérivée de la cyclopamine, plus soluble et plus puissante, a été développée en thérapeutique. Ce composé, nommé IPI-926 ou saridegib, a conduit à des essais cliniques pour le traitement du BCC et du cancer

métastatique du pancréas (Wu et al., 2017). Un analogue fluorescent de la cyclopamine, la BODIPY-cyclopamine, a également été mis au point. Cette molécule permet de tester la liaison de composés au domaine TMD de la protéine Smo (Chen et al., 2002b). Il est à noter que la cyclopamine est capable de se lier à un mutant de Smo dont seul le domaine TMD est altéré (Huang et al., 2016). Cette propriété suggère que la molécule pourrait se fixer au récepteur par un autre site de liaison : le domaine CRD (Nachtergaele et al., 2013). Depuis la découverte de la cyclopamine, de nombreux inhibiteurs synthétiques de la protéine Smo ont été produits dont certains sont en clinique (vismodegib, sonidegib).

Au cours d'un criblage à haut débit, Chen et al. (Chen et al., 2002b) ont mis en évidence le **SANT-1**, une molécule capable d'inhiber la transcription des facteurs Gli induite par le ligand Shh. Cette molécule se lie au domaine TMD de Smo (Byrne et al., 2016; C. Wang et al., 2013; Wang et al., 2014; Weierstall et al., 2014). Cependant, elle entre seulement partiellement en compétition avec la BODIPY-cyclopamine indiquant des sites de liaison différents au sein du domaine TMD de Smo. Le SANT-1 bloque dans un état inactif le récepteur Smo et empêche sa translocation dans le cil primaire (Dijkgraaf et al., 2011). Ce composé n'a pas été développé en clinique mais sert souvent de comparatif lors de l'étude de molécules modulant Smo.

Conçu par la société Genentech, le **vismodegib** ou **GDC-0449**, est un inhibiteur de Smo, se liant au domaine TMD du récepteur. Cette molécule empêcherait la transcription d'oncogènes associés à la voie Hh canonique (Sekulic et al., 2012; Tang et al., 2012). Sa liaison à la protéine Smo bloquerait le récepteur dans une forme inactive et empêcherait sa translocation dans le cil primaire (Dijkgraaf et al., 2011). En 2012, le vismodegib a été approuvé par l'institution américaine FDA (Food and Drug Administration) pour le traitement des BCC métastatiques et localement avancés, en cas d'impossibilité de traitement chirurgical ou de radiation (Dlugosz et al., 2012). Cet inhibiteur est également en cours d'essai clinique pour le traitement de glioblastome, en combinaison avec de la radiothérapie ((Xie et al., 2019) ; essai clinique NCT03158389).

Un autre antagoniste de Smo, le **LDE-225** ou **sonidegib**, a également été identifié par sa capacité à contrer l'action de Shh sur la transcription des facteurs Gli (Pan et al., 2010). Ce puissant inhibiteur de Smo se fixe au domaine TMD du récepteur. En 2015, il a été approuvé par la FDA pour le traitement des BCC localement avancés (Burness, 2015).

Le **MRT-92**, une acylguanidine développée par notre équipe en 2015 en collaboration avec des équipes de chimistes français et italiens, est l'inhibiteur le plus puissant de Smo connu à ce jour (Hoch et al., 2015). Sa découverte a permis de mettre en évidence l'existence d'une nouvelle classe de molécules occupant une grande partie du domaine TMD de Smo. En effet, cet inhibiteur interagit avec des résidus de la protéine Smo distribués largement, de sa partie extracellulaire à son domaine proche du cytoplasme. Le MRT-92 inhibe ainsi la transcription des facteurs Gli induite par le ligand Shh et bloque la translocation de Smo au cil primaire. Cette molécule prévient également la prolifération des précurseurs de cellules granulaires chez le rongeur, induite par SAG, un agoniste de la voie Hh. D'autre part, la mise au point d'une forme radioactive de ce composé constitue un nouvel outil pour caractériser la liaison de molécules sur le récepteur Smo (Hoch et al., 2015).

L'**itraconazole**, molécule approuvée par la FDA comme agent antifongique, inhibe la transcription des facteurs Gli induite par Shh. Ce composé n'entre pas en compétition avec la BODIPY-cyclopropane pour se lier au récepteur Smo indiquant des sites de liaisons différents de ces deux composés (Hoch et al., 2015; D. J. Kim et al., 2014; James Kim et al., 2010). Dans un modèle murin de MB, l'administration d'itraconazole a permis d'inhiber la voie Hh et de réduire la croissance de la tumeur (Kim et al., 2013). Des premiers tests cliniques de ce composé ont montré une inhibition de la voie Hh au sein de BCC humains mais une réduction minimale de la tumeur (Ally et al., 2016; D. J. Kim et al., 2014). Un essai clinique est actuellement en cours pour le traitement du glioblastome par l'itraconazole combiné au témozolomide, un anti-cancéreux déjà utilisé pour traiter cette tumeur ((Xie et al., 2019) ; essai clinique NCT02770378).

Dans le cadre des cancers dépendants du ligand Hh, les inhibiteurs de Smo ont peu d'impact (Berlin

et al., 2013; Kaye et al., 2012; Ko et al., 2016). Les rares effets de certains antagonistes sur ce type de tumeurs sont controversés et pourraient être liés à une action de ces molécules sur d'autres cibles que Smo (Ng and Curran, 2011).

### Résistances

L'administration d'antagonistes de Smo peut conduire au développement d'une résistance dans les cellules tumorales. La rechute d'un patient atteint d'une forme métastatique de MB, traité au vismodegib et ayant pourtant initialement répondu au traitement, est un exemple frappant de ce phénomène (Rudin et al., 2009). Cet antagoniste est également lié au développement de résistance dans un modèle murin de MB (Yauch et al., 2009) et chez des patients atteints de BCC (Atwood et al., 2012; Chang and Oro, 2012). L'étude de la biopsie d'un patient ayant rechuté après traitement au vismodegib a révélé une mutation *de novo* au sein du domaine TMD de Smo. Cette altération empêche la liaison de l'inhibiteur mais n'affecte pas l'activation de la voie Hh (Rudin et al., 2009; Yauch et al., 2009). L'analyse génomique d'un grand nombre d'échantillons de BCC de patients n'ayant pas ou peu répondu à un traitement au vismodegib a permis d'identifier les causes principales des résistances à cet inhibiteur (Atwood et al., 2015; Sharpe et al., 2015) : des mutations de Smo empêchant la liaison de l'antagoniste, des mutations activatrices de Smo telles que SmoM2, des mutations perte de fonction de SuFu ou des mutations gain de fonction de Gli2.

La souris hétérozygote  $Ptc^{+/-}$  développe des tumeurs du cervelet semblables au MB humain et sert ainsi de modèle pour tester l'efficacité de drogues à enrayer la prolifération de ces tumeurs. Chez ce modèle, le développement de résistance a été rapporté suite au traitement par le LDE-225 (Buonamici et al., 2010; Peukert and Miller-Moslin, 2010). L'analyse des mécanismes de cette résistance a mis en avant des mutations activatrices au sein de Smo, de la PI3K (phosphoinositide 3-kinase) et une augmentation de Gli2 (Buonamici et al., 2010). Ainsi, des altérations de composants de la voie Hh en aval du récepteur Smo peuvent aussi participer au phénomène de résistance.

Il est à noter que ces résistances peuvent être contournées en ciblant d'autres voies en plus de la signalisation Hh ou, dans le cas de mutations de Smo, par l'utilisation d'autres inhibiteurs du récepteur tels que

le SANT-1. Cette molécule exerce, en effet, une action similaire sur la forme sauvage de Smo et le mutant constitutivement actif SmoM2 (Chen et al., 2002a). Ainsi, les tumeurs résistantes au vismodegib ou au LDE-225, présentant des mutations semblables à SmoM2 pourraient répondre aux antagonistes similaires au SANT-1 (Scales and de Sauvage, 2009). L'itraconazole a également été rapporté comme inhibant la voie Hh dans tous les cas connus de mutants de Smo résistants aux drogues (Kim et al., 2013).

### Molécules actives sur les voies canoniques et non canoniques

Parmi les molécules agissant sur Smo, certaines présentent des propriétés agonistes et antagonistes constituant une classe particulière de modulateurs de Smo (Gorojankina et al., 2013; Teperino et al., 2012). Ainsi, le GDC-0449 et la cyclopamine sont des antagonistes de la voie Hh canonique mais stimulent l'entrée de glucose au sein de la lignée adipocytaire 3T3-L1, action agoniste médiée par une signalisation Hh non canonique faisant intervenir l'axe Smo-AMPK-Ca<sup>2+</sup> (Teperino et al., 2012). Cette entrée de glucose n'implique pas l'action de l'insuline (voir §II.2.2.2). Cette voie Hh non canonique présente un potentiel thérapeutique dans le cadre d'altérations métaboliques telles que l'obésité et le diabète. Il est à noter que l'existence de molécules aux actions multiples a également été rapportée pour d'autres RCPGs (Kenakin and Christopoulos, 2013).

### *3.3.2 Les agonistes du récepteur Smo*

En comparaison du grand nombre d'antagonistes de Smo développés, très peu d'agonistes de ce récepteur ont été caractérisés et aucune molécule agoniste n'a été introduite en clinique. L'utilisation de ces molécules soulève des questions vis-à-vis de leur potentielle action oncogénique. Pourtant, ces activateurs de la voie Hh pourraient avoir un intérêt thérapeutique dans le cadre de pathologies variées dont les maladies neurodégénératives, la sclérose en plaque, le diabète ou encore l'ischémie (Salaritabar et al., 2019; Teperino et al., 2012; Traiffort et al., 2010).

Le benzothiophène **SAG, un agoniste de référence pour stimuler la voie Hh canonique**, se lie au domaine TMD du récepteur Smo (Chen et al., 2002b). Il stimule la translocation du récepteur dans le cil primaire et le maintient sous une forme active (Rohatgi et al., 2009; Roudaut et al., 2011; Yang et al., 2009). Le SAG

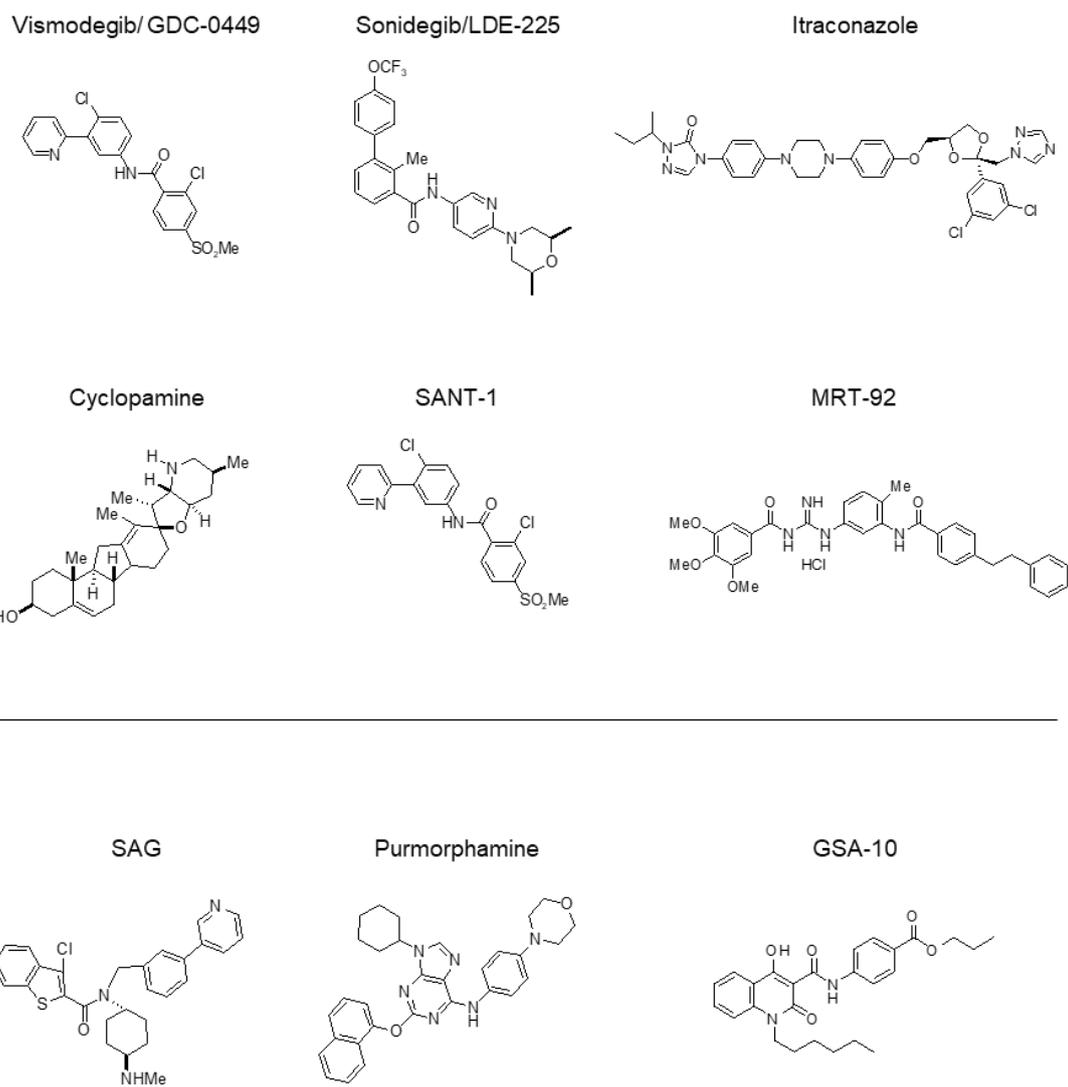
stimule également une voie non canonique faisant intervenir l'AMPK, le  $Ca^{2+}$  et une protéine G $\alpha$ i et permet d'induire l'entrée de glucose dans la lignée pré-adipocytaire 3T3-L1 et dans des myocytes. Cette réponse est indépendante du cil primaire (Teperino et al., 2012).

Découverte au cours d'un criblage, la **purmorphamine** est un composé purinergique qui stabiliserait Smo dans une conformation active au cil primaire (Wilson et al., 2009) en se fixant au domaine TMD du récepteur. Ce composé est capable d'induire la différenciation de la lignée fibroblastique C3H10T1/2, lignée de progéniteurs multipotents de cellules mésenchymateuses, en ostéoblastes via l'activation de la voie Hh canonique (Byrne et al., 2018; Wu et al., 2002). La purmorphamine induit également une voie Hh non canonique impliquant les GTPases Rho et aboutissant à la migration de cellules fibroblastiques (Polizio et al., 2011).

Comme décrit plus haut (voir §II.1.3), le **cholestérol** et certains **oxystéroïls** sont proposés comme des agonistes de la voie Hh canonique et assureraient le rôle de ligands endogènes du récepteur Smo. Les **glucocorticoïdes** synthétiques, tels que la fluocinolone acétonide et la triamcinolone acétonide, se lieraient à Smo au même site de liaison que la cyclopamine (Wang et al., 2010; Y. Wang et al., 2012). Elles amplifient l'activation de la voie de signalisation Hh tout en diminuant la sensibilité à certains inhibiteurs de Smo, comme le vismodegib et la cyclopamine (Y. Wang et al., 2012). Certaines de ses molécules ont été approuvées par la FDA dans le traitement de l'inflammation. Il est donc crucial d'inspecter les effets contraires d'une médication combinée de glucocorticoïdes et d'inhibiteurs de Smo chez des patients cancéreux également soignés pour l'inflammation. Il est à noter que le budénoside, composé appartenant à la classe des glucocorticoïdes, se lie au domaine CRD de Smo et exerce une action antagoniste (Rana et al., 2013; Y. Wang et al., 2012).

Le **GSA-10** a été identifié par une étude de modélisation moléculaire basée sur les structures de la purmorphamine et du SAG, (Gorojankina et al., 2013). Son site de liaison sur le récepteur Smo est distinct de celui de la cyclopamine. Cette quinolinone est capable d'induire la différenciation des C3H10T1/2 en ostéoblastes. Cette réponse passe par l'activation de Smo mais n'engage pas la voie Hh canonique,

(Gorojankina et al., 2013). Le GSA-10 ne stimule pas la transcription des facteurs Gli, ni la prolifération des cellules granulaires du cervelet (Gorojankina et al., 2013). En activant une voie non canonique impliquant les protéines Smo, AMPK et Lkb1, le GSA-10 exerce une action anti-adipogénique sur la lignée de précurseurs adipocytaires 3T3-L1 (Fleury et al., 2016). Cependant, il bloque l'activation de la Gli-luciférase, gène rapporteur de la transcription des facteurs Gli, induite par le SAG. Ainsi le GSA-10 présenterait des propriétés d'antagoniste de la voie Hh canonique tout en exerçant une action agoniste sur une voie non canonique.



**Figure 17 : Structures chimiques de divers antagonistes (Vismodegib, Sonidegib, Itraconazole, Cyclopamine, SANT-1, MRT-92) et agonistes (SAG, Purmorphamine, GSA-10) du récepteur Smoothened, d'après (Hoch et al, *FASEB J.*, 2015).**

### *3.4.3 Autres modulateurs pharmacologiques de la voie Hh*

#### *Molécules agissant sur le ligand Hh*

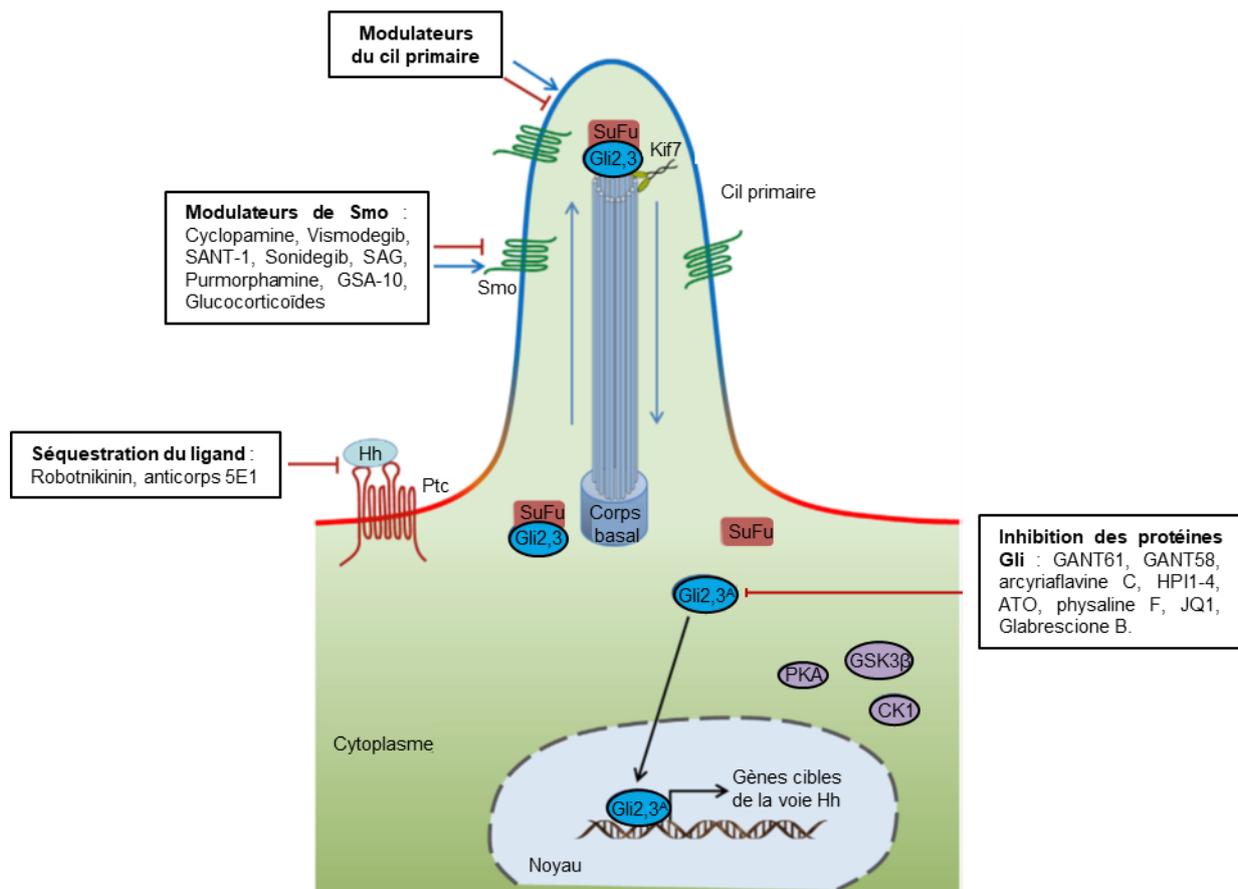
La molécule **RU-SKI** inhibe l'acyltransférase Hhat responsable de la palmitoylation du ligand Hh. Elle permet ainsi d'interférer avec la formation de la forme active du ligand Hh et empêche l'activation de la voie (E. Petrova et al., 2013).

En séquestrant physiquement la protéine Shh, l'anticorps monoclonal **5E1** bloque la liaison du ligand sur son récepteur Ptc (Ericson et al., 1996). Cette action antagoniste du 5E1 a été observée notamment dans des modèles de cancers (Bailey et al., 2009; Maun et al., 2010; Wallace and Raff, 1999; Yauch et al., 2008). La **robotnikinin**, une molécule de synthèse, procède de la même façon et inhibe la voie Hh (Stanton et al., 2009). Malgré leurs propriétés inhibitrices, ces molécules n'ont pas été développées en clinique (**Figure 18**).

#### *Modulateurs des facteurs de transcription Gli*

Le **GANT61** est une molécule affectant directement l'activité des facteurs de transcription Gli en les empêchant d'interagir avec leur cible génomique. Ce composé inhibe la croissance de tumeurs dépendantes de la voie Hh. De plus, des effets du GANT61 sur les CSNs de la ZSV ont été rapportés dans un modèle de démyélinisation. En effet, la molécule amplifie le recrutement et la différenciation de CSNs en oligodendrocytes pour participer à la réparation de la lésion démyélinisante. L'administration périphérique de GANT61 exerce la même inhibition de Gli1 au sein du cerveau qu'une injection centrale de la molécule, suggérant que le GANT61 serait capable de passer la BHE (Samanta et al., 2015). Cet inhibiteur de l'activité des protéines Gli présente ainsi un intérêt pour le traitement des maladies démyélinisantes et comme alternative lors de tumeurs résistantes aux inhibiteurs de Smo. L'activité de Gli1 peut être affectée par d'autres composés naturels tels que l'arcyriaflavine C et la physaline F (Hosoya et al., 2008) ou des composés issus d'études structurales comme le Glabrescione B (Infante et al., 2015).

D'autres molécules affectent toutes les protéines Gli sans distinction telles que l'arsenic trioxide (ATO). Cet antagoniste est capable d'inhiber la croissance de tumeur dans des modèles murins de MB (Jynho Kim et al., 2010) et des xénogreffes de sarcome d'Ewing (Beauchamp et al., 2011). Suite à des effets encourageants en combinaison avec l'itraconazole sur des tumeurs au récepteur Smo muté, l'ATO est sous étude chez des patients atteints de BCC récurrents ((Kim et al., 2013; Wu et al., 2017) ; essai clinique NCT02699723). Un autre moyen indirect d'affecter l'activité des protéines Gli est de cibler leurs partenaires tels que la PI3K, la protéine kinase C atypique iota/lambda (aPKC  $\iota/\lambda$ , activateur des protéines Gli) et BRD4 (régulateur de l'activité transcriptionnelle de Gli1/2). En effet, un allongement du temps avant rechute d'un MB a été observé suite à un traitement combinant le sonidegib et un inhibiteur de la PI3K, le buparlisib (Buonamici et al., 2010).



**Figure 18 : Stratégies pour moduler l'activité de la voie de signalisation Hedgehog**

La voie Hedgehog (Hh) peut être modifiée à différents niveaux : en interférant avec l'interaction entre le ligand Hh et son récepteur Patched (Ptc); en modulant l'activité de Smoothened (Smo); en contrôlant la ciliogénèse et la localisation ciliaire des composants de la voie; en ciblant les facteurs de transcription Gli directement ou indirectement (en agissant sur leurs protéines régulatrices), d'après (Wu et al, *Cell. Chem. Biol.*, 2017). SuFu, Suppressor of Fused; PKA, protein kinase A; GSK3 $\beta$ , glycogen synthase kinase 3 $\beta$ ; CK1, casein kinase 1.

### III. MAINTIEN DE L'HOMÉOSTASIE MÉTABOLIQUE PAR L'HYPOTHALAMUS

#### 1. Circuits neuronaux clés

L'hypothalamus est localisé dans la partie ventrale du cerveau antérieur (Saper and Lowell, 2014). Il se compose de plusieurs noyaux comprenant, entre autres, le noyau arqué, le noyau ventromédial (VMH), le noyau dorsomédial (DMH), le noyau paraventriculaire (PVN) et l'aire hypothalamique latérale (LHA). Cette structure assure un rôle crucial dans la régulation de l'homéostasie énergétique (Yeo and Heisler, 2012). Diverses populations neuronales participent à la détection des hormones périphériques (insuline, leptine, ghréline). L'intégration de ces signaux externes renseigne sur le statut métabolique de l'organisme (niveaux des réserves et des dépenses énergétiques). En réponse, des circuits neuronaux impliquant différents noyaux hypothalamiques assurent un rôle clé notamment dans la régulation de la prise alimentaire et de la prise de poids. Ces neurones innervent parfois des régions extra-hypothalamiques afin d'assurer la régulation de l'homéostasie énergétique (pour revue, (Timper and Brüning, 2017)).

##### 1.1 Le noyau arqué

Le noyau arqué est localisé dans la partie ventrale de l'hypothalamus, adjacente à l'éminence médiane (EM). Dans cette région, la BHE présente une plus grande perméabilité due à la présence de vaisseaux fenestrés (Sisó et al., 2010). En raison de leur proximité avec l'EM, les neurones du noyau arqué sont les premiers à recevoir les signaux métaboliques provenant de la périphérie qu'ils traduiront en signaux neuronaux (Rodríguez et al., 2010).

Au sein du noyau arqué, deux populations neuronales, les neurones AgRP/NPY (Agouti-related peptide/neuropeptide Y) et POMC (pro-opiomelanocortin), ont été très largement étudiées pour leur implication dans la régulation de l'homéostasie énergétique (Jeong et al., 2014; Kim et al., 2018). Ces neurones aux rôles opposés forment le système mélanocortinergique. Ils expriment de nombreux récepteurs reconnaissant des hormones provenant de la périphérie dont ceux de la leptine, de l'insuline, du peptide YY (PYY) et de la ghréline (Marston et al., 2011; Myers and Olson, 2014).

### 1.1.1 Les neurones POMC

De par leur capacité à induire la sensation de satiété, les neurones POMC jouent un rôle clé dans la régulation de la prise alimentaire. Lors d'un repas, l'ingestion de nourriture entraîne l'activation de ces neurones qui libèrent alors une forme clivée active de l' $\alpha$ -MSH ( $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone), un facteur anorexigène. Ce composé stimule les récepteurs MC3/4R (récepteurs à mélanocortine 3 et 4) présents sur des neurones cibles de second ordre principalement distribués dans le PVN et la LHA. Il conduit ainsi à une réduction de la prise alimentaire accompagnée d'une augmentation de la dépense énergétique (Diano et al., 2011; Könner et al., 2009; Mountjoy, 2015; Timper and Brüning, 2017; Xu and Xie, 2016) (**Figure 19A-B**).

Les neurones POMC envoient des projections dans plusieurs régions servant de relais pour transmettre leur effet anorexigène. Ainsi l'innervation du VMH par les neurones POMC intervient dans la modulation de la prise alimentaire et implique l'action de l' $\alpha$ -MSH et la libération de BDNF (Xu et al., 2003). Les projections des neurones POMC vers le PVN et le DMH activent la thermogénèse au sein du tissu adipeux brun via le système nerveux sympathique (SNS), participant ainsi à la promotion de la dépense énergétique (Enriori et al., 2011). Ces neurones sont également en contact avec la LHA et des régions extra-hypothalamiques telles que le noyau du tractus solitaire dans le tronc cérébral, où sont exprimés les récepteurs MC3/4R (Koch et al., 2015; Toda et al., 2017; Waterson and Horvath, 2015). Il est à noter que chez un individu à jeun, la détection sensorielle de nourriture, est capable d'activer les neurones POMC même sans consommation d'aliment (Betley et al., 2015; Chen et al., 2015).

### 1.1.2 Les neurones AgRP/NPY

Au sein du noyau arqué, une population neuronale co-exprime deux puissants facteurs orexigéniques, l'AgRP et le NPY et libère également du GABA. Lorsque l'organisme est à jeun, ces neurones sont activés et sécrètent le peptide AgRP, un antagoniste des récepteurs MC3/4R, qui va stimuler la prise alimentaire (Betley et al., 2015; Chen et al., 2015; Xu and Xie, 2016) (**Figure 19A**). Comme les neurones POMC, les neurones AgRP/NPY innervent différentes régions pour exercer leurs effets sur la prise alimentaire et inhiber l'action des neurones POMC. Ainsi la stimulation des projections des neurones AgRP/NPY vers les noyaux hypothalamiques

PVN, LHA et DMH et des régions extérieures telles que l'aBNST (anterior subdivisions of the bed nucleus of the stria terminalis) et le PVT (paraventricular thalamic nucleus), permet l'induction de la prise alimentaire (Atasoy et al., 2012; Betley et al., 2013; Garfield et al., 2015).

Les neurones AgRP/NPY induisent également une réduction de la dépense énergétique reposant sur l'innervation du PVN, de la LHA et de l'aBNST par ces neurones orexigéniques. L'activation des neurones AgRP/NPY induit la libération de facteur NPY activant les récepteurs Y1 au sein des neurones du PVN et du tronc cérébral où ils conduisent à une diminution de l'expression de la tyrosine hydroxylase. Cette réduction entraîne une baisse d'activation de la voie sympathique connectée au tissu adipeux brun dont l'activité se voit diminuée aboutissant à une réduction de la dépense énergétique (Y.-C. Shi et al., 2013; Steculorum et al., 2016).

Les neurones AgRP/NPY vont renforcer leur action orexigénique en inhibant l'activité des neurones POMC. Le facteur AgRP est capable d'agir comme agoniste inverse des récepteurs MC3/4R empêchant l'action de l' $\alpha$ -MSH produite par les neurones POMC (Ollmann et al., 1997). Les neurones AgRP/NPY peuvent également libérer du GABA afin d'inhiber l'activité des neurones POMC (Xu and Xie, 2016). D'autres fonctions des neurones AgRP/NPY ont été rapportées telles que le contrôle de l'utilisation des substrats (équilibre entre carbohydrates et lipides) (Joly-Amado et al., 2012; Varela and Horvath, 2012a).

### *1.1.3 Autres populations neuronales*

Le noyau arqué comprend d'autres populations neuronales en plus des neurones AgRP/NPY et POMC, contribuant à la production et la libération de plus de 40 neuropeptides par ce noyau. Ainsi a été décrite une sous-population de neurones capables de libérer du glutamate. Ce dernier permet d'activer des projections contactant le PVN et promouvoir l'induction rapide de la satiété (Fenselau et al., 2017). Les neurones RIP (rat insulin-promoter), présents notamment dans le noyau arqué, assurent une inhibition GABAergique des projections vers le PVN et participent à l'augmentation de la dépense énergétique (Kong et al., 2012). Enfin des neurones dopaminergiques ayant une action orexigénique ont été décrits dans le noyau arqué. Ils seraient également capables de réguler l'activité des neurones AgRP et POMC à proximité (Zhang and van den Pol,

2016).

## 1.2 Les partenaires des effets métaboliques du noyau arqué

### *1.2.1 Autres noyaux hypothalamiques*

Les actions des neurones du noyau arqué, mises en place pour la modulation de l'homéostasie énergétique, impliquent d'autres régions hypothalamiques.

Le PVN module l'activité des organes périphériques via la régulation de fibres du SNS (pour revue, (Timper and Brüning, 2017)). Les neurones au sein du PVN reçoivent des afférences du noyau arqué et relayent ainsi la réponse métabolique en périphérie. Ils expriment des niveaux élevés de MC4R, récepteur du facteur anorexigène  $\alpha$ -MSH produit par les neurones POMC. L'altération de ces récepteurs au sein du PVN peut entraîner une hyperphagie conduisant au développement d'une obésité (Balthasar et al., 2005). Les neurones de cette région participent au maintien de l'homéostasie métabolique en agissant sur l'hypophyse via la libération de TSH (thyroid stimulating hormone) dans la veine porte du système hypothalamo-hypophysaire (Hollenberg, 2008). Il est à noter que la CRH (corticotropin-releasing hormone) et des peptides impliqués dans la reproduction sont également libérés à ce niveau.

La dégradation du VMH conduit également à une augmentation de la prise alimentaire et à une obésité. Dans ce noyau, des neurones exprimant divers récepteurs pour des facteurs régulant le métabolisme énergétique (leptine, œstrogène, BDNF) sont présents et vont favoriser la réduction de la prise alimentaire (King, 2006). Le VMH permet également de moduler la thermogénèse par le biais de ces neurones produisant SF1 (steroidogenic factor 1) (Choi et al., 2013; Kim et al., 2011).

Lors d'une mise à jeun, les niveaux bas de glucose activent les neurones au sein de la LHA qui expriment alors l'hypocrétine et l'orexine. Les projections GABAergiques de ces neurones vers différents noyaux hypothalamiques, dont le PVN, et d'autres régions du cerveau participent à l'induction de la prise alimentaire (Nieh et al., 2015; Sheng et al., 2014; Wu et al., 2015). Cependant, il est à noter que les neurones sensibles aux variations de glucose (neurones gluco-excités ou gluco-inhibés), jouant un rôle essentiel pour contrer l'hypoglycémie, sont principalement présents dans le noyau arqué et le VMH (Hirschberg et al., 2020).

### 1.2.2 Le nerf vague

Afin de moduler l'activité des tissus périphériques impliqués dans l'homéostasie énergétique, l'hypothalamus fait intervenir le système nerveux autonome (SNA) qui est composé de deux composantes aux actions opposées : le système nerveux sympathique (SNS) et le système nerveux parasympathique (SNP) qui naissent au niveau du tronc cérébral et de la moelle épinière, respectivement (Marino et al., 2011). Le SNS est activé lors de situations de défaut énergétique ou stress et stimule les réactions cataboliques. Ainsi, le SNS permet l'augmentation d'activité du tissu adipeux brun suite à l'activation des neurones POMC par la leptine et l'insuline. De même, l'augmentation de dépense énergétique induite par l'activation des récepteurs MC4R hypothalamiques implique la hausse d'activité du tissu adipeux brun via une action du SNS (Ste Marie et al., 2000; Voss-Andreae et al., 2007). A l'inverse, le système nerveux parasympathique (SNP) favorise le stockage d'énergie (Teff, 2008). Il intervient notamment, via le nerf vague qui est un de ses composants majeurs, dans la sécrétion d'insuline par les cellules  $\beta$  du pancréas suite à la détection d'une hyperglycémie par l'hypothalamus (Atef et al., 1997; Leloup et al., 2006). Le nerf vague innerve également une grande partie du système digestif. Il permet le retour d'informations du tube digestif au cerveau, et notamment à l'hypothalamus, grâce à ses fibres afférentes dont les terminaisons présentent des récepteurs aux molécules produites par le système digestif (Liu et al., 2014; Mansuy-Aubert et al., 2015; Ueno and Nakazato, 2016). Cette innervation vagale du système digestif est nécessaire au contrôle de la prise alimentaire et de l'homéostasie glucidique par les nutriments présents et les hormones produites (ghréline, PYY) dans le système digestif lors d'un repas (Wang et al., 2008) (pour revue, (Kim et al., 2018)). Ainsi, l'ablation du nerf vague chez le rongeur entraîne un affaiblissement de la réponse au PYY et GLP1, censée inhiber la prise alimentaire (Abbott et al., 2005). En plus des signaux chimiques, des stimuli mécaniques (mouvements du tube digestif induits par la prise d'un repas) peuvent également être perçus par les fibres afférentes du nerf vague (Ueno and Nakazato, 2016; Williams et al., 2016).

## 2. Les signaux métaboliques périphériques

De nombreux signaux périphériques vont atteindre l'hypothalamus et l'informer sur le statut énergétique de l'organisme. Ces signaux comprennent des hormones sécrétées par divers organes périphériques (insuline, leptine, ghréline), des nutriments ou des dérivés de ces nutriments (**Figure 19A-B**).

### 2.1 Principales hormones dans la régulation du métabolisme

#### *2.1.1 L'insuline*

L'insuline est produite et libérée par les cellules  $\beta$  du pancréas. Cette hormone joue un rôle clé dans la régulation des niveaux sanguins de glucose (pour revue, (Dodd and Tiganis, 2017)). La signalisation de l'insuline est initiée par la liaison du peptide à son récepteur. Le récepteur à l'insuline est composé de deux sous-unités  $\alpha$  de liaison au ligand, deux sous-unités  $\beta$  membranaires et un domaine cytoplasmique à activité tyrosine kinase. Les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  sont reliées par un pont disulfure. L'insuline peut également interagir avec le récepteur à l'IGF1 (insuline like growth factor 1) mais avec une plus faible affinité qu'avec le récepteur à l'insuline (Belfiore et al., 2009). Ces récepteurs sont présents sous forme d'homo- ou hétérodimères (Siddle, 2011). La liaison de l'insuline sur son récepteur conduit à la phosphorylation de ce dernier. Cela entraîne l'activation de protéines tyrosine kinase aboutissant à une phosphorylation supplémentaire sur d'autres résidus du récepteur à l'insuline. Des protéines IRS (insulin receptor substrates) sont également phosphorylées entraînant le recrutement de protéines adaptatrices qui vont permettre la poursuite de la signalisation en aval avec notamment l'activation de la voie PI3K/Akt. Cette suite d'évènements permet ainsi la transcription de gènes et l'activation de neurones nécessaires pour moduler l'homéostasie glucidique et énergétique (Dodd et al., 2015; Mayer and Belsham, 2009). Des tyrosines phosphatases, dont PTP1B (protein tyrosine phosphatase 1B) et TCPTP (T cell protein tyrosine phosphatase) agissent comme des régulateurs négatifs de la voie de l'insuline en déphosphorylant le récepteur à l'insuline (Zhang et al., 2015). Un autre répresseur, SOCS3 (suppressor of cytokine signaling 3), est capable d'inhiber directement le récepteur à l'insuline ou de se lier aux protéines IRS et d'induire leur dégradation (Shi et al., 2004).

L'insuline est un régulateur majeur de l'homéostasie glucidique et énergétique (Belgardt and Brüning, 2010). A la suite d'un repas, l'augmentation de glucose dans le sang induit la sécrétion d'insuline qui intervient au niveau de nombreux tissus dont le cerveau. Le récepteur de l'insuline et les autres éléments de cette signalisation ont été rapportés dans de nombreuses régions du cerveau de mammifères dont celui de l'Homme (Dodd and Tiganis, 2017). Dans l'hypothalamus, certains neurones récupèrent le glucose par le transporteur de glucose GLUT4 dépendant de l'insuline (Ren et al., 2014).

En raison de sa taille (51 acides aminés), le passage de l'insuline à travers la BHE par diffusion passive est restreint. Une entrée de ce peptide directement par les vaisseaux fenestrés de l'EM ou un passage indirect via le liquide céphalorachidien, ont ainsi été proposés. Dans le premier cas, les neurones en contact avec l'insuline seraient ceux du noyau arqué (Sisó et al., 2010). L'administration d'insuline en périphérie entraîne ainsi rapidement des effets sur les neurones du noyau arqué (Varela and Horvath, 2012b; Yang and McKnight, 2015). Parmi ces effets, ont été décrits une phosphorylation de l'AKT Ser-473 (signe de l'activation du récepteur à l'insuline) et une augmentation de l'expression du marqueur d'activité neuronale cFos (Koch et al., 2008; Williams et al., 2010). D'autres noyaux hypothalamiques sont activés par l'injection périphérique ou centrale d'insuline, le VMH, DMH et PVN (Qiu et al., 2014), indiquant un rôle de la voie de l'insuline dans diverses régions de l'hypothalamus.

Dans le noyau arqué, une inhibition des neurones AgRP/NPY a été décrite en présence d'insuline. En effet, l'activation de la PI3K par la voie de l'insuline entraîne l'activation des canaux potassiques sensibles à l'ATP conduisant à l'hyperpolarisation de la membrane des neurones AgRP/NPY et une diminution de la fréquence de leur potentiel d'action (Roh et al., 2016; Varela and Horvath, 2012b; Zhang et al., 2015). Cette inhibition des neurones AgRP/NPY conduira donc à une diminution de la prise alimentaire et une hausse de la dépense énergétique. La réponse des neurones POMC, autre population importante du noyau arqué, à l'insuline est variable et porte à débat en raison des effets contraires rapportés (Könner et al., 2007; Qiu et al., 2014; Williams et al., 2010). Ces neurones du noyau arqué transmettent le signal insulinique via leurs projections à divers noyaux dont le PVN, VMH, DMH, LHA et le complexe vague dorsal (Wang et al., 2015; Xu and Xie, 2016). En plus de son action sur les neurones, l'insuline intervient au niveau des cellules gliales du noyau arqué

qui participent à la régulation du transport de glucose dans ce noyau.

L'administration centrale d'insuline permet d'augmenter l'activité du SNP pouvant conduire à l'augmentation de la dépense énergétique (pour revue, (Waterson and Horvath, 2015)). Au niveau du foie, cette hormone empêche la production hépatique de glucose (HGP) tout en favorisant la synthèse de glycogène. Cet effet ne peut pas avoir lieu lors de la délétion conditionnelle du récepteur à l'insuline dans les neurones AgRP du noyau arqué, indiquant l'implication de ces neurones dans la répression de la HGP par l'insuline (Könner et al., 2007). L'insuline peut également directement intervenir sur le foie en augmentant l'entrée de glucose et le stockage de glycogène tout en réduisant la HGP (Titchenell et al., 2017). Le muscle et le tissu adipeux sont d'autres cibles périphériques directes de l'insuline. En réponse à un repas, l'insuline augmente l'entrée de glucose dans ces tissus. Ces effets servent à empêcher une augmentation des niveaux de glucose sanguin. L'insuline exerce également une action répressive sur le processus de lipolyse au sein du tissu adipeux blanc via des neurones du noyau arqué, supposément les neurones POMC (Shin et al., 2017).

### *2.1.2 La leptine*

La leptine est une hormone produite par le tissu adipeux et induite par l'insuline (Russell et al., 2001). La quantité de leptine libérée dans la circulation est proportionnelle aux stocks de tissus adipeux de l'organisme (Myers and Olson, 2012). Au niveau intracellulaire, la liaison de la leptine à son récepteur conduit à l'activation de la voie STAT3/SOCS3 (signal transducer and activator of transcription 3/suppressor of cytokine signaling 3). Les niveaux supérieurs de SOCS3 participent à une boucle de rétrocontrôle négative conduisant à l'inhibition de STAT3 (Ernst et al., 2009).

Les cibles de cette hormone sont localisées dans le cerveau. La leptine assure ainsi un rôle clé dans la régulation centrale de la prise alimentaire et de l'homéostasie énergétique. Le transport de leptine au sein du cerveau serait réalisé au niveau de l'EM et ferait intervenir les tanocytes bordant le troisième ventricule (Balland et al., 2014). Cette hormone agit au niveau du noyau arqué, activant les neurones POMC tout en inhibant les neurones AgRP/NPY aboutissant à une augmentation de la dépense énergétique et de la sensation de satiété (Timper and Brüning, 2017). La leptine intervient également au niveau du VMH, noyau dans lequel

une surexpression du récepteur à la leptine (plus précisément dans les neurones SF1) permet une amélioration de l'homéostasie glucidique (R. Zhang et al., 2008) suggérant l'implication de ces neurones dans l'action de la leptine. Dans le DMH, la liaison de la leptine à son récepteur conduit à l'activation d'une voie sympathique associée au tissu adipeux brun. Cet effet conduit à une augmentation de la dépense énergétique, et met en avant un contrôle du poids indépendant de la prise alimentaire (Enriori et al., 2011; Rezai-Zadeh et al., 2014).

Il est à noter que les actions de la leptine et de l'insuline sont interconnectées au niveau de l'hypothalamus; toutes deux favorisant une diminution de la prise alimentaire et une hausse de la dépense énergétique. Bien que leurs récepteurs soient exprimés dans différents groupes neuronaux, la présence de ces deux hormones est nécessaire pour permettre l'effet anorexigénique et la régulation du glucose sanguin.

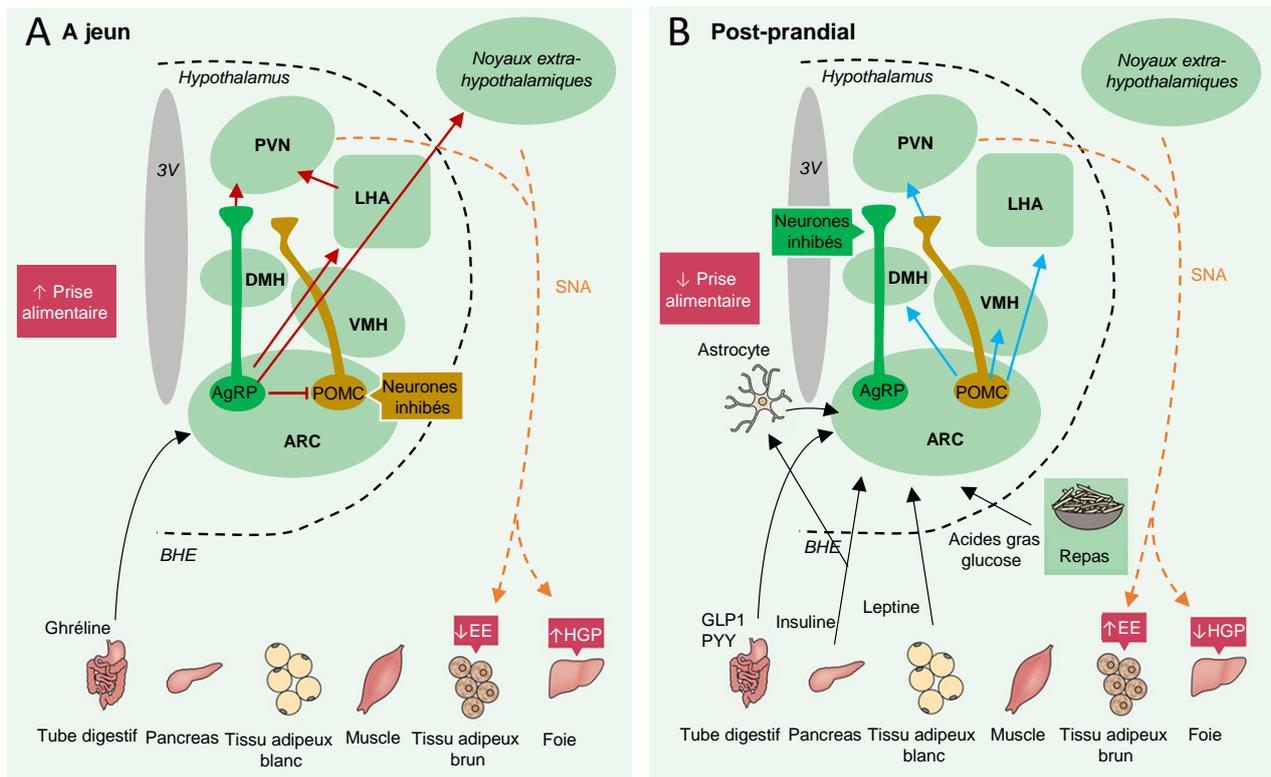
### *2.1.3 Les hormones du système digestif*

Plusieurs hormones sont produites par le système digestif dont la ghréline et GLP1 (glucagon-like peptide 1). Ces peptides interviennent dans le contrôle de l'énergie par le système nerveux central. La production de ghréline est réalisée par l'estomac principalement lors d'un jeûne tandis qu'elle est bloquée par l'ingestion de nourriture. Ce peptide orexigène agit sur les neurones AgRP/NPY et PVN conduisant à l'augmentation de la prise de poids et de l'adiposité, respectivement (Andrews, 2011; Wren et al., 2001). Il est à noter que l'activation des neurones PVN par la ghréline est maintenue en cas d'obésité suggérant que la hausse d'adiposité induite par la ghréline ne serait pas médiée par une altération de la prise alimentaire (Briggs et al., 2010; Shrestha et al., 2009).

GLP1 est sécrété par les cellules entéro-endocrines de l'intestin suite à un repas et exerce un effet anorexigénique (Sobrino Crespo et al., 2014). Ce peptide participe au contrôle central de la prise alimentaire, du poids et de l'homéostasie glucidique par les neurones du noyau arqué et du noyau parabrachial (situé en dehors de l'hypothalamus) (pour revue, (Timper and Brüning, 2017)). Des analogues de ce peptide ont été approuvés pour le traitement des individus obèses et ceux atteints de diabète de type 2 (Burcelin and Gourdy, 2017; Halawi et al., 2017).

Les neurones du noyau arqué sont également les cibles principales du peptide PYY, facteur participant

à la régulation de la prise alimentaire. L'administration de PYY dans le noyau arqué a ainsi conduit à une inhibition de la prise alimentaire associée à une diminution de l'expression de NPY (Batterham et al., 2002). Comme GLP1 et PYY, le peptide CCK (cholécystokinine) est une hormone produite par l'intestin suite à une prise alimentaire et supprimant l'appétit (Sobrino Crespo et al., 2014).



**Figure 19 : Circuits hypothalamiques régulant l'appétit et l'homéostasie énergétique**

(A) Lorsque l'organisme est à jeun, la ghréline, libérée par l'estomac traverse la barrière hématoencéphalique (BHE) et se lie à ses récepteurs présents dans l'hypothalamus. Cette hormone stimule ainsi la prise alimentaire en activant les neurones AgRP/NPY qui projettent majoritairement vers des neurones localisés dans le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus (PVN) et l'aire hypothalamique latérale (LHA). L'activation des neurones AgRP/NPY entraîne la libération de peptide NPY qui permet l'augmentation de la prise alimentaire, la réduction de la dépense énergétique (EE) et la production hépatique de glucose (HGP). Les projections des neurones AgRP/NPY et PVN vers des régions extrahypothalamiques, dont les noyaux du tronc cérébral, participeraient à la stimulation de la prise alimentaire par le système nerveux autonome (SNA). Le peptide AgRP, également produit par les neurones AgRP/NPY, agit comme un agoniste inverse des récepteurs à mélanocortine MC3/4R. Il bloque l'effet anorexigénique des neurones POMC. Les neurones AgRP/NPY répriment directement les neurones POMC par une action inhibitrice GABAergique au sein du noyau arcué (ARC). (B) Dans l'état post-prandial, les neurones AgRP/NPY sont inhibés. Les neurones POMC sont activés par des hormones produites par le tissu adipeux, le pancréas et le système digestif en complément des acides gras et glucose provenant du repas consommé. Les neurones POMC libèrent l' $\alpha$ -MSH, un neuropeptide qui stimule les récepteurs MC3/4R et aboutit à une diminution de la prise alimentaire et de la HGP tandis que la dépense énergétique est augmentée. Les neurones POMC projettent principalement vers des neurones dans le PVN mais innervent également le VMH, le DMH et la LHA. Le SNA est impliqué dans les effets anorexigéniques des neurones POMC. Les astrocytes inhibent les neurones AgRP/NPY et participent au contrôle de la prise alimentaire et de l'homéostasie glucidique par la leptine et l'insuline, modifié à partir de (Timper and Brüning, *Dis. Model. Mech.*, 2017). AgRP, Agouti-related peptide; NPY, Neuropeptide Y; POMC, pro-opiomelanocortin; ARC, noyau arcué; VMH, noyau hypothalamique ventromédial; DMH, noyau hypothalamique dorsomédial; 3V, troisième ventricule.

## 2.2 Détection des signaux périphériques

### *2.2.1 L'éminence médiane*

L'éminence médiane (EM) est un organe circumventriculaire (CVO). Ce terme caractérise des régions du cerveau où la BHE, barrière protégeant le parenchyme cérébral de potentiels composés toxiques présents en périphérie, est moins étanche. Cette propriété est due à la présence de vaisseaux fenestrés (Ciofi et al., 2009). Les parois de ces vaisseaux présentent une plus grande perméabilité et permettent ainsi la diffusion passive de composés périphériques (Schaeffer et al., 2013). Ainsi l'accès des hormones périphériques et des signaux nutritifs aux neurones à proximité d'un CVO est facilité, c'est le cas des neurones du noyau arqué proches de l'EM (Rodríguez et al., 2010; Sisó et al., 2010). Dans l'EM, cette BHE est également formée par les prolongements des tanocytes, cellules gliales bordant le troisième ventricule.

### *2.2.2 Caractéristiques générales des tanocytes*

Les tanocytes sont des cellules gliales spécialisées localisées sur les bords du troisième ventricule au niveau de l'éminence médiane hypothalamique. Les prolongements de ces cellules se projettent dans le parenchyme ou dans les vaisseaux à la surface de l'EM. Les tanocytes peuvent être classés en quatre sous-types :  $\beta$ ,  $\nu\alpha_2$  (ventral  $\alpha_2$ ),  $d\alpha_2$  (dorsal  $\alpha_2$ ) et  $\alpha_1$ . Cette catégorisation est basée sur la localisation de ces cellules le long du ventricule, les projections de leurs prolongements dans le parenchyme et la présence de marqueurs histochimiques (Prevot et al., 2018). Des épendymocytes sont également retrouvés dans la partie dorsale du ventricule (Mirzadeh et al., 2017). Un rôle des tanocytes a été rapporté dans le transport de peptides entre le cerveau et la périphérie. Ces cellules interagissent avec les terminaisons des neurones sécrétant des molécules endocrines telles que la GnRH agissant sur l'hypophyse. Elles participent ainsi au contrôle de la sécrétion de neuropeptides dans la circulation porte hypothalamo-hypophysaire (Clasadonte and Prevot, 2018).

### *2.2.3 Point d'accès vers les neurones du noyau arqué*

Les tanocytes régulent l'accès des hormones périphériques aux neurones hypothalamiques, notamment ceux du noyau arqué présents à proximité, et participent au maintien de l'homéostasie

énergétique. En effet, certaines molécules (leptine et ghréline) seraient capables de passer par transcytose à travers les tanocytes pour atteindre les neurones du noyau arqué (Cabral et al., 2014; Colden et al., 2015). Par ce moyen, elles peuvent également se retrouver dans le ventricule et ainsi agir au niveau de régions cérébrales plus éloignées (Balland et al., 2014; Langlet, 2014).

Les tanocytes dans le plancher du troisième ventricule (tanocytes  $\beta$ ) contactent les vaisseaux présents dans l'EM. Les tanocytes situés sur les parois latérales du ventricule envoient également leurs prolongements au contact des microvaisseaux dérivés de ceux de l'EM et présents dans le noyau arqué. Les tanocytes participent donc à la structure de la BHE. De plus, ils sont reliés entre eux par des jonctions serrées empêchant la diffusion passive de molécules provenant de la périphérie depuis les vaisseaux fenestrés de l'EM. Ces jonctions serrées sont dynamiques et peuvent être modifiées notamment par l'état nutritionnel de l'organisme (Langlet et al., 2013; Mullier et al., 2010; Schaeffer et al., 2013). Ainsi, un jeûne de 24h entraîne une augmentation de la fenestration des vaisseaux de l'EM et de leurs ramifications dans le noyau arqué tout en renforçant l'organisation des jonctions serrées entre les tanocytes (Langlet et al., 2013). Ce phénomène pourrait permettre de favoriser le passage des molécules dans le parenchyme hypothalamique aux dépens de l'entrée dans le ventricule. Il est à noter que les tanocytes sont capables de sécréter des facteurs (ATP, facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF)) en réponse au glucose (Benford et al., 2017; Bolborea and Dale, 2013; Frayling et al., 2011). Ces molécules pourraient agir sur la perméabilité des vaisseaux et sur l'activité des neurones à proximité.

#### *2.2.4 Cellules souches putatives de l'hypothalamus*

Les tanocytes ont été proposés comme de potentielles cellules souches de l'hypothalamus, capables de produire des neurones et des cellules gliales. Plusieurs études ont décrit la capacité de ces cellules à proliférer *in vivo* bien que ce soit rare. L'utilisation de souris transgéniques pour le lignage de ces cellules a permis de mettre en évidence leur rôle dans la synthèse de nouveaux tanocytes et astrocytes (Haan et al., 2013; D. A. Lee et al., 2012; Robins et al., 2013). Cette potentielle neurogénèse hypothalamique pourrait être activée en réponse à des stimuli alimentaires ou reproductifs et participer à la régulation de l'homéostasie énergétique.

Les astrocytes hypothalamiques ont été traités en amont (voir §I.1.2).

### **3. L'obésité : un exemple de dysfonctionnement métabolique**

L'augmentation du nombre de personnes obèses dans le monde au cours des dernières décennies a conduit à la qualification de ce phénomène comme véritable épidémie. L'obésité est associée au développement de comorbidités telles que des maladies cardiovasculaires ou un diabète de type 2, pouvant expliquer le taux de mortalité plus important en comparaison des personnes non obèses (Adams et al., 2006; Kim et al., 2016). Cet état pathologique est dû à une dérégulation du métabolisme énergétique (Crowley et al., 2002). De mauvaises habitudes de vie (excès de nourriture et manque d'activité physique) ont longtemps été considérées comme les seules causes de l'obésité chez les individus. Cependant, de nombreuses études ont pu mettre en avant l'existence de mutations génétiques, de modifications épigénétiques et d'influences environnementales intervenant dans la mise en place de l'obésité.

#### 3.1 Causes de l'obésité

Des mutations dans des gènes codant pour des protéines impliquées dans le contrôle du métabolisme ont été identifiées chez des individus obèses et des modèles rongeurs d'obésité. Parmi ces protéines, les plus connues sont la leptine et son récepteur dont les mutations conduisent à une des formes les plus sévères d'obésité (pour revue, (Timper and Brüning, 2017)). Les souris déficientes pour le récepteur à la leptine (db/db) sont ainsi des modèles rongeurs d'obésité. Un autre modèle d'obésité basé sur une résistance à la leptine est le rat obèse Zucker Fatty. Il présente une absence de récepteur pour cette hormone qui s'accompagne d'une résistance à l'insuline et une hypoghrélinémie (Al-Awar et al., 2016). Des polymorphismes uniques (SNP, single nucleotide polymorphisms) au sein du gène FTO (fat mass and obesity-associated protein) ont également été associés au développement d'un état obèse (Hess and Brüning, 2014). Des mutations touchant des facteurs de transcription et neurotransmetteurs impliqués dans la modulation de la mélanocortine ont aussi été mises en évidence chez des patients obèses (Bonfond et al., 2013; J. C. Han et al., 2008; Yeo et al., 2004).

Des études ont mis en avant l'impact de l'obésité maternelle sur le développement de désordres

métaboliques chez la descendance (Godfrey et al., 2017; Steculorum et al., 2013). La consommation d'un régime gras par la mère peut ainsi entraîner une altération du système mésolimbique dopaminergique conduisant chez la descendance à une préférence pour une alimentation grasse et sucrée (Bayol et al., 2007; Naef et al., 2011). De plus, une déficience de la réponse à la leptine ainsi que des problèmes d'homéostasie glucidique ont également été rapportés chez la descendance de souris soumises à un régime HFD (high fat diet) (Vogt and Brüning, 2013). En parallèle de ces altérations, une réponse inflammatoire au niveau des tissus hypothalamiques est décrite chez des rongeurs et des primates non-humains dont la mère a consommé un régime riche en acides gras saturés lors des périodes de gestation et de lactation (Grayson et al., 2010; Pimentel et al., 2012).

L'alimentation en période périnatale a également été proposée comme cruciale dans le développement de désordres métaboliques chez l'individu adulte. Une malnutrition au cours de cette période peut ainsi conduire à une altération de la balance hormonale. Les niveaux modifiés d'hormones métaboliques peuvent impacter les circuits neuronaux impliqués dans la régulation de l'homéostasie énergétique chez l'adulte (Bouret et al., 2015). Un excès de nourriture peut également altérer les niveaux hormonaux : un dysfonctionnement du transport de la ghréline dans l'hypothalamus a été rapporté dans ce cas ainsi que le développement d'une résistance centrale à la ghréline périphérique (Colden et al., 2015; Steculorum et al., 2015).

### 3.2 Conséquences d'un régime riche en graisses

L'obésité entraîne le développement d'une résistance des tissus à l'action d'hormones telles que l'insuline et la leptine. Cet effet touche aussi bien les cibles périphériques que centrales de ces hormones (Jais and Brüning, 2017). Le développement d'une résistance à l'insuline est une des caractéristiques de l'obésité et également du diabète de type 2 (Boucher et al., 2014). Ce phénomène correspond à l'altération de la signalisation de l'insuline en aval du récepteur à l'insuline au sein des tissus cibles, dont le cerveau, les empêchant de répondre à la présence de cette hormone (Samuel and Shulman, 2012). Une hypoghrélinémie se développe également lors de l'obésité avec insulino-résistance. Bien que des paramètres génétiques et

environnementaux interviennent dans le développement de l'obésité. Les habitudes alimentaires assurent une grande partie de l'origine de cet état pathologique.

L'administration d'un régime HFD chez la souris permet d'obtenir un modèle d'obésité. Les acides gras saturés utilisés dans ce régime sont capables de passer la BHE. Ils entraînent l'activation de signalisations telles que celle de TLR4 (Toll-like receptor 4) conduisant à une réponse inflammatoire au sein de l'hypothalamus (Dalvi et al., 2017; Milanski et al., 2009; Valdearcos et al., 2014). Ces composés sont également associés au développement de résistance à l'insuline et à la leptine, notamment via l'activation de TLR4. L'augmentation de SOCS3, un inhibiteur de la voie de l'insuline, dans le noyau arqué a également été rapportée au cours d'un régime HFD et participe à la mise en place de la résistance à ces hormones métaboliques (Jais and Brüning, 2017; Olofsson et al., 2013). La résistance à l'insuline intervient ainsi au niveau des neurones AgRP et POMC du noyau arqué. De façon intéressante, un régime HFD de 72h suffit pour réduire de façon significative la sensibilité à l'insuline des neurones hypothalamiques (Clegg et al., 2011). De plus, la résistance à l'insuline apparaît avant tout évènement inflammatoire périphérique (Prada et al., 2005).

La prise d'un régime HFD à long terme renforce ses effets délétères. Les cellules gliales (astrocytes, microglie) libèrent des facteurs inflammatoires conduisant à une altération permanente des fonctions métaboliques de l'hypothalamus. L'inflammation prolongée peut notamment entraîner l'apoptose des neurones hypothalamiques (Moraes et al., 2009). Un de ces facteurs, le TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ ), induit l'augmentation de l'expression de PTP1B, inhibiteur majeur de la voie de l'insuline, favorisant le maintien de la résistance à l'insuline (Zabolotny et al., 2008).

Des modifications de la plasticité synaptique ont été rapportées lors d'un régime HFD altérant la réponse neuronale aux stimuli extérieurs. En effet, les neurones AgRP et POMC du noyau arqué présentent moins de synapses chez des souris soumises à un régime HFD en comparaison de souris ayant un régime normal. Cette déficience des synapses des neurones POMC pourrait réduire le signal inhibiteur de la prise alimentaire émis par ces neurones, amplifiant le phénotype d'obésité (Horvath et al., 2010; McNay et al., 2012).

Les effets du régime HFD (inflammation, résistance à l'insuline et à la leptine) sont amplifiés par le développement d'un stress du réticulum endoplasmique et par la déficience de la réponse UPR (unfolded protein response), mécanisme d'aide au bon repliement des protéines (Cintra et al., 2012; X. Zhang et al., 2008). L'induction de la prise alimentaire par la ghréline, hormone agissant sur les neurones AgRP/NPY, est également modifiée (Briggs et al., 2010).

### 3.3 Inflammation et modification de la vascularisation

En parallèle de l'obésité, se met en place une inflammation chronique des tissus, réponse de faible intensité perdurant dans le temps (Jais and Brüning, 2017) et qui va participer au processus de résistance des neurones aux différentes hormones régulant l'homéostasie énergétique. Avant même la prise de poids, apparaît une inflammation hypothalamique causée, notamment, par les niveaux élevés d'acides gras saturés atteignant le cerveau (Milanski et al., 2009; Thaler et al., 2012). Cette réponse implique une activation de la microglie qui est également rendue réactive par les produits avancés de glycation (AGE, advanced glycation end products), éléments toxiques libérés par les neurones POMC et NPY stimulés par le régime gras (Gao et al., 2017). L'activation de la microglie conduit à l'augmentation de TNF- $\alpha$ , facteur capable de promouvoir le stress mitochondrial dans les neurones POMC induisant le dysfonctionnement de ces neurones (Yi et al., 2017). Les facteurs inflammatoires libérés par la microglie permettent également le recrutement de monocytes périphériques au sein de l'hypothalamus amplifiant la réaction inflammatoire. En plus de la microglie, des astrocytes réactifs ont été décrits dans le noyau arqué de rongeurs et d'humains obèses et rendraient les neurones AgRP et POMC de ce noyau moins sensibles à l'insuline (Dorfman and Thaler, 2015; Horvath et al., 2010). Ces astrocytes sécrètent des facteurs régulant l'expression de cytokines par la microglie et du VEGF affectant l'organisation des vaisseaux à proximité (Argaw et al., 2012; Gorina et al., 2011).

La vascularisation est également affectée par l'inflammation accompagnant l'état d'obésité (Thaler et al., 2013). En effet, une augmentation de la densité et de la longueur des microvaisseaux cérébraux a été rapportée chez des humains et rongeurs obèses (Yi et al., 2012a, 2012b). Ces effets conduisent à une réduction de la perméabilité de la BHE pouvant ainsi restreindre le passage d'hormones (insuline, leptine) de la périphérie

au cerveau (Dodd and Tiganis, 2017). Cette réponse passe par l'inhibition de l'expression de protéines impliquées dans les jonctions serrées des cellules endothéliales notamment la claudin-5 (Beard et al., 2014; Nitta et al., 2003).

L'administration d'un régime HFD conduit à une augmentation de production de ROS (reactive oxygen species) jusqu'à l'arrivée à un plateau. Les quantités élevées de ROS altèrent les signaux de satiété qui doivent être émis par les neurones POMC (Shadel and Horvath, 2015). De façon intéressante, la metformine, un traitement dans le diabète de type 2 exercerait son action via l'inhibition de la respiration mitochondriale (El-Mir et al., 2000) et permettrait donc de réduire la production de ROS par les cellules.

#### IV. Présentation du sujet de thèse

Dans ce contexte bibliographique et suite aux travaux de l'équipe mettant en évidence l'importance de la voie Shh dans la régulation des cellules souches adultes, je me suis attachée, au cours de ma thèse, à identifier les effets de l'activation spécifique de la voie Shh dans les cellules souches et astrocytes du cerveau de souris adulte. Mes recherches se sont ainsi orientées autour de trois axes principaux :

1) L'analyse détaillée du rôle de la voie Shh au sein de la ZSV, en particulier sur les différentes populations de CSNs (quiescentes et activées) de cette région. Cette étude a été réalisée en collaboration avec le Dr François Boussin (CEA de Fontenay aux Roses).

2) La découverte et caractérisation d'un signal pouvant correspondre à la protéine Shh, révélé par l'anticorps C9C5, dans une sous-population d'oligodendrocytes matures. Ces cellules expriment les transcrits de Shh et constituent ainsi une source potentielle du ligand dans le cerveau adulte. Ce travail a été réalisé en collaboration avec les Drs Giuliana Pellegrino et Ariane Sharif (Université de Lille).

3) L'identification de la voie Shh dans les astrocytes hypothalamiques et l'analyse des altérations métaboliques associées à l'activation de la voie Shh dans ces cellules. Ce travail a été réalisé en collaboration avec des spécialistes des fonctions métaboliques de l'hypothalamus, les Drs Yacir Benomar et Mohammed Taouis (Institut des Neurosciences Paris Saclay, Orsay), une spécialiste de la physiologie du tissu adipeux, le Dr Soazig Lelay (Université d'Angers) et la plateforme d'exploration physiologique fonctionnelle dédiée à l'analyse des paramètres métaboliques, dirigée par les Drs Raphaël Denis et Serge Luquet (Université Paris-Diderot).

L'ensemble de ce travail a été mené à l'aide de diverses approches : des marquages immunologiques, de l'hybridation *in situ* (smFISH, single-molecule fluorescent *in situ* hybridization), des techniques de biologie moléculaire et de biochimie *in vivo* et *in vitro* et des tests de réponses métaboliques.

## **RESULTATS EXPERIMENTAUX**

**Article 1, Daynac *et al*, Stem Cell Reports, 2016**

Mathieu Daynac, **Linda Tirou**, Hélène Faure, Marc-Andr e Mouthon, Laurent R. Gauthier, Heidi Hahn, François D. Boussin, Martial Ruat. Hedgehog Controls Quiescence and Activation of Neural Stem Cells in the Adult Ventricular-Subventricular Zone. **Stem Cell Reports**, 2016, 7 (4), pp 735-748, (10.1016/j.stemcr.2016.08.016) (hal-01373136v1)

## Résumé

La zone sous-ventriculaire des ventricules latéraux (ZSV) est une des principales niches neurogéniques du cerveau adulte de souris. Elle produit de nouvelles cellules, neurones et cellules gliales, tout au long de la vie. Dans cette région, les cellules souches neurales (CSNs) sont composées de CSNs quiescentes et activées, qui se distinguent par un taux de prolifération faible et élevé, respectivement. L'activation des CSNs quiescentes conduit à la production de CSNs activées qui prolifèrent et forment des précurseurs à amplification transitoire (TACs). A leur tour, les TACs se multiplient et produisent des neuroblastes qui, une fois matures, migrent jusqu'au bulbe olfactif pour intégrer les circuits neuronaux impliqués dans l'olfaction et l'apprentissage des odeurs. La voie de signalisation Sonic Hedgehog (Shh) intervient dans la régulation de cette niche neurogénique. Afin d'étudier les mécanismes de cette régulation, notre équipe a développé la lignée *Glast-Cre<sup>ERT2</sup>-YFP-Ptc<sup>f/f</sup>*, un modèle de délétion conditionnelle de la protéine Patched (Ptc), récepteur du ligand Shh et modulateur négatif de la voie Shh. Cette délétion est réalisée spécifiquement dans les cellules *Glast<sup>+</sup>* (astrocyte specific glutamate transporter), marqueur exprimé par les CSNs et les astrocytes. Chez la souris *Glast-Cre<sup>ERT2</sup>-YFP-Ptc<sup>-/-</sup>* (*YFP-Ptc<sup>-/-</sup>*), l'expression du rapporteur YFP et la délétion de Ptc sont initiées dans les CSNs *Glast<sup>+</sup>* suite à un traitement au tamoxifène. Les souris *Glast-Cre<sup>ERT2</sup>-YFP-Ptc<sup>+/+</sup>* (*YFP-Ptc<sup>+/+</sup>*), produites parallèlement, présentent l'expression du rapporteur YFP dans les cellules *Glast<sup>+</sup>* et sont utilisées comme contrôles des souris *YFP-Ptc<sup>-/-</sup>*. La délétion de Ptc dans les cellules *Glast<sup>+</sup>* chez l'adulte entraîne une activation de la voie Shh dans la ZSV et aboutit à une diminution très importante de la neurogénèse (Feret et al., 2014). A l'inverse, la population de CSNs s'accroît et les divisions symétriques de ces cellules augmentent. Cependant, la nature quiescente ou activée des CSNs affectées par cette modulation de la voie Shh reste à déterminer. A cette question s'ajoute celle de l'influence de la durée d'activation de la voie Shh sur la régulation de la neurogénèse au sein de la ZSV.

Afin d'étudier le rôle de la voie de signalisation Shh dans la ZSV *in vivo*, nous avons analysé les différentes populations de cette niche neurogénique chez les souris *YFP-Ptc<sup>-/-</sup>* et *YFP-Ptc<sup>+/+</sup>*, 6 mois après l'induction de la recombinaison par traitement au tamoxifène. Nous avons identifié et quantifié ces cellules à

l'aide d'analyses immunohistochimiques (IHC) basées sur des marqueurs spécifiques de chacune de ces populations. Cette analyse a mis en évidence une réduction du nombre total de cellules YFP<sup>+</sup> accompagnée d'une diminution des populations de précurseurs neuronaux, TACS et neuroblastes, identifiés par un marquage GFAP<sup>+</sup>MASH1<sup>+</sup> et DCX<sup>+</sup> (doublecortine), respectivement. A l'inverse, un nombre plus important de CSNs (GFAP<sup>+</sup>Sox2<sup>+</sup> ou GFAP<sup>+</sup>S100β<sup>+</sup>) a été observé. De façon intéressante, le nombre de CSNs activées, identifiées par un marquage GFAP<sup>+</sup>MASH1<sup>+</sup>, est diminué. Les CSNs et précurseurs n'exprimant pas le rapporteur YFP restent inchangés démontrant que les effets observés sont spécifiques aux cellules YFP<sup>+</sup> et sont donc induits par la délétion de Ptc. Ces résultats suggèrent qu'une activation à long terme de la voie Shh au sein des CSNs Glaxt<sup>+</sup> conduit à une accumulation des CSNs quiescentes tandis que les CSNs activées et leur descendance sont fortement réduites. La voie Shh serait donc impliquée dans le contrôle de la réserve de CSNs quiescentes *in vivo* mais interviendrait également dans la régulation de leur descendance.

L'utilisation d'une technique de FACS (fluorescence-activated cell sorting) nous a permis d'effectuer une analyse systématique et plus approfondie des populations de la ZSV tout en confirmant les résultats obtenus par IHC. Cette méthode permet la purification de cellules à l'aide d'une combinaison de marqueurs (Lex, EGFR et CD24) exprimés par les CSNs et précurseurs neuronaux de la ZSV. Avec cette technique, nous avons pu répliquer les résultats obtenus par IHC sur une lignée de souris Glaxt-Ptc<sup>+/+</sup> et Glaxt-Ptc<sup>-/-</sup> 6 mois post-tamoxifène. Ces souris transgéniques ne présentent pas de rapporteur YFP indiquant que les effets observés sont indépendants de l'expression de cette protéine et peuvent être reproduits sur une autre lignée. L'étude des niveaux d'expression de gènes cibles de la voie Shh, les facteurs Gli1-3, sur les populations de la ZSV purifiées par FACS, a mis en évidence une augmentation de Gli1 uniquement dans les CSNs quiescentes. Ces résultats démontrent qu'une activation de la voie Shh est associée à l'accumulation de CSNs quiescentes et confirment la chute du nombre de CSNs activées et de précurseurs observée par IHC.

L'analyse par FACS des populations de la ZSV à différents temps après induction de la recombinaison (15 jours, 6 mois et 10 mois) a mis en évidence des effets distincts de la délétion de Ptc au cours du temps. En effet, 15 jours post-tamoxifène, le nombre de CSNs quiescentes et activées mais également de TACs est

augmenté. Cependant, à long terme (6 et 10 mois), seule la population de CSNs quiescentes continue à s'accroître. A l'inverse, les CSNs activées et les précurseurs neuronaux sont fortement réduits. Il est à noter qu'aucun changement significatif du nombre d'astrocytes matures n'a été détecté. La délétion de Ptc dans les cellules Glast<sup>+</sup> conduit donc initialement à une augmentation des CSNs activées et TACs puis à une chute de ces cellules tandis que le nombre de CSNs quiescentes augmente au cours du temps.

Nous avons ensuite analysé la prolifération des populations cellulaires de la ZSV à court et long terme à l'aide de souris FUCCI-green, lignée transgénique dont les cellules en phase S-G2/M émettent une fluorescence verte. L'identification des cellules vertes au sein des populations de la ZSV par FACS a permis de démontrer une augmentation des CSNs activées et quiescentes prolifératives suite à l'injection intraventriculaire (icv) de Shh tandis que les précurseurs neuronaux ne sont pas modifiés. Ces effets sont retrouvés chez la souris YFP-Ptc<sup>-/-</sup> 15 jours après recombinaison à l'aide d'un marquage nucléaire par le Hoechst 33342. L'activation de la voie Shh sur une longue période (10 mois) conduit à une disparition des cellules prolifératives au sein des CSNs activées et précurseurs neuronaux tandis que quelques CSNs quiescentes continuent à proliférer.

A l'aide de vidéomicroscopie, nous avons évalué l'impact de l'activation de la voie Shh sur le cycle cellulaire des CSNs activées et des TACs afin de mettre en évidence le mécanisme à l'origine de l'augmentation de prolifération observée à court terme. L'administration de ligand Shh aux CSNs activées isolées par FACS et mises en culture, entraîne un raccourcissement de la durée de leur cycle cellulaire. A l'inverse, les TACs ne sont pas affectées. La même analyse effectuée sur ces populations cellulaires, issues de souris FUCCI, permet de préciser l'effet de Shh en démontrant un raccourcissement de toutes les phases du cycle cellulaire des CSNs activées. Il est à noter que le traitement des CSNs activées par Shh conduit également à une augmentation de la taille des neurosphères formées par ces cellules suggérant une prolifération plus importante. Aucun effet de Shh n'a été observé sur la formation de neurosphères par les TACS et neuroblastes immatures, autres cellules de la ZSV capables de produire des neurosphères. L'activation de la voie Shh induit ainsi une augmentation de

la prolifération seulement au sein des CSNs activées et explique la hausse observée 15 jours post-tamoxifène chez les souris YFP-Ptc<sup>-/-</sup>.

Enfin, nous avons démontré que l'activité des CSNs peut être modulée pharmacologiquement par un antagoniste de Smo, le MRT-83 (Roudaut et al., 2011). Ce composé entraîne une réduction du nombre et de la taille des neurosphères produites par les CSNs activées et une baisse de la prolifération des CSNs chez la souris Fucci ayant reçue cette molécule en icv. Ces effets sont en accord avec le phénotype des souris YFP-Ptc<sup>-/-</sup>.

L'ensemble de ces résultats identifie la voie Shh comme un élément clé dans la régulation de la quiescence et de l'activation des CSNs. Les effets de l'activation constitutive de la voie Shh dans les CSNs présentent deux phases distinctes. A court terme, la voie Shh entraîne une augmentation de la prolifération des CSNs quiescentes et activées associée à une augmentation de la réserve de CSNs. Cependant à long terme, le nombre de CSNs activées chute progressivement aboutissant à une perte des précurseurs neuronaux et un grave dysfonctionnement de la neurogénèse au sein de la ZSV.

## Hedgehog Controls Quiescence and Activation of Neural Stem Cells in the Adult Ventricular-Subventricular Zone

Mathieu Daynac,<sup>1</sup> Linda Tirou,<sup>1</sup> Hélène Faure,<sup>1</sup> Marc-Andr e Mouthon,<sup>2,3,4,5</sup> Laurent R. Gauthier,<sup>2,3,4,5</sup> Heidi Hahn,<sup>6</sup> François D. Boussin,<sup>2,3,4,5,7,\*</sup> and Martial Ruat<sup>1,7,\*</sup>

<sup>1</sup>CNRS, UMR-9197, Neuroscience Paris-Saclay Institute, 1 Avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette, France

<sup>2</sup>CEA DSV IRCM SCSR, Laboratoire de Radiopathologie, 92265 Fontenay-aux-Roses, France

<sup>3</sup>INSERM

<sup>4</sup>Université Paris Sud

<sup>5</sup>Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité

UMR 967, 92265 Fontenay-aux-Roses, France

<sup>6</sup>Tumor Genetics Group, Institute of Human Genetics, University Medical Center, 37073 Göttingen, Germany

<sup>7</sup>Co-senior author

\*Correspondence: boussin@cea.fr (F.D.B.), ruat@inaf.cnrs-gif.fr (M.R.)

<http://dx.doi.org/10.1016/j.stemcr.2016.08.016>

### SUMMARY

Identifying the mechanisms controlling quiescence and activation of neural stem cells (NSCs) is crucial for understanding brain repair. Here, we demonstrate that Hedgehog (Hh) signaling actively regulates different pools of quiescent and proliferative NSCs in the adult ventricular-subventricular zone (V-SVZ), one of the main brain neurogenic niches. Specific deletion of the Hh receptor Patched in NSCs during adulthood upregulated Hh signaling in quiescent NSCs, progressively leading to a large accumulation of these cells in the V-SVZ. The pool of non-neurogenic astrocytes was not modified, whereas the activated NSC pool increased after a short period, before progressively becoming exhausted. We also showed that Sonic Hedgehog regulates proliferation of activated NSCs *in vivo* and shortens both their G<sub>1</sub> and S-G<sub>2</sub>/M phases in culture. These data demonstrate that Hh orchestrates the balance between quiescent and activated NSCs, with important implications for understanding adult neurogenesis under normal homeostatic conditions or during injury.

### INTRODUCTION

Neural stem cells (NSCs) are found in the ventricular-subventricular zone (V-SVZ) of the lateral ventricles and in the subgranular zone (SGZ) of the hippocampus, the two main neurogenic niches in the adult mammalian brain (Fuentelba et al., 2012; Aimone et al., 2014). Adult NSCs in the V-SVZ mainly give rise to neurons that populate the olfactory bulbs (OBs) and oligodendrocytes in the corpus callosum. Pioneering work and more recent experiments have demonstrated that NSC divisions generate actively dividing transit amplifying cells (TACs) that form a pool of intermediate progenitors (Doetsch et al., 1999). These cells further differentiate into proliferating immature neuroblasts (Im. Nbs) that become migrating neuroblasts (Mig. Nbs), which integrate within the OBs to produce functional neurons critical for olfactory memory (Lepousez et al., 2013).

Quiescent and activated NSCs coexist in adult stem cell niches (Albizu et al., 2010). Quiescent NSCs (qNSCs) are slowly dividing cells that can survive antimitotic drugs or irradiation; they can regenerate the V-SVZ, giving rise to new neurons (Doetsch et al., 1999; Daynac et al., 2013). In contrast, activated NSCs (aNSCs) are actively dividing and can be eliminated by antimitotic drugs or irradiation (Pastrana et al., 2009; Daynac et al., 2013). Both qNSCs and aNSCs have astrocyte-like phenotypes and express glial

fibillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte-specific glutamate transporter, GLAST (Doetsch et al., 1999; Browd et al., 2006). However, the combination of markers allowing the isolation of the different prospective subpopulations of V-SVZ cells, including qNSCs, were identified only recently (Pastrana et al., 2009; Beckervordersandforth et al., 2010; Daynac et al., 2013; Codega et al., 2014; Mich et al., 2014). Furthermore, only limited knowledge exists on the gene-regulatory networks of quiescent and activated NSCs. Such information is of primary importance in understanding the mechanisms controlling V-SVZ maintenance and regeneration, and its role in diseases.

Among signaling pathways regulating the V-SVZ cell population, the Sonic Hedgehog (SHH) pathway (Briscoe and Therond, 2013; Ferent et al., 2014) was shown to increase cell proliferation and modulate the migration of neuroblasts exiting this niche (Machold et al., 2003; Ahn and Joyner, 2005; Angot et al., 2008). The inactivation of Smoothed (SMO) receptor in cell types expressing the neuroepithelial marker Nestin suggests that this SHH signal transducer is required for maintaining the NSC population (Balordi and Fishell, 2007a). Activation of this pathway, through the conditional ablation of the main SHH receptor Patched (PTC) in GLAST-expressing cells, leads to a dramatic decrease in neurogenesis and a shift from an asymmetric to a symmetric mode of division in NSCs (Ferent et al., 2014). Type B1 NSCs are the primary GLI-expressing





population (Ihrie et al., 2011; Petrova et al., 2013), and SHH pathway activation is region dependent and more prevalent in the ventral SVZ associated with the production of specific neuronal progeny (Ihrie et al., 2011). NSCs in the V-SVZ can be also mobilized upon GLI1 inhibition to repair demyelinated lesions (Samanta et al., 2015). However, it is not well understood how quiescence is controlled in adult brain neurogenic niches, and the potential role of SHH signaling in its regulation has not been explored.

Here, we combine *in vitro* and *in vivo* analysis of both pharmacological and genetic activation of the SHH signaling pathway to explore its potential roles in different steps of neurogenesis. We identified prospective qNSCs, aNSCs, and their progeny from the adult mouse V-SVZ niche using immunofluorescence and fluorescence-activated cell sorting (FACS) techniques (Daynac et al., 2013; Pineda et al., 2013; Daynac et al., 2014) to characterize and quantify the effects of SHH signaling on the different types of V-SVZ cells. We unveil for the first time the effects of SHH signaling causing an increase in qNSC number and a faster cell cycle in aNSCs. Cell-cycle analysis by video microscopy revealed a shortening of both G<sub>1</sub> and S-G<sub>2</sub>/M phases of aNSCs in culture. Interestingly, genetic activation of SHH signaling led to a large and progressive accumulation of qNSCs, while after an early increase in the pool of aNSCs the number of aNSCs was drastically reduced and neurogenesis was progressively exhausted. Thus, we report an unsuspected new role for SHH signaling in the regulation of quiescence in the V-SVZ in the adult brain.

## RESULTS

### Accumulation of qNSCs and Decreased Neurogenesis Following Long-Term Activation of SHH Signaling *In Vivo*

To gain insight into the role of SHH signaling *in vivo* specifically in the V-SVZ, we examined the status of the various cell populations after conditional PTC deletion in *Glast*-expressing cells, which resulted in the activation of the SHH pathway in this neurogenic niche (Feret et al., 2014). For this, we used *Glast-CreERT2;Ptc<sup>WT/WT</sup>;R26R-YFP* offspring (called *YFP-PTC<sup>+/+</sup>*) and *Glast-CreERT2;Ptc<sup>fl/fl</sup>;R26R-YFP* (called *YFP-PTC<sup>-/-</sup>*), in which YFP expression is initiated by tamoxifen-mediated activation of the Cre recombinase that permanently marks all the progeny of the recombined cells. We previously observed a progressive decrease in the neurogenic process and a marked accumulation of NSCs in these mice (Feret et al., 2014). However, it is still unknown whether the accumulated NSCs were in their quiescent or activated state.

The progeny of NSCs was traced by following YFP expression in mice treated with tamoxifen and analyzed 6 months

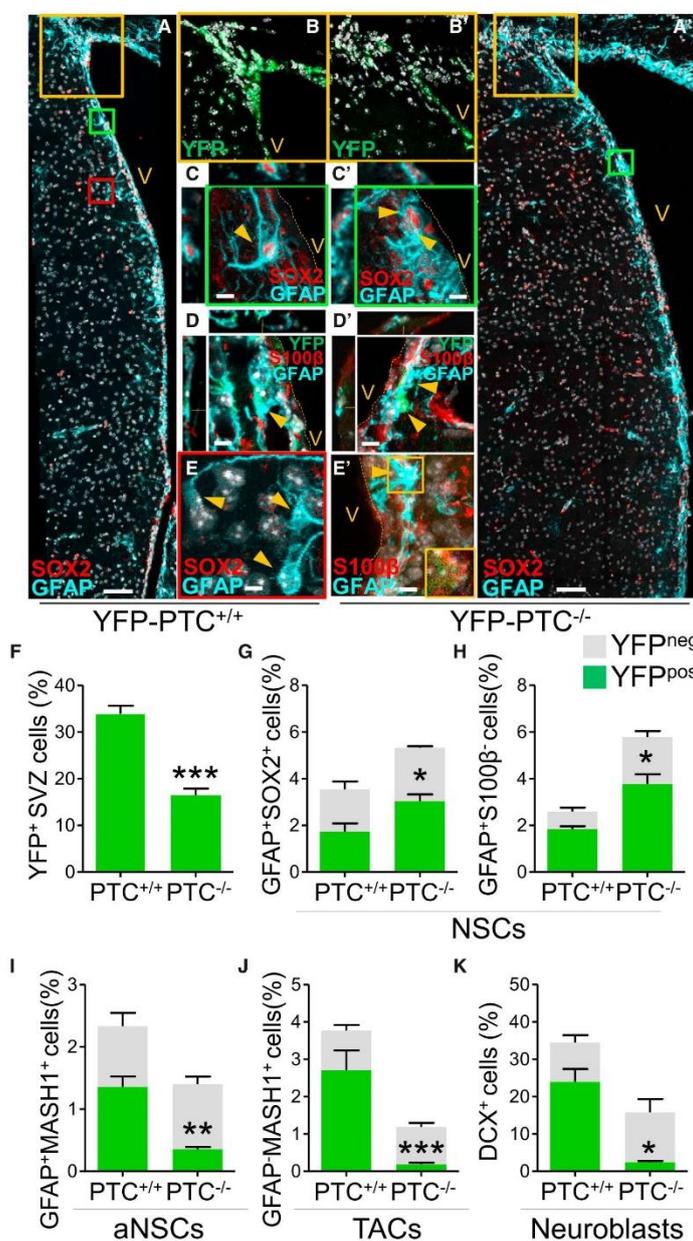
later. We observed that the YFP expression level was dramatically affected in coronal brain sections of *YFP-PTC<sup>-/-</sup>* animals. This was especially obvious in the dorsal part of the V-SVZ enriched in neuroblasts (Figures 1A, 1A', 1B, 1B', 1E, and S1A–S1D) that were associated with the decrease of YFP-positive cells in the granular and glomerular olfactory bulb layers of *YFP-PTC<sup>-/-</sup>* mice observed previously (Feret et al., 2014). Neuroblasts labeled as DCX<sup>+</sup> cells (Brown et al., 2003), and TACs labeled as GFAP<sup>+</sup>MASH1<sup>+</sup> cells (Pastrana et al., 2009) (Figures S1E and S1F), were dramatically decreased in the YFP-recombined cells (Figures 1I–1K). These changes were specific to YFP-recombined cells since non-recombined cells showed no differences (Figures 1I–1K, gray bars).

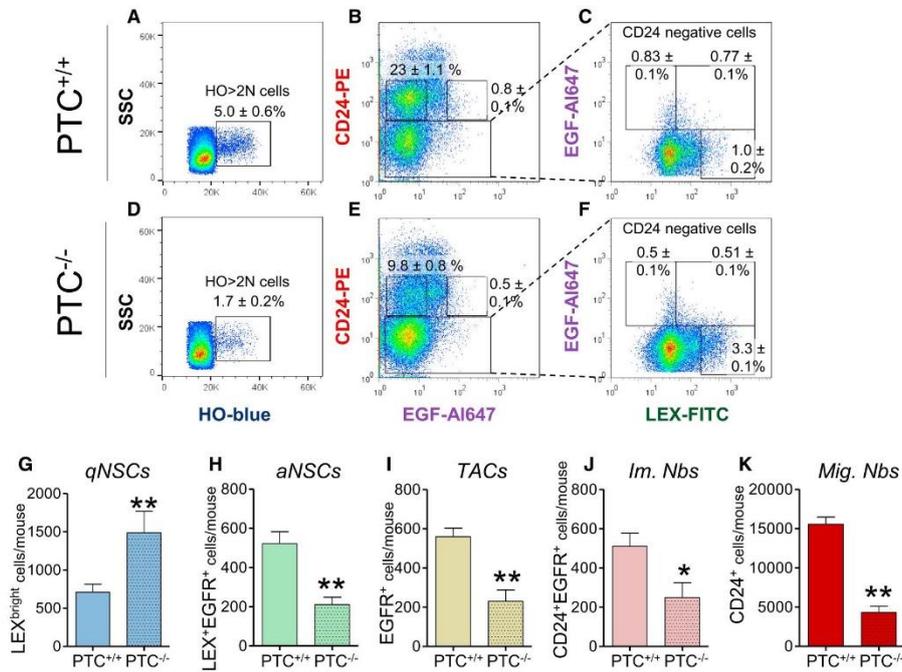
NSCs were detected using combinations of GFAP/SOX2 (Moreno-Estelles et al., 2012; Ottone et al., 2014) and GFAP/S100β (Petrova et al., 2013) immunolabeling in cells lining the lateral ventricles (Figures 1C–1E', S1J, S1K, S1O, and S1P). We found an increase of NSCs (GFAP<sup>+</sup>SOX2<sup>+</sup> and GFAP<sup>+</sup>S100β<sup>-</sup> cells) in the YFP<sup>+</sup> but not in the YFP<sup>-</sup> fraction (Figures 1G and 1H, green versus gray bars), indicating that this increase is specific to YFP-recombined cells. These results suggest an accumulation of the NSC population after long-term activation of SHH signaling. To evaluate whether this accumulation was related to qNSCs, aNSCs, or both, we used an accurate YFP/GFAP/MASH1 immunolabeling strategy as GFAP<sup>+</sup>MASH1<sup>+</sup> cells represent aNSCs (Pastrana et al., 2009). Interestingly, the population of recombined aNSCs (YFP<sup>+</sup>GFAP<sup>+</sup>MASH1<sup>+</sup>) decreased 6 months after tamoxifen-induced PTC deletion, suggesting that the accumulation of total NSCs is due to qNSCs only (Figures 1I, S1E, and S1F).

Thus, these data suggest that persistent activation of the SHH signaling pathway in NSCs induces their accumulation in a quiescent state over the long term and a dramatic loss of aNSCs and their progeny *in vivo*.

### SHH Pathway Is Upregulated in qNSCs at Long Term after PTC Deletion

To confirm the results obtained *in situ* 6 months after PTC deletion we used a rapid and an efficient FACS method, which purifies and identifies the cells present in the mouse V-SVZ using a combination of NSC (LEX) and progenitor cell (EGFR and CD24) markers (Figure 2) (Capela and Temple, 2002; Doetsch et al., 2002; Pastrana et al., 2009; Daynac et al., 2013, 2015). This method enables to distinguish qNSCs (LEX<sup>bright</sup>EGFR<sup>-</sup>CD24<sup>-</sup>, hereafter called LEX<sup>bright</sup>), from aNSCs (LEX<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup>, hereafter called LEX<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup>), TACs (LEX<sup>-</sup>EGFR<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup>, hereafter called EGFR<sup>+</sup>), Im. Nbs (LEX<sup>-</sup>EGFR<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>, hereafter called CD24<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup>), and Mig. Nbs (LEX<sup>-</sup>EGFR<sup>-</sup>CD24<sup>+</sup>, hereafter called CD24<sup>+</sup>) (Daynac et al., 2013). Since LEX-fluorescein isothiocyanate (FITC) antibody used to label NSCs has the





**Figure 2. Long-Term Activation of SHH Signaling Induces an Accumulation of qNSCs and a Decrease in Their Progeny**  
 Data are derived from *PTC*<sup>+/+</sup> (A–C, G–K) versus *PTC*<sup>-/-</sup> (D–K) mice 6 months after tamoxifen administration. (A, D) FACS plots representing V-SVZ proliferating cells (HO-blue is Hoechst 33342). (B, C, E, and F) Labeling of multiple cell populations from the V-SVZ along with the cell-sorting technique (see [Experimental Procedures](#)). (G–K) Quantification of the different V-SVZ populations sorted by FACS using TrueCount microbead-calibrated tubes in *PTC*<sup>+/+</sup> (black boxes) and *PTC*<sup>-/-</sup> (colored boxes) mice. Data represent mean ± SEM obtained from the independent analyses of cells isolated from ten mice (A–K) per phenotype, individually for each mouse. \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01. See also [Figures S2 and S3](#).

same emission wavelength as YFP, we used non-YFP mice: *Glast-CreERT2;Ptc*<sup>WT/WT</sup> (called *PTC*<sup>+/+</sup>) and *Glast-CreERT2;Ptc*<sup>fl/fl</sup> (called *PTC*<sup>-/-</sup>). In *PTC*<sup>-/-</sup> mice, 6 months after tamoxifen-induced PTC deletion, LEX<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup>, EGFR<sup>+</sup>, CD24<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup>, and CD24<sup>+</sup> populations were dramatically reduced by 59.5%, 58.9%, 51.2%, and 72.2%, respectively compared with *PTC*<sup>+/+</sup> mice ([Figures 2H–2K](#)). Similarly, we observed a marked decrease in proliferating cells evaluated by Hoechst 33342 DNA content analysis (HO>2N cells [[Daynac et al., 2013](#)]; [Figures 2A, 2A', 2D, and 2D'](#)). In contrast, the cell fraction containing qNSCs (LEX<sup>bright</sup>) significantly increased by more than 2-fold ([Figure 2G](#)), which demonstrated that long-term genetic activation of SHH signaling leads to an accumulation of qNSCs. Interestingly, 6 months after PTC deletion the SHH pathway was specifically upregulated in qNSCs. This was concluded from the observation that *Gli1* levels used as a readout of SHH pathway activation were upregulated in qNSCs ([Briscoe and Therond, 2013](#);

[Ruat et al., 2014](#)), but not in aNSCs, TACs, and Im. Nbs ([Figure S2](#)).

Thus, these data demonstrate that long-term genetic deletion of PTC in GLAST-expressing cells results in a specific activation of SHH pathway in qNSCs, resulting in their accumulation in vivo while aNSCs and their progeny are dramatically decreased.

#### Activation of SHH Signaling In Vivo Induces a Progressive Accumulation of qNSCs and Only a Transient Increase in aNSCs

To evaluate the short-term versus long-term effects of PTC deletion in vivo in YFP-*PTC*<sup>+/+</sup> versus YFP-*PTC*<sup>-/-</sup> mice, we used another FACS method that takes advantage of the GLAST NSC marker, along with EGFR and CD24 ([Figure 3A](#)) ([Mich et al., 2014](#)). Indeed, qNSCs were reported to have a GLAST<sup>bright</sup>EGFR<sup>-</sup>CD24<sup>-</sup> phenotype ([Mich et al., 2014](#)), and we found that GLAST<sup>bright</sup> correlates with LEX<sup>bright</sup>



NSC phenotype in CD24-negative cells (Figures S3A–S3C). Interestingly, short term after PTC deletion, we observed an accumulation of qNSCs ( $YFP^+GLAST^{bright}EGFR^-CD24^-$ ), aNSCs ( $YFP^+GLAST^+EGFR^+CD24^-$ ), and TACs ( $YFP^+GLAST^-EGFR^+CD24^-$ ), but not their progeny (Figures 3B–3G). The pool of qNSCs increased continuously over longer time periods (6 months and then 10 months; Figures 3B–3G), while their progeny, including aNSCs, was progressively exhausted (Figures 3K–3M and S4). Ten months after PTC deletion, the number of qNSCs increased almost by 8-fold, and was  $\approx$  15-fold larger than the aNSC population (Figures 3H–3J). Strikingly, qNSCs did not seem to differentiate into astrocytes, as no accumulation of mature astrocyte population ( $GLAST^{dim}$  expressing cells [Mich et al., 2014]) was observed (Figure S3D).

Thus, we prove that PTC deletion in  $GLAST$ -expressing cells triggers an initial accumulation of qNSCs, aNSCs, and their immediate progeny as a short-term effect. In contrast, the long-term effect involves accumulation of qNSCs over time while aNSCs and their progeny are progressively exhausted.

#### SHH Pathway Activation Induces qNSC and aNSC Proliferation

Next, we evaluated the effects of SHH pathway activation on the proliferation of qNSCs and their progeny. We first performed intraventricular injections of SHH in young adult transgenic fluorescence ubiquitination cell-cycle indicator (FUCCI)-green mice that allow tracking the S-G<sub>2</sub>/M phases with green fluorescence (Sakaue-Sawano et al., 2008) (Figure 4). The number of proliferating qNSCs and aNSCs increased within a short time period (3 days) after intraventricular SHH injections, although the increase in qNSCs was not statistically significant ( $p = 0.06$ ) (Figures 4C and 4D). No short-term effect of SHH pathway activation was seen on TACs and neuroblast proliferation (Figures 4E and 4F). We evaluated long-term effects on cell proliferation with Hoechst 33342 DNA content analysis (Daynac et al., 2013) in  $YFP-PTC^{+/+}$  and  $YFP-PTC^{-/-}$  mice, 15 days and 10 months after tamoxifen injection (Figure 5). The pools of proliferating qNSCs and aNSCs expanded 15 days after PTC deletion (Figures 5A and 5B), contrary to their progeny (Figures 5C–5E). Long-term activation of the SHH pathway (10 months after PTC deletion) resulted in a complete abrogation of proliferating aNSCs, TACs, Im. Nbs, and Mig. Nbs (Figures 5G–5J). In contrast, some qNSCs continued proliferating, though to a lesser extent (Figure 5F).

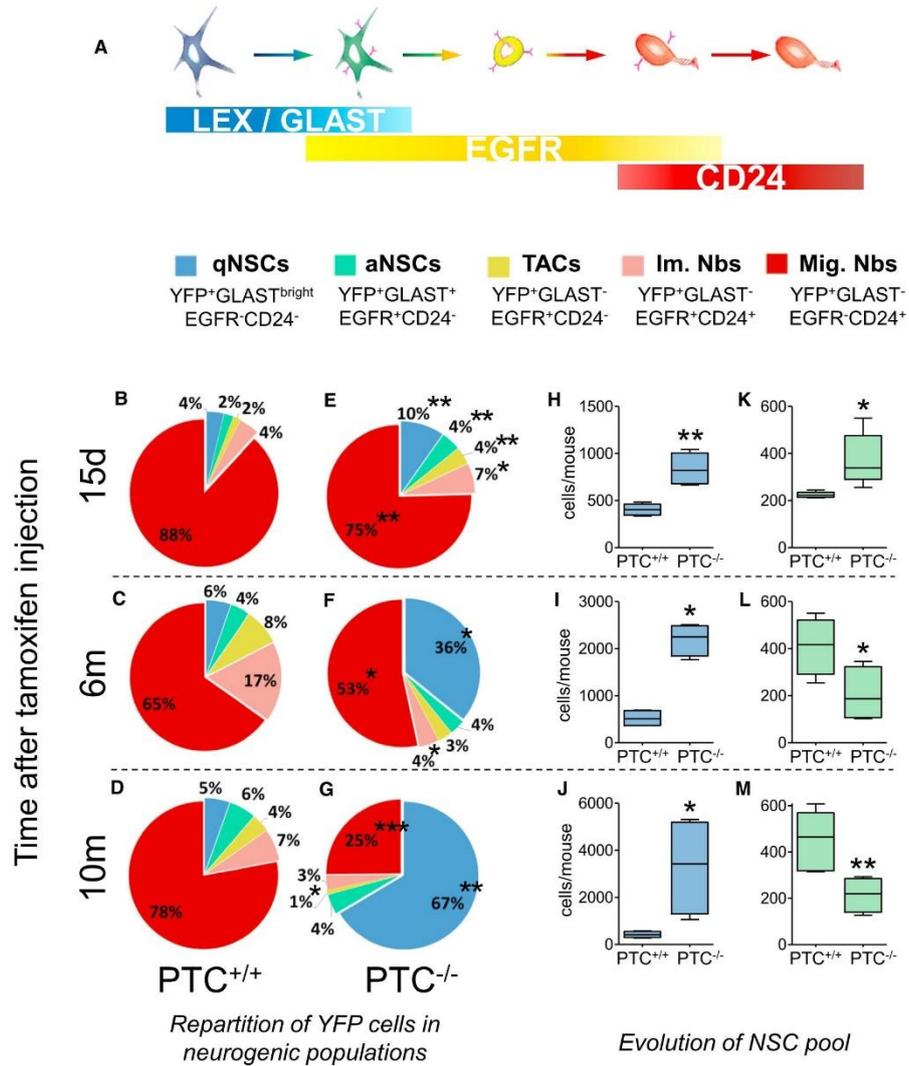
#### SHH Increases the Neurosphere-Forming Potential and Shortens the Cell Cycle of Adult aNSCs In Vitro

To understand the short-term effect of SHH specifically on the proliferation of aNSCs and not their progeny, we con-

ducted an in-depth study on the cell-cycle dynamics of aNSCs versus TACs and Im. Nbs in vitro. Following FACS with LEX/EGFR/CD24 marker combination in V-SVZ cells from the adult mouse, we previously showed that aNSCs, TACs, and Im. Nbs cells exhibit a capacity to generate neurospheres in vitro, contrary to qNSCs and Mig. Nbs (Daynac et al., 2013, 2015). Using this method, we observed that SHH (10 nM) treatment increased the potential of aNSCs to form colonies in vitro (number of primary neurospheres generated) by almost 2-fold, but did not increase the potential of TACs or Im. Nbs to form colonies (Figures 6A–6C).

Moreover, the amount of generated cells, evaluated as neurosphere size from the cell-sorted populations 5 days after plating (Daynac et al., 2014), significantly increased for aNSCs after SHH treatment, but not for TACs or Im. Nbs (Figures 6D–6F). These data suggest that SHH increased the number of cells generated by aNSCs, probably by acting on their cell cycle. We thus used time-lapse video microscopy to test whether activation of SHH signaling would have direct effects on cell-cycle progression of LEX<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup> and EGFR<sup>+</sup> cells isolated from young adult mice (2 months of age) (Costa et al., 2011; Daynac et al., 2014, 2015). As expected from the results above, the cell-cycle length of EGFR<sup>+</sup> cells was not altered by SHH (10 nM) treatment whereas that of LEX<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup> cells was significantly shortened, from  $12.2 \pm 1.9$  hr to  $8.9 \pm 2.1$  hr ( $p < 0.01$ ; Figure S5).

To confirm these results and explore the cell-cycle progression of aNSCs and TACs in detail, we sorted these cell populations from the V-SVZ of adult transgenic FUCCI mice (Sakaue-Sawano et al., 2008). Next, we measured the lengths of the G<sub>1</sub> phase (FUCCI-red fluorescence) and the S-G<sub>2</sub>/M phases (colorless), using time-lapse video microscopy, for cells that completed a full division and underwent at least another subsequent division to exclude any alteration due to cell-cycle exit (Daynac et al., 2014, 2015). As expected, the lengths of G<sub>1</sub> and S-G<sub>2</sub>/M phases were similar in non-treated and SHH-treated EGFR<sup>+</sup> cells (Figures 7A and 7C), leading to similar cell-cycle lengths (Figure 7D). In contrast, both G<sub>1</sub> and S-G<sub>2</sub>/M phases were shortened by almost 1 hr in LEX<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup> cells treated with SHH (1.1 hr and 0.8 hr, respectively; Figures 7A and 7B), leading to a shortening of the total cell cycle by 1.9 hr (Figure 7D) (Palma et al., 2005). Together, these results demonstrate that activation of the SHH pathway in vitro increases aNSC proliferation by shortening both G<sub>1</sub> and S-G<sub>2</sub>/M phases of their cell cycle. Finally, we investigated whether a pharmacological blockade of the Hh pathway could modify the cell-proliferation effect observed above (Figures S7A–S7K). Treatment with the Smo antagonist MRT-83 (1  $\mu$ M) (Roudaut et al., 2011; Hoch et al., 2015) reduced the number and size of neurospheres produced by aNSCs

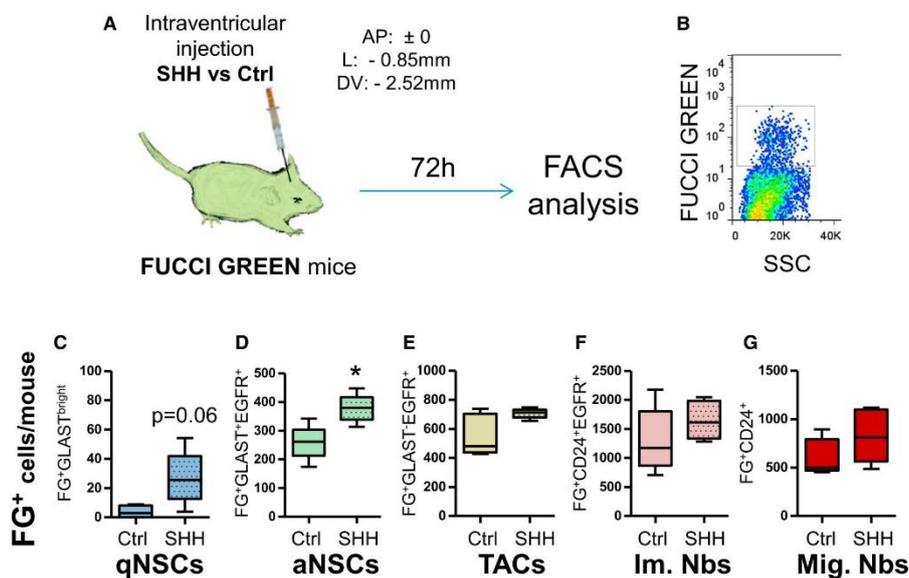


**Figure 3. A Pool of Quiescent NSCs Progressively Accumulates after SHH Pathway Activation In Vivo while Activated NSC Accumulation Is Transient**

(A) Scheme used for the prospective purification of adult mouse V-SVZ cells by GLAST/EGFR/CD24 flow cytometric-gating strategy (FACS) allowing the identification of quiescent NSCs (qNSCs; GLAST<sup>bright</sup>EGFR<sup>-</sup>CD24<sup>-</sup>), activated NSCs (aNSCs; GLAST<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup>), TACs (GLAST<sup>-</sup>EGFR<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup>), immature neuroblasts (Im. Nbs; GLAST<sup>-</sup>EGFR<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>), and migrating neuroblasts (Mig. Nbs; GLAST<sup>-</sup>EGFR<sup>-</sup>CD24<sup>+</sup>) (Daynac et al., 2013; Mich et al., 2014; Daynac et al., 2015).

(B–G) Repartition of YFP cells in neurogenic V-SVZ populations sorted by FACS from YFP-PTC<sup>+/+</sup> and YFP-PTC<sup>-/-</sup> mice 15 days (15 d), 6 months (6 m), and 10 months (10 m) after tamoxifen-induced PTC deletion. Statistical analyses for the charts (PTC<sup>+/+</sup> versus PTC<sup>-/-</sup>) are presented next to each population in (D–F).

(legend continued on next page)



**Figure 4. Intraventricular Injection of SHH Increases NSC Proliferation In Vivo at Short Term**

(A) FUCCI-green mice (Sakaue-Sawano et al., 2008) that allow tracking the S-G<sub>2</sub>/M phases with green fluorescence received intraventricular injections of SHH (3  $\mu$ g; AP:  $\pm 0$  mm, L: -0.85 mm, DV: -2.52 mm) versus Ctrl (vehicle) and FUCCI-green-positive (FG<sup>+</sup>) cells were analyzed by FACS 72 hr after injection, using a FUCCI-green/GLAST-PE/EGF-647/CD24-PEcy7 quadruple staining.

(B–G) SHH injection provoked an increase in FG<sup>+</sup> proliferating qNSCs ( $p = 0.06$ ) and aNSCs (D, E) while no difference was observed for their progeny (C–G).

Data represent mean  $\pm$  SEM obtained from the independent analyses of cells isolated from five Ctrl versus five SHH mice, individually for each mouse. \* $p < 0.05$ .

in vitro (Figures S7A and S7B), mirroring in vitro data with SHH (Figures 6A and 6D). The number of proliferating qNSCs and aNSCs from the V-SVZ populations was decreased on short-term (3 days) intraventricular MRT-83 injection in FUCCI-green mice, although not significantly for aNSCs (Figures S7G and S7H), probably due to the low basal expression of the pathway in aNSCs (Figure S2).

Together, these data show that activation of the SHH pathway in GLAST-expressing cells triggers an early phase marked by an increase in the proliferation of both qNSCs and aNSCs, leading to an early expansion of their pool. However, long-term activation of the SHH pathway in aNSCs led to progressive depletion of their pool and a collapse of neurogenesis (Figure S6). These findings show that the SHH pathway is essential for maintaining neuro-

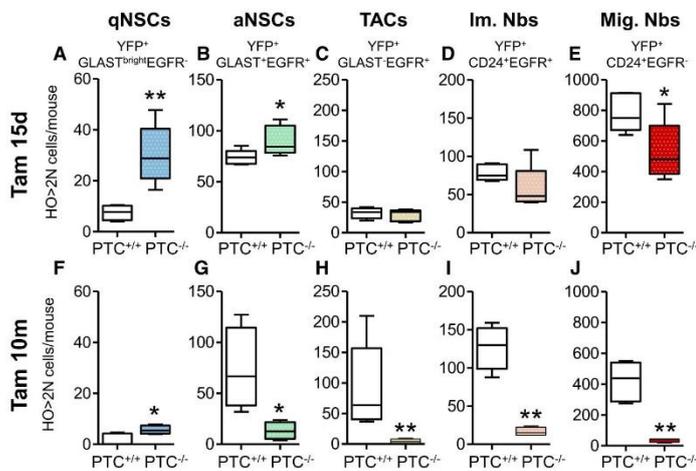
genesis during adulthood by controlling the activation of qNSCs.

## DISCUSSION

Self-renewal of NSCs contributes to maintaining neurogenesis in the adult brain throughout life. Neurogenesis is actively involved in odor discrimination and cognitive performance that decrease upon aging (Lepousez et al., 2013; Aimone et al., 2014). In the V-SVZ, NSCs also generate oligodendrocytes (Menn et al., 2006). However, the precise molecular mechanisms controlling NSC pool size are not yet well understood. Using newly developed methods that identify the main cell populations of the V-SVZ and

(H–M) Quantification of the absolute number of qNSCs (blue) and aNSCs (green) populations sorted by FACS using TrueCount microbead-calibrated tubes. Data represent means  $\pm$  SEM obtained from the independent analyses of cells isolated from five mice per phenotype for each time point, individually for each mouse.

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ . See also Figure S4.



**Figure 5. SHH Pathway Activation Stimulates qNSC and aNSC Proliferation at Short Term, but Depletes the Pool of Proliferating aNSCs at Long Term**

Quantification of the number of S-G<sub>2</sub>/M proliferating cells (HO>2N) in the different V-SVZ populations sorted by FACS using TrueCount microbead-calibrated tubes from *YFP-PTC<sup>+/+</sup>* (white boxes) and *YFP-PTC<sup>-/-</sup>* (colored boxes) mice 15 days (15 d; A–E) and 10 months (10 m; F–J) after tamoxifen (Tam)-induced PTC deletion. Cell proliferation status is analyzed by DNA content analysis using Hoechst 33342 (Daynac et al., 2013). Data represent means ± SEM obtained from the independent analyses of cells isolated from five mice per phenotype for each time point, individually for each mouse. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01.

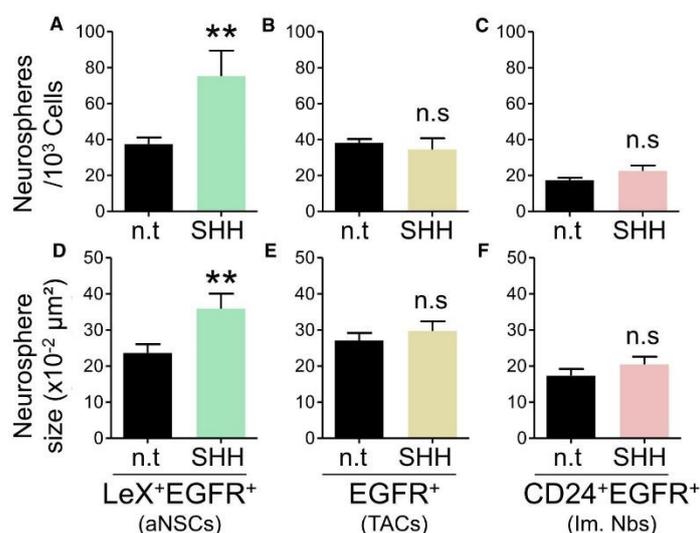
a genetic mouse model of SHH activation in NSCs, our study identifies a crucial role of the SHH pathway in the balance between qNSCs and aNSCs in the adult brain, and demonstrates that SHH actively regulates cell quiescence in the V-SVZ.

The recent ability to purify quiescent NSCs from the adult brain and the development of markers enabling their identification *in vivo* have opened novel avenues for investigating the mechanisms responsible for maintaining these cells in quiescence (Beckervordersandforth et al., 2010; Codega et al., 2014; Daynac et al., 2014; Mich et al., 2014). Here we used a combination of two sets of validated markers, LEX, EGFR, CD24 (Daynac et al., 2013) and GLAST, EGFR, CD24 (Mich et al., 2014), to prospectively isolate by FACS qNSCs, aNSCs, and their progeny. Following this we analyzed the effects of pharmacological and genetic activation of SHH signaling in these cell populations. We validated the data obtained from the FACS-sorted cells by analyzing the distribution and localization of these cells from *YFP-PTC<sup>+/+</sup>* and *YFP-PTC<sup>-/-</sup>* mice, using an accurate immunolabeling strategy (GFAP/MASH1/DCX). This enabled us to selectively identify qNSCs, aNSCs, TACs, and neuroblasts.

Actively dividing B1 cells (aNSCs in our study) were shown to go through three rounds of divisions before differentiating into C cells (referred as TACs in our study) (Ponti et al., 2013). However, the mechanisms regulating their behavior both *in vitro* and *in vivo* are still not known. Our study takes advantage of the unequivocal identification of aNSCs and TACs to show that cultured aNSCs and TACs have similar cell-cycle lengths ( $T_c \approx 13$  hr), confirming the previous *in vivo* study (Ponti et al., 2013). In addition,

we also showed that aNSCs but not TACs proliferate following SHH treatment by reducing their  $T_c$  by almost 2 hr. A striking observation is that the duration of both G<sub>1</sub> and S-G<sub>2</sub>/M phases of aNSCs are affected, suggesting that both phases are implicated in the proliferative effects. This specificity at the NSC level is likely due to the degree of SHH pathway activation within the different cell types linked to increased *Gli1* transcription, as we observed *in vivo*, and might also directly be related to GLI3 repressor activity that is critical for maintaining V-SVZ NSC function in the adult (Petrova et al., 2013). We hypothesized that within qNSCs, the level of SHH pathway activation is low to control the balance between quiescence and activation; whereas an increase in SHH signaling deregulates this balance and leads to an expansion of this pool, as we observed *in vivo*. Our findings corroborate those reported for Hh signaling in the developing vertebrate retina, supporting an increase of transient amplifying progenitor proliferation by speeding up their cell cycles and reducing both their G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub> phases (Locker et al., 2006).

We observed that genetic activation of SHH signaling induced a progressive increase in qNSC numbers and a marked reduction of the aNSC pool, leading to an almost complete exhaustion of neurogenesis in the long-term and early aging of V-SVZ niches compared with mice displaying basal SHH activation (Figure S5). Interestingly, we identified an initial transient period over the short term when aNSCs are actively proliferating, presumably by shortening both their G<sub>1</sub> and S-G<sub>2</sub>/M phases, as seen *in vitro*. *In vitro* results (Figures S7A and S7B) on isolated cells corroborates *in vivo* observations, suggesting that the positive effect of SHH pathway activation on aNSC



**Figure 6. SHH Treatment Increases the Neurosphere-Forming Potential of Activated NSCs**

LEX<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup> (A, D), EGFR<sup>+</sup> (B, E), and CD24<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup> (C, F) sorted cells from young adult mouse V-SVZ were plated and then treated with SHH (10 nM) or control buffer (n.t). The neurosphere-forming potential (B–D) was determined as the number of neurospheres formed 7 days after plating, and the amount of cells generated (E, F) was evaluated as the area of the formed neurospheres 5 days after plating. Data represent mean ± SEM obtained from analyses of cells isolated from four to five independent groups of at least five mice. \*\*p < 0.01; n.s, not significant.

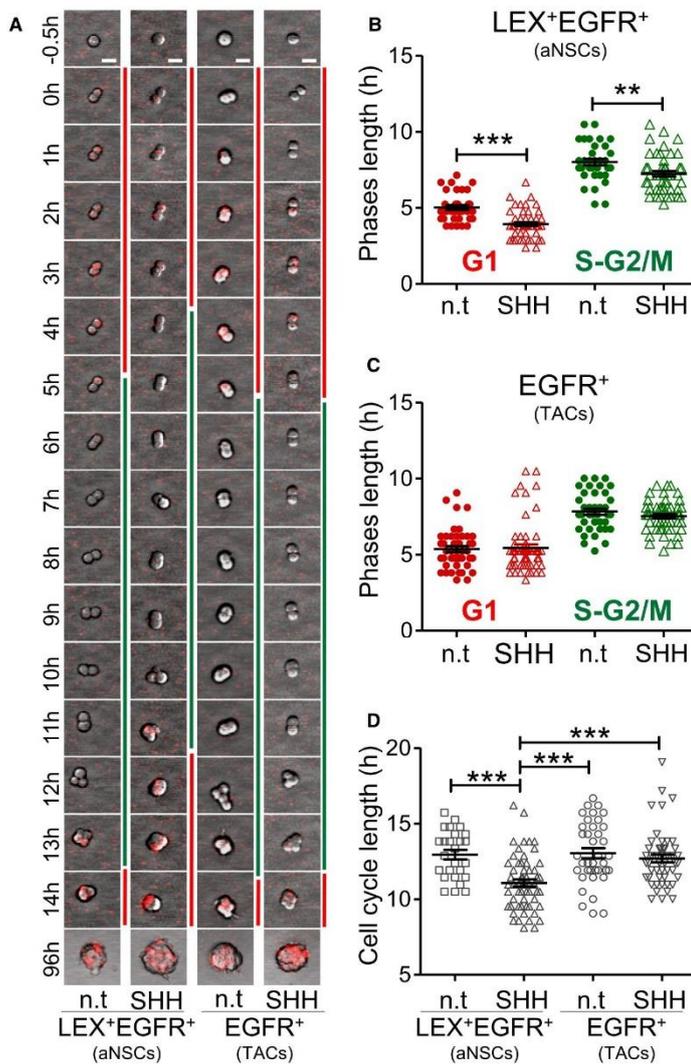
proliferation at short term occurs cell autonomously and is not triggered by microenvironmental changes. During this period, the number of TACs increases. This effect is not linked to a modification of their cell-cycle parameters, as shown in our study, but probably results from the differentiation of a high number of aNSCs that are produced. Migrating neuroblasts are also lowered. This could be explained by the abrogation of the chemoattractive activity that SHH exerts on V-SVZ-derived progenitors through PTC (Angot et al., 2008). Activation of the Hh pathway in NSCs through targeted injections of Ad:GFAPpCre virus in SmoM2-YFP;R26R mice was associated with an alteration of the type of progeny generated in the OB (Ihrie et al., 2011). There was no evidence of a collapse in neurogenesis but the study was not performed for a long period. The marked reduction of aNSCs over a longer term suggests that qNSC self-renewal is favored at the expense of aNSC production. NSCs appear to have a limited number of divisions (Balordi and Fishell, 2007b), which could explain that despite the expansion of aNSCs in the period shortly after SHH pathway activation, the low generation of new aNSCs in the long term leads to a significant decrease in their pool. A cell-autonomous defect in aNSCs associated with PTC deletion may also be responsible for this decrease. For example, aNSCs are also programmed to undergo a defined number of divisions prior to differentiation (Costa et al., 2011; Ponti et al., 2013), and the deletion of PTC in their membranes could alter the number of these divisions. Moreover, recent evidence suggests that aNSCs have limited self-renewal and are exhausted at long term (Calzo-

lari et al., 2015). The blockade of qNSCs in quiescence provoked by long-term PTC deletion seems to accelerate this phenomenon by reducing the availability of qNSCs needed to sustain neurogenesis over the long term.

Elevated SHH signaling in the dorsal V-SVZ regulates the production of oligodendrocyte progenitor cells in the corpus callosum while SHH signaling in the ventral V-SVZ controls the production of specific neuron subtypes destined for the OB (Tong et al., 2015). We previously observed that PTC deletion in NSCs decreases the ability of precursor cells to give rise to oligodendrocytes (Ferent et al., 2014). It would be interesting to evaluate the effect of long-term PTC deletion on the production of specific neurons in the OB (Tong et al., 2015).

PTC inactivation in multipotent stem cells of human GFAP-Cre;PTC<sup>CIC</sup> mice during embryogenesis leads to medulloblastomas that develop when the cells have committed to the neuronal lineage (Yang et al., 2008). Our data demonstrate that PTC inactivation in NSCs increases the pool of qNSCs over the long term without the development of tumors, which demonstrates that the tumor-suppressor gene function of PTC (Goodrich et al., 1997) depends on the NSC context.

In sum, we uncovered that activation of the SHH pathway increases the pool of qNSCs over a long time period, thus demonstrating that active SHH signaling maintains V-SVZ cell quiescence. This is reminiscent of the recent role attributed to active Hh signaling engaged in an epithelial-mesenchymal regulatory loop to maintain quiescence under normal homeostasis in the adult lung



**Figure 7. SHH Shortens the Cell Cycle of Activated NSCs**

(A) Video microscopy with LEX<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup> (aNSCs) and EGFR<sup>+</sup> (TACs) V-SVZ cells sorted by FACS from FUCCI-red mice (Sakaue-Sawano et al., 2008) allows tracking the G<sub>1</sub> phase with red fluorescence, whereas the S-G<sub>2</sub>/M phases are deduced when the red fluorescence switches off. Scale bars, 10 μm.

(B) The LEX<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup> cells had shorter G<sub>1</sub> and S-G<sub>2</sub>/M phases once treated with SHH (10 nM) compared with control treated conditions (n.t.).

(C) SHH treatment did not alter the G<sub>1</sub> and S-G<sub>2</sub>/M phases in EGFR<sup>+</sup> cells.

(D) The LEX<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup> cells had a shorter total cell-cycle length following SHH treatment, contrary to EGFR<sup>+</sup> cells. Data represent mean ± SEM obtained from cells isolated from two independent experiments with five mice.

\*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001. See also Figures S5 and S6.

(Peng et al., 2015). Sustained SHH signaling in NSCs presumably occurs during physiological or pathological conditions, for instance, pharmacological activation of Smo using specific small-molecule modulators (Ruat et al., 2014), when SHH protein is induced (Feret et al., 2013), or as a result of inactivating PTC or activating Smo mutations. Thus, it will be important to further identify the status of qNSCs and aNSCs in such conditions, as well as determine their effects on neurogenesis, tumor formation, and brain

repair. Of note, this accumulated pool of qNSCs has trouble replenishing the SVZ after antimitotic treatment (Feret et al., 2014). Thus, it should be of great interest to address whether the increased pool of qNSCs observed upon SHH activation can be further manipulated in the older animal to restore impaired neurogenesis (Daynac et al., 2013) as observed with anti-transforming growth factor β treatment (Pineda et al., 2013; Daynac et al., 2014). Importantly, SHH signaling also regulates NSC mobilization toward



demyelinated lesions, and inhibition of GLI1 was shown to mobilize NSCs for remyelination (Samanta et al., 2015). Although the phenotype in qNSCs and aNSCs was not reported in this study, it indicates that multiple levels of SHH-GLI signaling regulate more than just proliferation and highlights the importance of determining the state of NSCs and their progeny. Altogether, our data highlight the complex role of the SHH pathway in NSC regulation and its importance for adult neurogenesis, and the need for further understanding of the mechanisms associated with brain tumor formation and brain repair.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### Animals

*Glast-CreERT2;Ptc<sup>WT/WT</sup>;R26R-YFP* (called *YFP-PTC<sup>+/+</sup>*), *Glast-CreERT2;Ptc<sup>dlfl</sup>;R26R-YFP* (called *YFP-PTC<sup>-/-</sup>*), *Glast-CreERT2;Ptc<sup>WT/WT</sup>* (called *PTC<sup>+/+</sup>*), and *Glast-CreERT2;Ptc<sup>dlfl</sup>* (called *PTC<sup>-/-</sup>*) offspring were obtained as described by Ferent et al. (2014). For cell-cycle analysis, transgenic FUCCI chromatin labeling and DNA replication factor 1 (Cdt1)-red and (Geminin)-green mice were used (Sakaue-Sawano et al., 2008). Young adult (2–3 months old) C57Bl/6 mice were used for neurosphere and LEX versus GLAST FACS studies. Animal experiments were performed in compliance with the European Communities Council Directive (86/609/EEC) and were approved by our institution's ethics committee (11-003).

### Tamoxifen Administration, SHH Protein, and MRT-83 Injections

Tamoxifen (Sigma-Aldrich) was dissolved in corn oil (Sigma-Aldrich) at 10 mg/mL, and 1 mg was injected intraperitoneally twice a day for 5 consecutive days. Animals were killed 15 days, 6 months, or 10 months after the end of tamoxifen application. Male young adult FUCCI Green mice (five animals per group) were stereotactically injected into the right lateral ventricle of human SHHN (Biogen Idec) (5  $\mu$ L/3  $\mu$ g) or with the Smo antagonist MRT-83, which blocks Hh signaling in vitro and in vivo (2.5  $\mu$ L/200 ng), or the vehicle solutions as described previously (Loulier et al., 2006; Roudaut et al., 2011). MRT-83 was dissolved in 45% 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin (Sigma) as described by Roudaut et al. (2011). A batch of SHHN was tested in a well-characterized assay of SHH function, the osteoblastic differentiation of C3H10T1/2 (Ruat et al., 2014). A subnanomolar concentration with SHHN (0.3 nM) led to a substantial increase in the response as previously reported (Loulier et al., 2006).

### Preparation of V-SVZ Cells and FACS

Lateral ventricle walls containing cells from the V-SVZ were microdissected and dissociated into single-cell suspensions as described by Daynac et al. (2013, 2015). For DNA content analysis, dissociated cells were incubated with Hoechst 33342 (Sigma), as described by Daynac et al. (2013). For mouse cell-surface marker analysis, we used GLAST phycoerythrin (PE) (mouse immunoglobulin G 2a [IgG2a]; 1:30, Miltenyi Biotec), CD24 PE/Cy7-conjugated (rat

IgG2b; 1:100, Biolegend), CD15/LEX fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated (mouse IgM; 1:50, BD Biosciences), and Alexa 647-conjugated EGF ligand (1:200, Life Technologies). Cell proliferation status was analyzed by DNA content analysis using Hoechst 33342 (Daynac et al., 2013). The cells were transferred into tubes containing a calibrated number of fluorescent beads (Trucount tubes, BD Biosciences), analyzed on an LSRII (BD Biosciences) and sorted on an INFLUX (BD Biosciences), as reported by Daynac et al. (2013, 2015). Sorting gates were drawn according to FMO (fluorescence minus one) controls. The data were analyzed using FlowJo software (Tree Star).

### Immunofluorescence

Mice, under anesthesia, were perfused with 4% paraformaldehyde, and brain sections were cut on the cryostat (14  $\mu$ m) and processed for immunostaining, as reported by Daynac et al. (2013). The primary antibodies used were: mouse anti-GFAP (1:400, Mab3402, Millipore), rabbit polyclonal anti-GFAP (1:400, Sigma), goat anti-DCX (1:200, clone C-18 sc-8066, Santa Cruz Biotechnology), mouse anti-MASH1 (1:100, mAb556604, Becton Dickinson), mouse anti-SOX2 (1:100, mAb6F1.2, Millipore), and rabbit anti-S100B (1:200, mAbZ0311, Dako). Next, slices were incubated with the appropriate secondary antibody (Alexa Fluor series at 1:400, Invitrogen) for 2 hr at room temperature. Staining was replicated on at least three slices from three different parts of the SVZ in three different mice. z Stacks (from 5 to 20  $\mu$ m thick) containing 5–30 z sections were acquired on a laser-scanning confocal microscope (confocal Leica TCS SP8) with a 40 $\times$  oil objective (numerical aperture 0.75). Images were analyzed using LAS LF (Bitplane) and reconstructed in ImageJ 1.39t (NIH) and Photoshop CS3 (Adobe).

### Cultures of Sorted V-SVZ Cells

For neurosphere cultures, sorted cells were plated on poly-D-lysine-coated plates (Sigma) at a density of 1–3  $\times$  10<sup>3</sup> cells/well in 96-well tissue culture plates (TRP). The culture medium was composed of NeuroCult medium complemented with the proliferation supplement (STEMCELL Technologies), 2  $\mu$ g/mL heparin, 20 ng/mL EGF, and 10 ng/mL fibroblast growth factor 2. Seven days after plating, the neurospheres were counted and their area measured with ImageJ software. The cultures were incubated at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. In vitro treatments with SHH (SHH C24II; R&D 1845-Sh) were done at 10 nM and with MRT-83 at 1  $\mu$ M.

### Live Cell Imaging

Freshly sorted cells were plated at a density of 1–3  $\times$  10<sup>3</sup> cells/well in poly-D-lysine-coated 96-well  $\mu$ -Plate culture plates (Ibidi). Live imaging culture conditions and settings were used as previously described (Daynac et al., 2014, 2015). Images and time-lapse video were analyzed with ImageJ and NIS-Elements AR.13.00 64-bit software.

### RT-PCR

Recombination efficiency was quantified by real-time PCR using specific primers for *wt PTC*, *PTC<sup>lox</sup>*, and *PTC<sup>del</sup>* alleles (Zibat et al., 2009). *Gli1*, *Gli2*, and *Gli3* primers were designed based on



Saqui-Salces et al. (2012): *mGli1* forward 5'-TTGGGATGAAGAAG CAGTTG-3', reverse 5'-GGAGACAGCATGGCTCACTA-3'; *mGli2* forward 5'-ACCCAACACTCAGCAGCAGTAGC-3', reverse 5'-GCTCCGC TTATGAATGGTGATGG-3'; *mGli3* forward 5'-CAGCTCCACGACCA CTGAA-3', reverse 5'-CAGCTCCACGACCACTGAA-3'. Despite a variation in YFP recombination among GLAST<sup>+</sup> cells dependent on mouse age, no variation was evidenced between *YFP-PTC*<sup>+/+</sup> and *YFP-PTC*<sup>-/-</sup> offspring for a given time point (data not shown). The deletion efficiency in *YFP-PTC*<sup>-/-</sup> mice was evaluated to 97.4% in *YFP*<sup>+</sup>GLAST<sup>+</sup> and 92.4% in *YFP*<sup>+</sup>GLAST<sup>-</sup> populations, respectively (data not shown).

#### Cell Counting and Statistical Analyses

Non-parametric tests were conducted using StatView5 software (SAS Institute); the Kruskal-Wallis test associated with Dunn's multiple comparison test was used for multiple comparisons, and the Mann-Whitney test was used for two comparisons. The statistical significance was set at  $p < 0.05$ . The data are expressed as mean  $\pm$  SEM.

#### SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes seven figures and can be found with this article online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.stemcr.2016.08.016>.

#### AUTHOR CONTRIBUTIONS

M.D.: conception and design, collection and assembly of data, data analysis and interpretation, and manuscript writing; L.T.: collection and assembly of data; H.F.: collection of data, data analysis and interpretation; M.M.: collection and assembly of data; L.R.G.: collection and assembly of data; H.H.: characterization of *YFP-PTC*<sup>+/+</sup> and *YFP-PTC*<sup>-/-</sup> mice; F.D.B.: conception and design, data analysis, interpretation, and manuscript writing; M.R.: conception, design, data analysis, interpretation, and manuscript writing.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Prof. M. Götz (Helmholtz Zentrum, Munich) for *Glast-CreERT2* and S. Picaud (NeuroPSI, Gif/Yvette) for the mice used for initial breeding, Prof. T. Jessel (Columbia University) for R26R-YFP/+ mouse lines, and E. Desale and T. Durand (TAAM, CNRS UPS44, Orléans) for expert technical assistance. We are indebted to C. Joubert, V. Neuville, J. Tilliet, and the staff of the animal facilities, I. Baijer and N. Dechamps for cell sorting, and T. Kortulewski for imaging. L.T. is the recipient of a doctoral fellowship from the Ministère de la Recherche. This work was supported by grants from La Ligue contre le Cancer (Comité de l'Essonne), Fondation Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC) and CNRS to M.R., and Électricité de France (EDF) to F.B.

Received: May 19, 2016

Revised: August 23, 2016

Accepted: August 23, 2016

Published: September 22, 2016

#### REFERENCES

- Ahn, S., and Joyner, A.L. (2005). In vivo analysis of quiescent adult neural stem cells responding to Sonic hedgehog. *Nature* 437, 894–897.
- Aimone, J.B., Li, Y., Lee, S.W., Clemenson, G.D., Deng, W., and Gage, F.H. (2014). Regulation and function of adult neurogenesis: from genes to cognition. *Physiol. Rev.* 94, 991–1026.
- Albizu, L., Cottet, M., Kralikova, M., Stoev, S., Seyer, R., Brabet, I., Roux, T., Bazin, H., Bourrier, E., Lamarque, L., et al. (2010). Time-resolved FRET between GPCR ligands reveals oligomers in native tissues. *Nat. Chem. Biol.* 6, 587–594.
- Angot, E., Loulier, K., Nguyen-Ba-Charvet, K.T., Gadeau, A.P., Ruat, M., and Traiffort, 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, 2311–2320.
- Balordi, F., and Fishell, G. (2007a). Hedgehog signaling in the subventricular zone is required for both the maintenance of stem cells and the migration of newborn neurons. *J. Neurosci.* 27, 5936–5947.
- Balordi, F., and Fishell, G. (2007b). 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, 14248–14259.
- Beckervordersandforth, R., Tripathi, P., Ninkovic, J., Bayam, E., Lepier, A., Stempfhuber, B., Kirchhoff, F., Hirrlinger, J., Haslinger, A., Lie, D.C., et al. (2010). In vivo fate mapping and expression analysis reveals molecular hallmarks of prospectively isolated adult neural stem cells. *Cell Stem Cell* 7, 744–758.
- Briscoe, J., and Therond, P.P. (2013). The mechanisms of Hedgehog signalling and its roles in development and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14, 416–429.
- Browd, S.R., Kenney, A.M., Gottfried, O.N., Yoon, J.W., Walterhouse, D., Pedone, C.A., and Fults, D.W. (2006). N-myc can substitute for insulin-like growth factor signaling in a mouse model of sonic hedgehog-induced medulloblastoma. *Cancer Res.* 66, 2666–2672.
- Brown, J.P., Couillard-Despres, S., Cooper-Kuhn, C.M., Winkler, J., Aigner, L., and Kuhn, H.G. (2003). Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis. *J. Comp. Neurol.* 467, 1–10.
- Calzolari, F., Michel, J., Baumgart, E.V., Theis, F., Gotz, M., and Ninkovic, J. (2015). Fast clonal expansion and limited neural stem cell self-renewal in the adult subependymal zone. *Nat. Neurosci.* 18, 490–492.
- Capela, A., and Temple, S. (2002). LEX/ssea-1 is expressed by adult mouse CNS stem cells, identifying them as nonependymal. *Neuron* 35, 865–875.
- Codega, P., Silva-Vargas, V., Paul, A., Maldonado-Soto, A.R., Deleo, A.M., Pastrana, E., and Doetsch, F. (2014). Prospective identification and purification of quiescent adult neural stem cells from their in vivo niche. *Neuron* 82, 545–559.
- Costa, M.R., Ortega, F., Brill, M.S., Beckervordersandforth, R., Petrone, C., Schroeder, T., Gotz, M., and Berninger, B. (2011).



- Continuous live imaging of adult neural stem cell division and lineage progression in vitro. *Development* 138, 1057–1068.
- Daynac, M., Chicheportiche, A., Pineda, J.R., Gauthier, L.R., Bousin, F.D., and Mouthon, M.A. (2013). Quiescent neural stem cells exit dormancy upon alteration of GABAAR signaling following radiation damage. *Stem Cell Res.* 11, 516–528.
- Daynac, M., Caille, I., Lim, D.A., Garcia-Verdugo, J.M., Morizur, L., Bousin, F.D., and Mouthon, M.A. (2014). TGFbeta lengthens the G1 phase of stem cells in aged mouse brain. *Stem Cells* 32, 3257–3265.
- Daynac, M., Morizur, L., Kortulewski, T., Gauthier, L.R., Ruat, M., Mouthon, M.A., and Bousin, F.D. (2015). Cell sorting of neural stem and progenitor cells from the adult mouse subventricular zone and live-imaging of their cell cycle dynamics. *J. Vis. Exp.* <http://dx.doi.org/10.3791/53247>
- Doetsch, F., Caille, I., Lim, D.A., Garcia-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (1999). Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 97, 703–716.
- Doetsch, F., Petreanu, L., Caille, I., Garcia-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (2002). EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells. *Neuron* 36, 1021–1034.
- 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, 1759–1772.
- Ferent, J., Cochard, L., Faure, H., Taddei, M., Hahn, H., Ruat, M., and Traiffort, E. (2014). Genetic activation of Hedgehog signaling unbalances the rate of neural stem cell renewal by increasing symmetric divisions. *Stem Cell Rep.* 3, 312–323.
- Fuentealba, L.C., Obernier, K., and Alvarez-Buylla, A. (2012). Adult neural stem cells bridge their niche. *Cell Stem Cell* 10, 698–708.
- Goodrich, L.V., Milenkovic, L., Higgins, K.M., and Scott, M.P. (1997). Altered neural cell fates and medulloblastoma in mouse patched mutants. *Science* 277, 1109–1113.
- Hoch, L., Faure, H., Roudaut, H., Schoenfelder, A., Mann, A., Girard, N., Bihannic, L., Ayrault, O., Petricci, E., Taddei, M., et al. (2015). MRT-92 inhibits Hedgehog signaling by blocking overlapping binding sites in the transmembrane domain of the Smoothened receptor. *FASEB J.* 29, 1817–1829.
- Ihrig, R.A., Shah, J.K., Harwell, C.C., Levine, J.H., Guinto, C.D., Lezameta, M., Kriegstein, A.R., and Alvarez-Buylla, A. (2011). Persistent sonic hedgehog signaling in adult brain determines neural stem cell positional identity. *Neuron* 71, 250–262.
- Lepousez, G., Valley, M.T., and Lledo, P.M. (2013). The impact of adult neurogenesis on olfactory bulb circuits and computations. *Annu. Rev. Physiol.* 75, 339–363.
- Locker, M., Agathocleous, M., Amato, M.A., Parain, K., Harris, W.A., and Perron, M. (2006). Hedgehog signaling and the retina: insights into the mechanisms controlling the proliferative properties of neural precursors. *Genes Dev.* 20, 3036–3048.
- Loulier, K., Ruat, M., and Traiffort, E. (2006). Increase of proliferating oligodendroglial progenitors in the adult mouse brain upon Sonic hedgehog delivery in the lateral ventricle. *J. Neurochem.* 98, 530–542.
- Machold, R., Hayashi, S., Rutlin, M., Muzumdar, M.D., Nery, S., Corbin, J.G., Gritti-Linde, A., Dellovade, T., Porter, J.A., Rubin, L.L., et al. (2003). Sonic hedgehog is required for progenitor cell maintenance in telencephalic stem cell niches. *Neuron* 39, 937–950.
- Menn, B., Garcia-Verdugo, J.M., Yashine, C., Gonzalez-Perez, O., Rowitch, D., and Alvarez-Buylla, A. (2006). Origin of oligodendrocytes in the subventricular zone of the adult brain. *J. Neurosci.* 26, 7907–7918.
- Mich, J.K., Signer, R.A., Nakada, D., Pineda, A., Burgess, R.J., Vue, T.Y., Johnson, J.E., and Morrison, S.J. (2014). Prospective identification of functionally distinct stem cells and neurosphere-initiating cells in adult mouse forebrain. *Elife* 3, e02669.
- Moreno-Estelles, M., Gonzalez-Gomez, P., Hortiguera, R., Diaz-Moreno, M., San Emeterio, J., Carvalho, A.L., Farinas, I., and Mira, H. (2012). Symmetric expansion of neural stem cells from the adult olfactory bulb is driven by astrocytes via WNT7A. *Stem Cells* 30, 2796–2809.
- Ottone, C., Krusche, B., Whitby, A., Clements, M., Quadrato, G., Pitulescu, M.E., Adams, R.H., and Parrinello, S. (2014). Direct cell-cell contact with the vascular niche maintains quiescent neural stem cells. *Nat. Cell Biol.* 16, 1045–1056.
- Palma, V., Lim, D.A., Dahmane, N., Sanchez, P., Brionne, T.C., Herzberg, C.D., Gitton, Y., Carleton, A., Alvarez-Buylla, A., and Ruiz i Altaba, A. (2005). Sonic hedgehog controls stem cell behavior in the postnatal and adult brain. *Development* 132, 335–344.
- Pastrana, E., Cheng, L.C., and Doetsch, F. (2009). Simultaneous prospective purification of adult subventricular zone neural stem cells and their progeny. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 6387–6392.
- Peng, T., Frank, D.B., Kadzik, R.S., Morley, M.P., Rathi, K.S., Wang, T., Zhou, S., Cheng, L., Lu, M.M., and Morrissey, E.E. (2015). Hedgehog actively maintains adult lung quiescence and regulates repair and regeneration. *Nature* 526, 578–582.
- Petrova, R., Garcia, A.D., and Joyner, A.L. (2013). Titration of GLI3 repressor activity by sonic hedgehog signaling is critical for maintaining multiple adult neural stem cell and astrocyte functions. *J. Neurosci.* 33, 17490–17505.
- Pineda, J.R., Daynac, M., Chicheportiche, A., Cebrian-Silla, A., Sii Felice, K., Garcia-Verdugo, J.M., Bousin, F.D., and Mouthon, M.A. (2013). Vascular-derived TGF-beta increases in the stem cell niche and perturbs neurogenesis during aging and following irradiation in the adult mouse brain. *EMBO Mol. Med.* 5, 548–562.
- Ponti, G., Obernier, K., Guinto, C., Jose, L., Bonfanti, L., and Alvarez-Buylla, A. (2013). Cell cycle and lineage progression of neural progenitors in the ventricular-subventricular zones of adult mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110, E1045–E1054.
- Roudaut, H., Traiffort, E., Gorojankina, T., Vincent, L., Faure, H., Schoenfelder, A., Mann, A., Manetti, F., Solinas, A., Taddei, M., and Ruat, M. (2011). Identification and mechanism of action of the acylguanidine MRT-83, a novel potent smoothed antagonist. *Mol. Pharmacol.* 79, 453–460.
- Ruat, M., Hoch, L., Faure, H., and Rognan, D. (2014). Targeting of Smoothened for therapeutic gain. *Trends Pharmacol. Sci.* 35, 237–246.



- Sakaue-Sawano, A., Kurokawa, H., Morimura, T., Hanyu, A., Hama, H., Osawa, H., Kashiwagi, S., Fukami, K., Miyata, T., Miyoshi, H., et al. (2008). Visualizing spatiotemporal dynamics of multicellular cell-cycle progression. *Cell* *132*, 487–498.
- 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*, 448–452.
- Saqui-Salces, M., Coves-Datson, E., Veniaminova, N.A., Waghray, M., Syu, L.J., Dlugosz, A.A., and Merchant, J.L. (2012). Inflammation and Gli2 suppress gastrin gene expression in a murine model of antral hyperplasia. *PLoS One* *7*, e48039.
- 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 Rep.* *5*, 461–470.
- Yang, Z.J., Ellis, T., Markant, S.L., Read, T.A., Kessler, J.D., Bourbonnas, M., Schuller, U., Machold, R., Fishell, G., Rowitch, D.H., et al. (2008). Medulloblastoma can be initiated by deletion of Patched in lineage-restricted progenitors or stem cells. *Cancer Cell* *14*, 135–145.
- Zibat, A., Uhmman, A., Nitzki, E., Wijgerde, M., Frommhold, A., Heller, T., Armstrong, V., Wojnowski, L., Quintanilla-Martinez, L., Reifenberger, J., et al. (2009). Time-point and dosage of gene inactivation determine the tumor spectrum in conditional PTCH knockouts. *Carcinogenesis* *30*, 918–926.

**Stem Cell Reports, Volume 7**

**Supplemental Information**

**Hedgehog Controls Quiescence and Activation of Neural Stem Cells in  
the Adult Ventricular-Subventricular Zone**

**Mathieu Daynac, Linda Tirou, Hélène Faure, Marc-André Mouthon, Laurent R.  
Gauthier, Heidi Hahn, François D. Boussin, and Martial Ruat**

## Supplemental Figures legends

**Figure S1. Fate analysis of NSCs and their progeny in the adult V-SVZ after a long period following PTC deletion, Related to Figure 1.** All results shown correspond to *YFP-PTC<sup>+/+</sup>* (A, C, E, G-K) vs. *YFP-PTC<sup>-/-</sup>* (B, D, F, L-P) mice 6 months after tamoxifen administration. (A-D) Tracing of YFP<sup>+</sup> in V-SVZ of mice coronal brain sections. (C and D are magnifications of the yellow squares in panels A and B, respectively). (E, F) Examples of immunostaining, which allows the distinction between aNSCs (MASH1<sup>+</sup>GFAP<sup>+</sup>) and TACs (MASH1<sup>+</sup>GFAP<sup>-</sup>). (G-P) Examples of immunostaining, which allows the distinction between NSCs (GFAP<sup>+</sup>S100β<sup>-</sup>) and mature astrocytes (GFAP<sup>+</sup>S100β<sup>+</sup>).

**Figure S2. Gli1 is specifically up-regulated in qNSCs long-term following PTC deletion, Related to Figure 2.** Expression of the transcription factors *Gli1-3* mRNAs quantified using qRT-PCR from V-SVZ cell populations sorted by FACS from mice 6 months after tamoxifen administration. Quantification represents the relative expression of *Gli1-3* in *PTC<sup>-/-</sup>* and *PTC<sup>+/+</sup>* mice. Data represent means ± SEM obtained from analyses of cells independently isolated from *PTC<sup>+/+</sup>*, *PTC<sup>-/-</sup>* mice (n= 4 per phenotype). \*p<0.05.

**Figure S3. SHH pathway activation at long term does not alter the pool of mature astrocytes, Related to Figure 2.** (A-C) Analyses from 2-month-old WT mice. FACS plots are shown for fluorescence minus one (FMO) controls (upper panel in A, B) for LEX/GLAST/EGFR/CD24 quadruple staining. (C) LEX and GLAST staining in CD24<sup>-</sup> cells show a high correlation between these two markers, notably between LEX<sup>dim</sup>/GLAST<sup>dim</sup> and LEX<sup>bright</sup>/GLAST<sup>bright</sup> phenotypes. 59.7% of GLAST<sup>bright</sup> cells are also LEX<sup>bright</sup> and 53.2% of GLAST<sup>dim</sup> cells are also LEX<sup>dim</sup>. (D) Mature astrocytes from the GLAST<sup>dim</sup>EGFR-CD24<sup>-</sup> population were counted and no differences were observed between *PTC<sup>+/+</sup>* and *PTC<sup>-/-</sup>* mice 6 months after tamoxifen injection. Data inside the boxes in C represent the mean ± SEM obtained from analyses of cells, isolated from 5 independent 2 month old WT mice, and data in D represent mean ± SEM obtained from analyses of cells isolated from 10 mice per phenotype.

**Figure S4. Long term SHH pathway activation leads to a decrease of NSCs progeny, Related to Figure 3.** (A-I) Quantification of the TACs (yellow boxes), Im Nbs (pink boxes) and Mig. Mbs (red boxes) populations sorted by FACS using TrueCount® microbead-calibrated tubes from *YFP-PTC<sup>+/+</sup>* and *YFP-PTC<sup>-/-</sup>* mice 15 days (15d), 6 months (6m) and 10 months (10m) after tamoxifen (Tam)-induced PTC deletion. Data are means ± SEM obtained from the independent analyses of cells isolated from 5 mice per phenotype for each time-point, individually for each mouse. \*p<0.05, \*\*p<0.01.

**Figure S5. SHH treatment decreases aNSC cell cycle length in vitro, Related to Figure 7.** LEX<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup> (A-B) and EGFR<sup>+</sup> (C) cells from adult V-SVZ were sorted by FACS and were either treated or not treated with SHH (10nM) (control, n.t), *in vitro*. The length of the second division was determined by time-lapse video microscopy where grey and white stars represent the divisions of the first and second cell in panel A, respectively. Data represent means ± SEM obtained from the analyses of cells isolated from 2 independent groups of at least 4 mice. \*\*p<0.01

**Figure S6. Summary schematic of SHH signaling roles on V-SVZ neurogenesis, Related to Figure 7.** Within a short period following SHH signaling activation, the proliferation of qNSCs and aNSCs is stimulated (arrows), leading to a transient increase of their pools and to the shortening of aNSCs cell cycle as observed *in vitro*. The activation of qNSCs into aNSCs is blocked (Feret et al. 2014). After a longer period following SHH pathway activation, the qNSCs pool continues to increase, whereas the pool of aNSCs progressively decreases leading to a depletion of neurogenesis and early aging of V-SVZ niche.

**Figure S7. Smo antagonist MRT-83 acts negatively on NSCs proliferation both in vitro and in vivo, Related to Figure 4 and Figure 6.** LEX<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup> (A, B), EGFR<sup>+</sup> (C, D), and CD24<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup> (E, F) sorted cells from young adult mouse V-SVZ were plated and then treated with the Smo antagonist MRT-83 (1 μM) or control buffer (n.t). The neurosphere forming potential (A, C, E) was determined as the number of neurospheres formed 7 days after plating and the amount of cells generated (B, D, F) was evaluated as the area of the formed neurospheres 5 days after plating. MRT-83 reduced neurosphere number and size from aNSCs, TACs and Im. Nbs suggesting further involvement of Smo in these effects. Data are represented as the mean ± SEM obtained from analyses of cells isolated from 3-4 independent groups of at least 3 mice. (G-K) Effects of intraventricular injection of MRT-83 (200ng; AP: ± 0mm, L: - 0.85mm, DV: - 2.52mm) vs Ctrl (Vehicle) on V-SVZ cell populations. Cells were analyzed by FACS 72h after injection, using a FUCCI-Green/GLAST-PE/EGF-647/CD24-PEcy7 quadruple staining. MRT-83 injection provoked a decrease in FUCCI-Green positive (FG<sup>+</sup>) proliferating qNSCs and aNSCs (G,H) which did not reach significance for aNSCs while no difference was observed for TACs, Im. Nbs and Mig. Nbs (I-K). Data are represented as means ± SEM obtained from cells isolated from 5 ctrl vs 5 MRT-83 treated mice, individually for each mouse. \*p<0.05 \*\*p<0.01 \*\*\*p<0.001

Figure S1. Related to Figure 1.

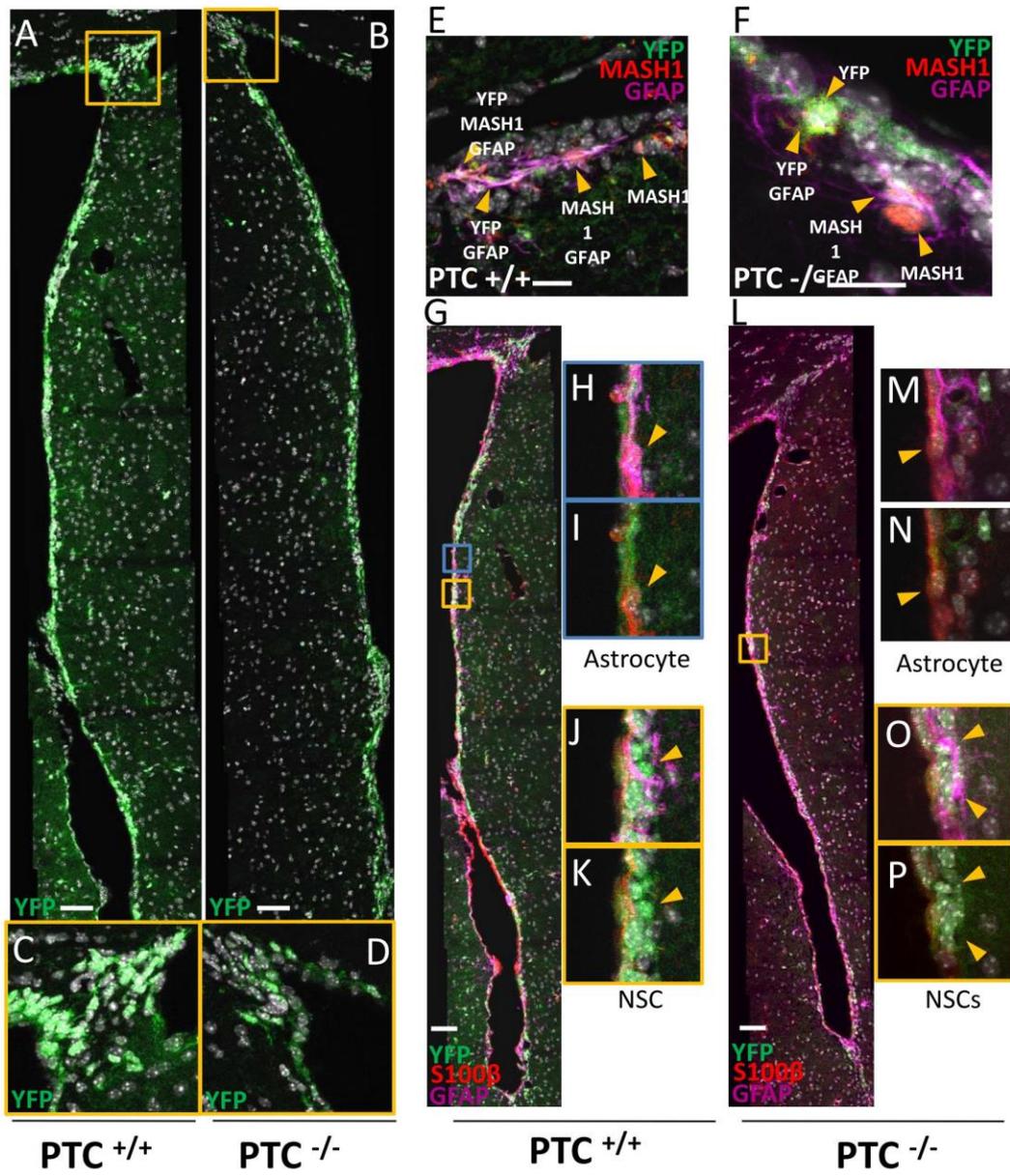


Figure S2. Related to Figure 2.

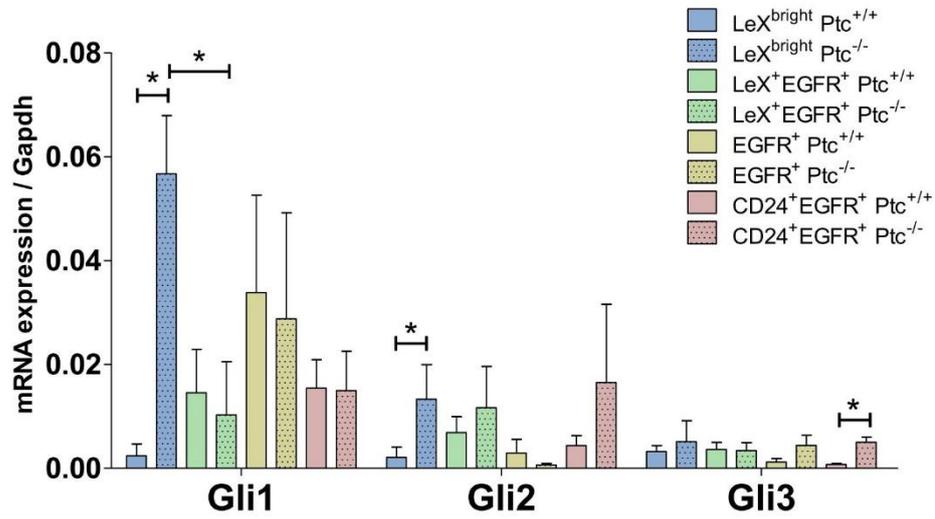


Figure S3. Related to Figure 2.

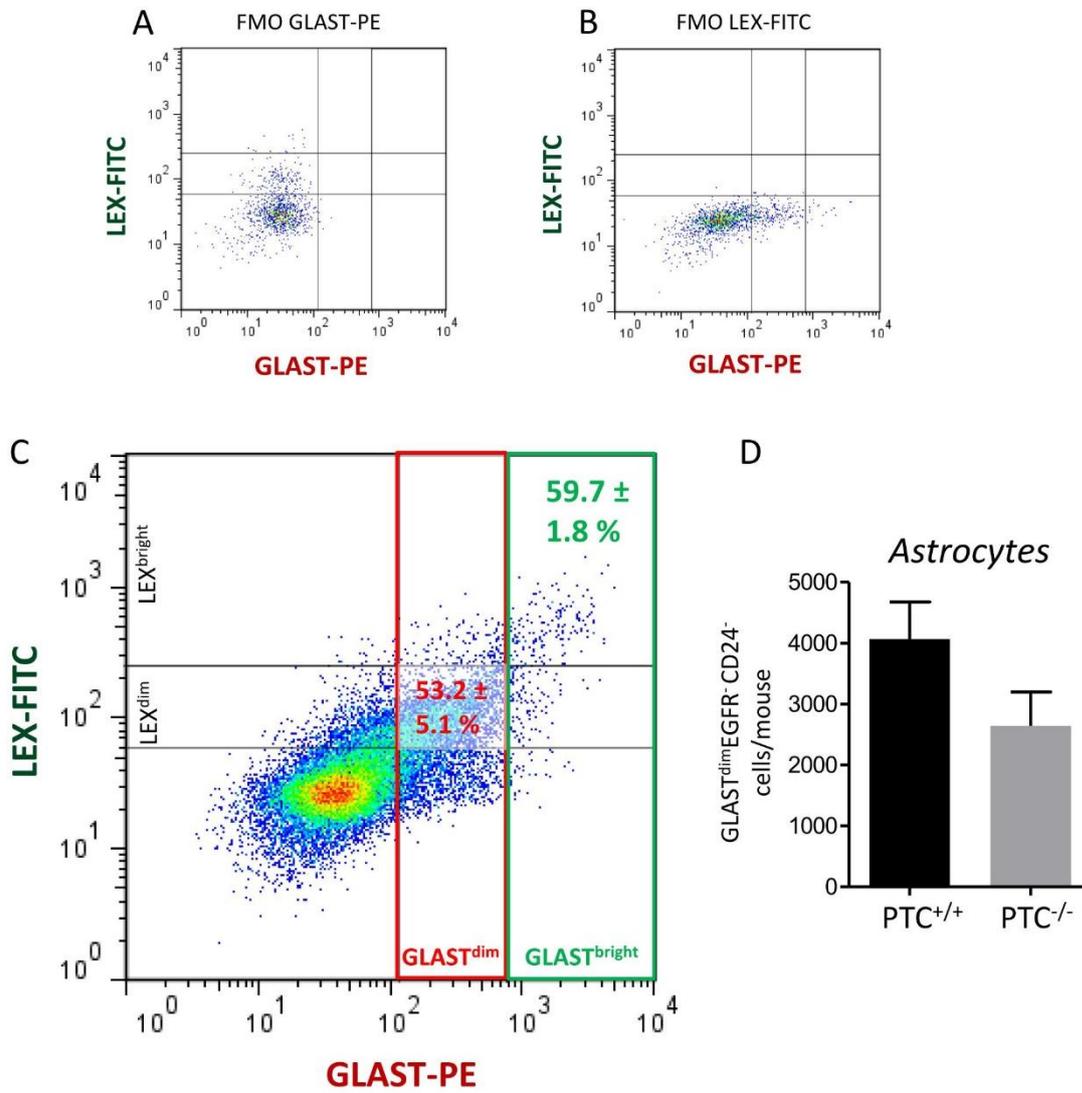


Figure S4. Related to Figure 3.

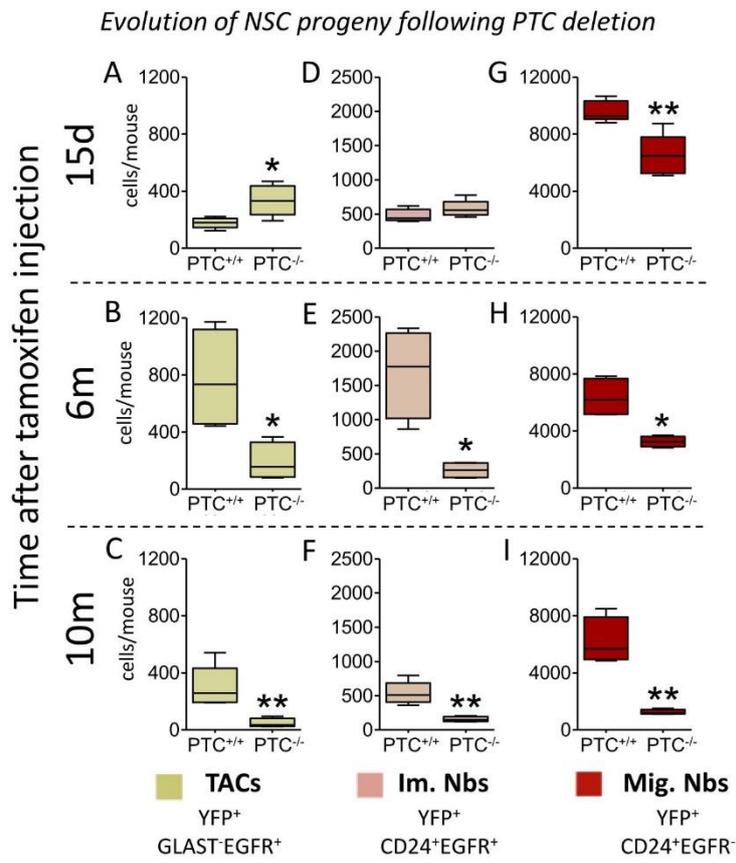


Figure S5. Related to Figure 7.

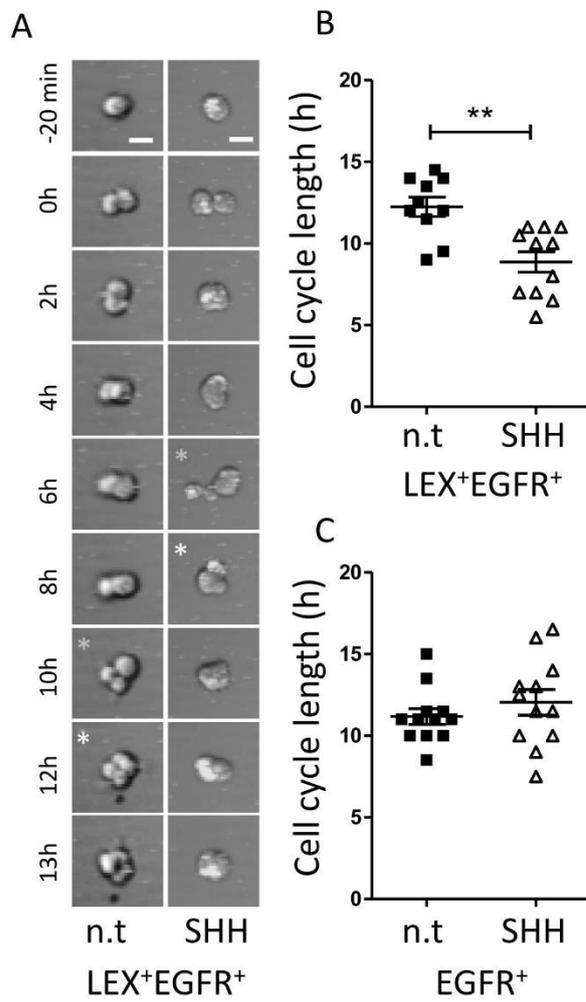


Figure S6. Related to Figure 7.

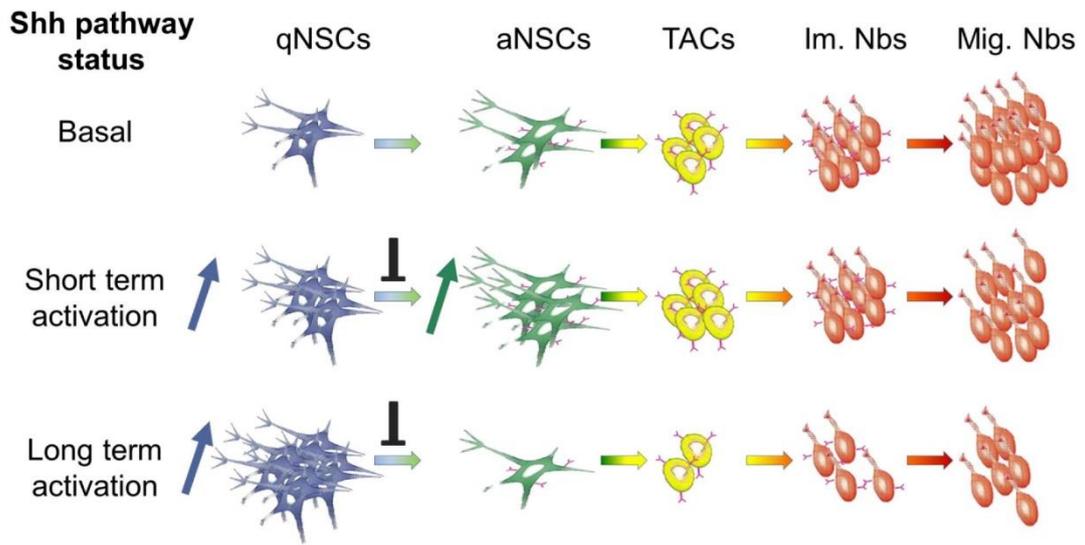
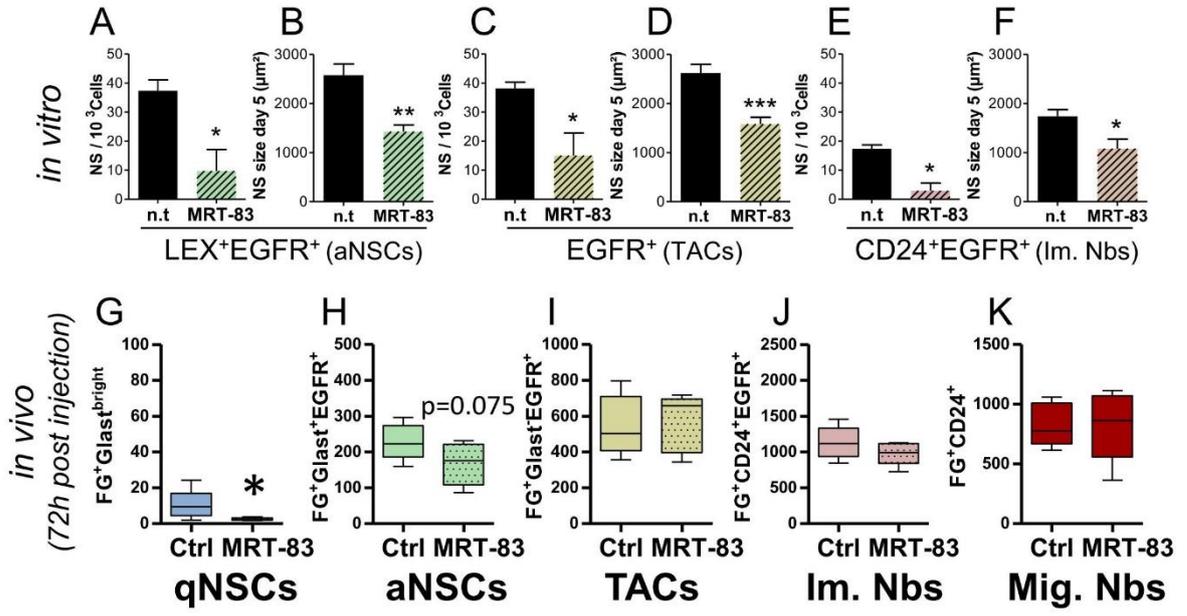


Figure S7. Related to Figure 4 and Figure 6.

**MRT-83 (SMO antagonist) treatment**



**Article 2, Tirou *et al*, PLoS One, 2020**

**Linda Tirou**, Mariagiovanna Russo, Hélène Faure, Giuliana Pellegrino, Ariane Sharif, Martial Ruat. C9C5 positive mature oligodendrocytes are a source of Sonic Hedgehog in the mouse brain. PLoS One, 2020, 15 (2), pp e0229362, (doi:10.1371/journal.pone.0229362)

## Résumé

La protéine Sonic Hedgehog (Shh) est produite sous la forme d'un précurseur effectuant une autoprotéolyse aboutissant à la formation d'un fragment amino-terminal ShhN, porteur des activités biologiques de cette protéine. La liaison du ligand Shh à son récepteur Patched (Ptc) initie l'activation de la voie Shh dans de nombreuses cellules du cerveau adulte de souris, dont les astrocytes. Cette voie participe ainsi à la régulation de la physiologie de ces cellules gliales et intervient dans le rôle de ces cellules pour l'organisation des connexions synaptiques du cortex. Elle est également impliquée dans la régulation des cellules souches neurales adultes et de leur descendance. Cependant, les sources de la protéine Shh et sa distribution sont encore très peu caractérisées chez les mammifères.

Nous avons étudié la distribution de la protéine Shh et identifié les cellules exprimant ce ligand dans le cerveau adulte de souris en utilisant l'anticorps monoclonal C9C5 de lapin dirigé contre la forme active de la protéine Shh. Des expériences d'immunohistofluorescence (IHF) sur cerveau de souris adulte ont mis en évidence la présence de signal sur des cellules distribuées largement dans tout le cerveau. Le signal Shh-C9C5 marque le corps cellulaire de ces cellules et met également en avant des prolongements nombreux et complexes. Des expériences complémentaires d'IHF avec des marqueurs oligodendrocytaires couvrant différentes étapes du lignage oligodendrocytaire, démontrent que les cellules C9C5<sup>+</sup> sont des oligodendrocytes matures exprimant les marqueurs oligodendrocytaires CC1, Olig2 et Sox10 mais n'exprimant pas le PDGFR $\alpha$ , un marqueur des précurseurs oligodendrocytaires. Ces cellules Shh-C9C5<sup>+</sup> représentent 11-12% des oligodendrocytes matures du cerveau de souris adulte. Ces résultats démontrent pour la première fois, l'existence d'une sous-population d'oligodendrocytes matures exprimant la protéine Shh et présents dans de nombreuses régions du cerveau de rongeur adulte. Ces cellules constituent ainsi une source potentielle de ligand Shh dans le cerveau adulte qui n'avait pas encore été identifiée.

Afin d'approfondir l'analyse de l'expression de Shh, nous avons étudié la distribution des ARNm de ce ligand en utilisant une technique novatrice de très haute sensibilité, le smFISH (single-molecule fluorescent *in*

*situ* hybridization). A l'aide de cette technique, nous avons confirmé la présence d'ARNm de Shh au sein d'oligodendrocytes positifs pour Olig2 et Sox10 (12-30%) en accord avec les résultats obtenus en IHF. Ces cellules ont été retrouvées dans les principales aires du cerveau, le cortex cérébral, le pallidum ventral, le gyrus denté de l'hippocampe et les noyaux hypothalamiques au niveau de l'éminence médiane. Les transcrits de Shh ont également été retrouvés dans des cellules GABAergiques du pallidum ventral, en accord avec la description de transcrits de Shh dans cette région faite par des études antérieures (Traiffort et al., 2001), un élément en faveur de la spécificité de la technique smFISH.

Nous avons comparé la localisation de Ptc, récepteur du ligand Shh, à celle des cellules Shh-C9C5<sup>+</sup>. A l'aide d'expériences d'IHF sur la souris reportrice Ptc<sup>LacZ/+</sup> exprimant l'enzyme  $\beta$ -galactosidase sous le promoteur du gène Ptc, nous avons identifié l'expression de Ptc dans des astrocytes GFAP<sup>+</sup> ou S100 $\beta$ <sup>+</sup> et des neurones HuC/D<sup>+</sup>. Cette analyse suggère que les cellules Shh-C9C5<sup>+</sup> pourraient sécréter Shh à proximité des astrocytes et des neurones Ptc<sup>+</sup>. Ce peptide pourrait donc participer à la régulation de la voie Shh au sein des astrocytes et des neurones.

Nous avons ensuite examiné la variation de la distribution de cellules Shh-C9C5<sup>+</sup> au cours du temps en analysant ce signal dans l'hypothalamus de souris aux stades postnatals P4, P10, P20 et à 2, 9 et 12 mois d'âge. L'analyse des signaux histochimiques révèle l'apparition du signal Shh-C9C5 à P10, le nombre de cellules positives augmente alors à P20 et 2 mois, puis chute chez l'animal âgé. En effet, à 12 mois, seuls quelques rares oligodendrocytes Shh-C9C5<sup>+</sup> persistent indiquant une régulation de cette protéine au cours du temps, indépendamment du nombre d'oligodendrocytes.

L'ensemble de ces résultats suggère qu'une sous-population d'oligodendrocytes matures constitue une nouvelle source de ligand Shh dans le cerveau de souris adulte. Les souris reportrices de Shh (Shh<sup>CreER</sup>-R26YFP, Shh<sup>CreER</sup>-R26<sup>LacZ</sup>) et les anticorps dirigés contre Shh, utilisés à ce jour, n'avaient pas permis de mettre en évidence ces cellules. Cette observation pourrait s'expliquer par une différence dans la sensibilité des

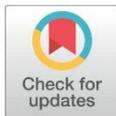
techniques liée au rapporteur utilisé et par l'existence de différentes formes de Shh présentant diverses modifications post-traductionnelles. La distribution de ces cellules est régulée au cours du temps : elles apparaissent à P10, stade associé à une vague de myélinisation suggérant une corrélation possible entre la présence de la protéine Shh-C9C5 et le processus de myélinisation. Après une augmentation importante du nombre de ces cellules jusqu'à P20, elles sont fortement diminuées avec l'âge. Cette chute du nombre de cellules Shh-C9C5<sup>+</sup> pourrait être liée à la perte de fonctionnalité des oligodendrocytes avec l'âge et amène à s'interroger sur le rôle de cette protéine Shh dans les fonctions de l'oligodendrocyte.

## RESEARCH ARTICLE

## C9C5 positive mature oligodendrocytes are a source of Sonic Hedgehog in the mouse brain

Linda Tirou<sup>1</sup>, Mariagiovanna Russo<sup>1</sup>, Helene Faure<sup>1</sup>, Giuliana Pellegrino<sup>1</sup>, Ariane Sharif<sup>2</sup>, Martial Ruat<sup>1\*</sup><sup>1</sup> UMR-9197, Neuroscience Paris-Saclay Institute, CNRS, Paris Saclay University, Gif-sur-Yvette, France, <sup>2</sup> UMR-S Inserm 1172/Lille University, France

\* ruat@inaf.cnrs-gif.fr



## OPEN ACCESS

**Citation:** Tirou L, Russo M, Faure H, Pellegrino G, Sharif A, Ruat M (2020) C9C5 positive mature oligodendrocytes are a source of Sonic Hedgehog in the mouse brain. PLoS ONE 15(2): e0229362. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229362>

**Editor:** Ken Arai, Massachusetts General Hospital/Harvard Medical School, UNITED STATES

**Received:** October 24, 2019

**Accepted:** February 4, 2020

**Published:** February 20, 2020

**Copyright:** © 2020 Tirou et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the manuscript and its Supporting Information files.

**Funding:** M. R. and L. T. are the recipient of a doctoral fellowship from the Ministère de la Recherche and L.T. from Fondation pour l'Aide à la Recherche sur la Sclérose En Plaque (ARSEP), respectively. This work was supported by grants from ARSEP, Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC) and CNRS to M. R<sup>\*</sup>. The funders had no role in study design, data collection and

## Abstract

In the mature rodent brain, Sonic Hedgehog (Shh) signaling regulates stem and progenitor cell maintenance, neuronal and glial circuitry and brain repair. However, the sources and distribution of Shh mediating these effects are still poorly characterized. Here, we report in the adult mouse brain, a broad expression pattern of Shh recognized by the specific monoclonal C9C5 antibody in a subset (11–12%) of CC1<sup>+</sup> mature oligodendrocytes that do not express carbonic anhydrase II. These cells express also Olig2 and Sox10, two oligodendrocyte lineage-specific markers, but not PDGFR $\alpha$ , a marker of oligodendrocyte progenitors. In agreement with oligodendroglial cells being a source of Shh in the adult mouse brain, we identify Shh transcripts by single molecule fluorescent *in situ* hybridization in a subset of cells expressing Olig2 and Sox10 mRNAs. These findings also reveal that Shh expression is more extensive than originally reported. The Shh-C9C5-associated signal labels the oligodendroglial cell body and decorates by intense puncta the processes. C9C5<sup>+</sup> cells are distributed in a grid-like manner. They constitute small units that could deliver locally Shh to its receptor Patched expressed in GFAP<sup>+</sup> and S100 $\beta$ <sup>+</sup> astrocytes, and in HuC/D<sup>+</sup> neurons as shown in Ptc<sup>LacZ/+</sup> reporter mice. Postnatally, C9C5 immunoreactivity overlaps the myelination peak that occurs between P10 and P20 and is down regulated during ageing. Thus, our data suggest that C9C5<sup>+</sup>CC1<sup>+</sup> oligodendroglial cells are a source of Shh in the mouse postnatal brain.

## Introduction

Sonic Hedgehog (Shh) is a secreted molecule implicated in neural patterning during embryogenesis. It acts at short- and long-range through its release as soluble multimers and its transport in extracellular particles or along filopodia [1]. In the mature rodent brain, the protein is implicated in stem cell maintenance and brain repair, in the plasticity of neuronal circuits and in mediating communication between neurons and astrocytes. Shh is autoproteolytically cleaved to an amino-terminal active fragment (ShhN), which is widely distributed in the rodent brain. Its axonal transport suggests that the protein, which is synthesized by a restricted population of GABAergic, cholinergic, and layer V corticofugal neurons, can signal at the

analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

nerve terminals [2, 3]. Shh binds to the transmembrane receptor Patched (Ptc), which relieves the repression exerted on the G-protein coupled receptor Smoothed. This initiates signal transduction implicating the activation of the transcription factors of the Gli family (Gli1-3) and the transcription of target genes [1]. However, several non-canonical pathways not linked to gene transcription have been described [4].

Activation of Shh signaling in astrocytes has been proposed to promote neuroprotection [5], to reduce neuronal activity [6, 7] and to keep their physiology [8] whereas its attenuation leads to reactive astrocytosis [9]. Shh from neuronal sources [10, 11, 12, 13, 14, 15] regulates adult mouse neurogenic niches providing olfactory bulb interneurons and granule neurons in the dentate gyrus of the hippocampus. Shh present in the cerebrospinal fluid [16] may regulate the neurogenic niche in the subventricular zone of the lateral ventricle and the balance between quiescence and activation of neural stem cells [17]. Shh signaling also participates in the embryonic and postnatal production of oligodendroglial cells and is of interest for remyelination [18].

Here, we investigated the distribution pattern of Shh in the mouse brain using the monoclonal C9C5 antibody directed against human SHH. We further characterized a broad distribution of C9C5 immunoreactive signal in brain tissues, identified a subset of mature oligodendrocytes as a source of Shh and showed that these cells constitute Shh-expressing domains in the brain.

## Materials and methods

### Animals

Post-natal and adult C57BL/6J male mice were from Janvier Labs (Genest-Saint-Isle, France). *Glast-Cre<sup>ERT2</sup>R26R-YFP* and *Ptc<sup>+LacZ</sup>* mouse lines have been described [19]. Adult mice (10 weeks or older as indicated) were used. Animal experiments were performed in accordance with the Council Directive 2010/63EU of the European Parliament and approved (project n° 4558) by the French ethic committee (C2EA– 59 Comité Paris Centre et Sud).

### Cell culture and transfection

HEK293 (ATCC) cells were cultured, transfected using X-tremeGENE9 (Sigma) with pRK5-mShh for the expression of mouse Sonic Hedgehog (mShh) (provided by Dr P. Beachy) or empty vector and harvested 48h later as described [10].

### Western blotting

Adult brain tissues from four mice were dissected, homogenized in RIPA Buffer (Thermo) and solubilized (1h30). Twenty  $\mu$ g of the cleared tissues supernatants and 1  $\mu$ g of mock or mShh transfected HEK293 homogenates were subjected to SDS-PAGE and Western blotting [10]. Protein concentrations were determined using the BCA protein assay (Thermo, #23225). Anti-SHHN C9C5 rabbit monoclonal antibody (1/1000, #2207, Cell Signaling, epitope surrounding Glu53 of human SHH), and anti-Actin AC-40 mouse monoclonal antibody (1/2000, #A4700, Sigma) were probed overnight and chemiluminescence was acquired with Chemidoc apparatus (BIORAD). The specificity of the C9C5 antibody was assessed by Western blot in three independent blocking experiments: C9C5 antibody was pre-incubated overnight at 4°C with 1 or 30  $\mu$ g/ml of mouse Shh (residues 25–198) fused to glutathione-S-transferase (GST-mShhN) or of GST alone [10] for brain extracts and cell homogenates, respectively. Specificity of the C9C5 antibody for ShhN in brain extracts is also provided in [S1 Fig](#).

## Immunofluorescence

Mice were deeply anesthetized with intraperitoneal injection of Xylazine (Rompun<sup>®</sup>, 10 mg/kg) and Ketamine (Imalgène<sup>®</sup>, 100 mg/kg) and were perfused with 4% paraformaldehyde (PFA) in 0.2 M sodium phosphate, pH 7.4. After dissection, brains were post-fixed for 2 h in 4% PFA and cryoprotected in 10% sucrose in PBS until tissue sank (6–12 hrs) and then 30% sucrose in PBS until tissue sank. The tissues were embedded in Optimal Cutting Temperature (O.C.T.) compound Tissue-Tek (Sakura Finetek), frozen in liquid nitrogen cooled isopentane and kept at  $-80^{\circ}\text{C}$  until use. Tissues were allowed to equilibrate to  $-20^{\circ}\text{C}$  in a cryostat (Leica, CM3050) for ~30 min and 14  $\mu\text{m}$  coronal sections were prepared and mounted onto Super-Frost<sup>®</sup> ultra Plus slides (Thermo Scientific). For immunostaining, sections were incubated 1h in PBS, 0.25% Triton, 1% BSA and 1h with donkey anti-mouse Fab fragment (1/50, 715-007-003, Jackson IR). The primary antibodies were incubated overnight at  $4^{\circ}\text{C}$ : rabbit anti-SHHN (1/300, C9C5, #2207, Cell Signaling), mouse anti-GFAP (1/400, MAB360, Millipore), goat anti-Olig2 (1/400, AF2418, R&D Systems), mouse anti-S100 $\beta$  (1/500, S2532, Sigma), mouse anti-adenomatous polyposis coli (APC) (1/600, clone CCl1, OP80, Millipore), chicken anti- $\beta$ galactosidase (1/200, ab9361, Abcam), goat anti-Sox10 (1/100, AF2864-SP, R&D Systems), rat anti-PDGFR $\alpha$  (1/300, 558774, BD Pharmingen), sheep anti-Carbonic Anhydrase II (CAII) (1/200, AHP206, BIORAD), rabbit anti-Iba1 (1/500, 019-19741, Fujifilm Wako), mouse anti-HuCD (1/400, A-21271, Molecular Probes). Sections were incubated with the appropriate secondary antibody (1/200 to 1/400, Millipore, Jackson IR) for 2h at room temperature. Images were acquired with a 40X objective (N.A. 0.75) using fluorescence (Leica DM2000) or confocal (Leica TCS-SP8) microscope. For the later, Z-stacks (9.6  $\mu\text{m}$ ), containing twelve Z-sections images were analyzed using LASAF (Bitplane AG) and reconstructed in ImageJ 1.39t (Free-ware, NIH) and Photoshop-CS3 (Adobe). C9C5 immunostaining was performed from the brain of twenty adult mice samples used in this study with similar results. The specificity of C9C5 antibody was assessed on adult mouse brain sections in three independent blocking experiments: C9C5 antibody was pre-incubated overnight at  $4^{\circ}\text{C}$  with 400  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of recombinant mouse ShhN fragment (residues 25–198) fused to glutathione-S-transferase (GST-mShhN) or of GST alone as control [10]. Single molecule fluorescent *in situ* hybridization was performed on frozen brain sections of three adult mice using the RNAscope<sup>®</sup> Multiplex Fluorescent Kit-v2 according to the manufacturer's protocols (Advanced Cell Diagnostics, Newark). Specific probes were used to detect Shh (#314361), Olig2 (#447091-C2), Sox10 (#435931-C3) and GAD (#400951-C3) mouse mRNAs.

## Cell counting and statistical analysis

Quantification of C9C5<sup>+</sup> cells in the hypothalamic parenchyma was performed on sections obtained at the level of the median eminence from three animals at P4, P10 and 9 months stainings, or four animals at P20, 2 and 12 months, and was expressed as a number of cells per  $\text{mm}^2$ . The number of C9C5<sup>+</sup> counted cells per animal ranged between 0 and 4 at P4, 45 and 57 at P10, 41 and 70 at P20, 39 and 61 at 2 months, 4 and 8 at 9 months, and 0 and 3 at 12 months. Quantification of C9C5<sup>+</sup>CC1<sup>+</sup>Olig2<sup>+</sup>, C9C5<sup>+</sup>CC1<sup>+</sup>Sox10<sup>+</sup>, C9C5<sup>+</sup>CAII<sup>+</sup> and C9C5<sup>+</sup>PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup> co-staining in the cerebral cortex and hypothalamic parenchyma was performed on sections obtained at the level of the median eminence from three adult mice except for Sox10 staining (n = 4). The number of counted cells per region and per animal ranged between 200 and 350 for CC1<sup>+</sup> cells, 300 and 700 for Olig2<sup>+</sup> cells, 300 and 600 for Sox10<sup>+</sup> cells, 100 and 250 for CAII<sup>+</sup> cells, 50 and 200 for PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup> cells. Quantification of  $\beta$ galactosidase<sup>+</sup>S100 $\beta$ <sup>+</sup> co-staining was performed in the hypothalamic parenchyma at the level of the median eminence from four adult mice. The number of S100 $\beta$ <sup>+</sup> counted cells per animal ranged between 250 to 325

cells. Quantification of *Shh*<sup>+</sup>*Olig2*<sup>+</sup> and *Shh*<sup>+</sup>*Sox10*<sup>+</sup> co-stainings in the cerebral cortex and in the hypothalamic parenchyma was done on sections obtained at the level of the median eminence from three adult mice. The number of counted cells per region and per animal ranged between 120 to 300 *Olig2*<sup>+</sup> cells and from 100 to 550 *Sox10*<sup>+</sup> cells. Countings of co-localised stainings were done using ROI and multi-point ImageJ tools. Quantitative data are expressed as the mean ± standard error of the mean (SEM). Comparisons between two experimental groups were made using unpaired Student's t-tests. A value of  $p < 0.05$  was considered statistically significant. Graphs were drawn using GraphPad Prism 5.2 (GraphPad Software, Inc).

## Results

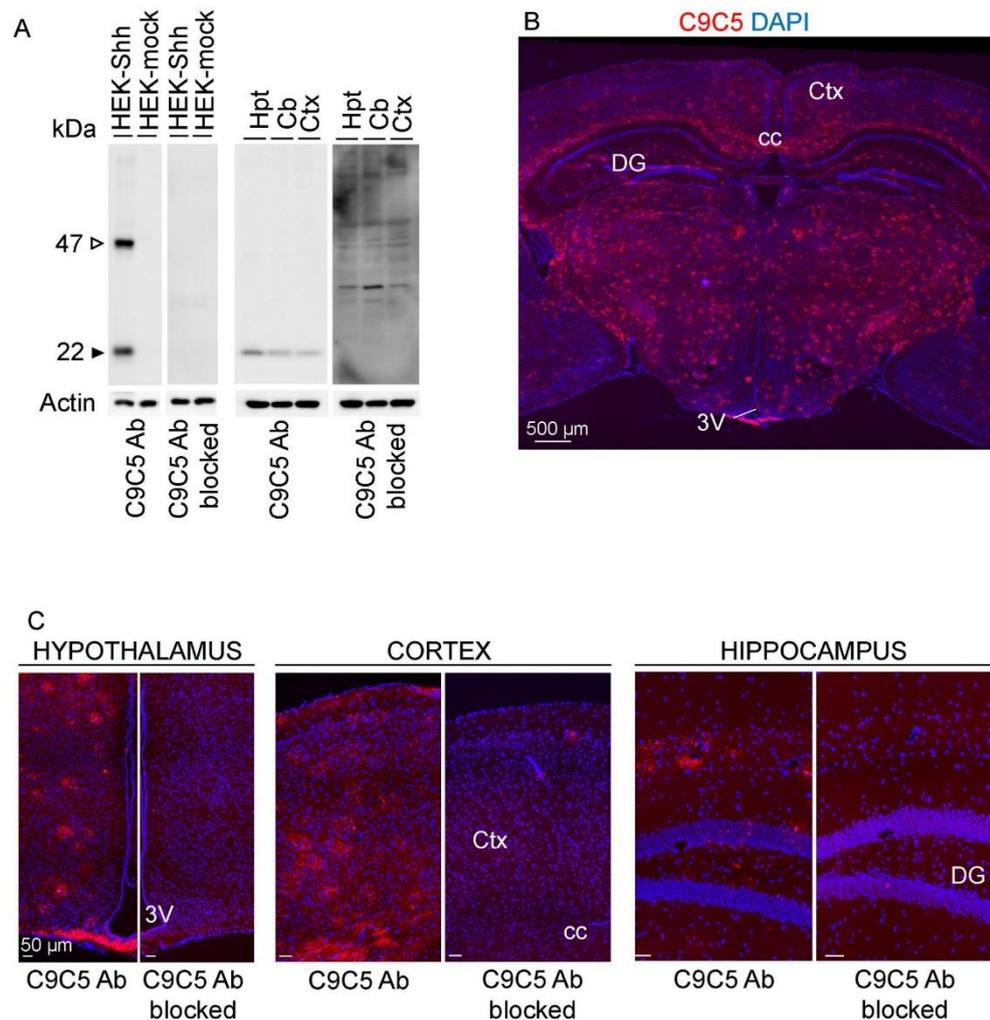
### The Sonic Hedgehog antibody 'C9C5' labels CC1 positive oligodendrocytes

We sought to identify in the adult mouse brain, the protein expression and cell distribution of Sonic Hedgehog (Shh) using the monoclonal 'C9C5' antibody directed against the amino-terminal fragment of human SHH. From Western blot experiment analysis (Fig 1A, S1 Fig), we observed that the C9C5 antibody detected a 22 kDa signal corresponding to the expected size for the cleaved amino-terminal fragment of Shh (ShhN) in both HEK293 cells expressing mouse Shh and brain tissues lysates from adult mice. This signal was eliminated in blocking experiments (Fig 1A) consistent with this signal being related to ShhN.

Immunofluorescent labeling with C9C5 revealed high immunoreactivity throughout most brain regions including the cerebral cortex, the hippocampus, in fiber tracts, in thalamic nuclei, in the tuberal region of the hypothalamus including the median eminence (ME) (Fig 1B and 1C) and in the cerebellum (S2A and S2B Fig). Specificity of C9C5 binding was provided by the absence of these signals in blocking experiments (Fig 1C). Interestingly, C9C5-immunoreactive cells displayed a stellate morphology with intense signal in their cell bodies and their processes that were decorated by immunoreactive puncta (Figs 2A–2C, 3A, 3B, 5E, 6B–6E; S2B, S3A and S3B Figs). These cells were distributed in almost all brain regions analyzed (Figs 1, 2A–2C, 3A, 3B, 5A, 5E and 6D; S2A, S2B, S3A and S3B Figs). In the cerebellum, Purkinje cells are expressing Shh [2, 3] but were C9C5 negative (S2A and S2B Fig) suggesting the antibody does not recognize neuronal Shh.

All C9C5<sup>+</sup> cells were also immunoreactive for the three oligodendroglial markers *Olig2*, *Sox10* and *CC1* (Fig 2A–2C; Fig 3A, S3A Fig). C9C5<sup>+</sup> cells were not immunoreactive for Platelet-derived growth factor receptor- $\alpha$  (PDGFR $\alpha$ ), a marker of oligodendrocyte progenitor cells (OPCs) [20] and for carbonic anhydrase (CA) II, a marker of a subpopulation of mature oligodendrocytes [21] (Fig 3B, S3B Fig). Quantification of the distribution of C9C5<sup>+</sup> cells in these various oligodendroglial cell populations in the hypothalamus and in the cerebral cortex are presented in Table 1. Thus, in these two regions, C9C5<sup>+</sup> cells represented 11–12% of *CC1*<sup>+</sup> cells and 3–6% of *Sox10*<sup>+</sup> and *Olig2*<sup>+</sup> cells. These data suggest that C9C5 labels a subpopulation of mature oligodendrocytes as shown in hypothalamic nuclei, the ME, the hippocampal and cerebral cortical layers and in the white matter of the corpus callosum (Figs 2A–2C and 3A; S3A Fig). In the hippocampus, these oligodendroglial cells were scattered over the pyramidal cell populations (Fig 2B, red square), were present in the hilus region and the neurogenic niche associated to the granule cell layer of the dentate gyrus (Fig 2B, yellow square; S3A and S3B Fig).

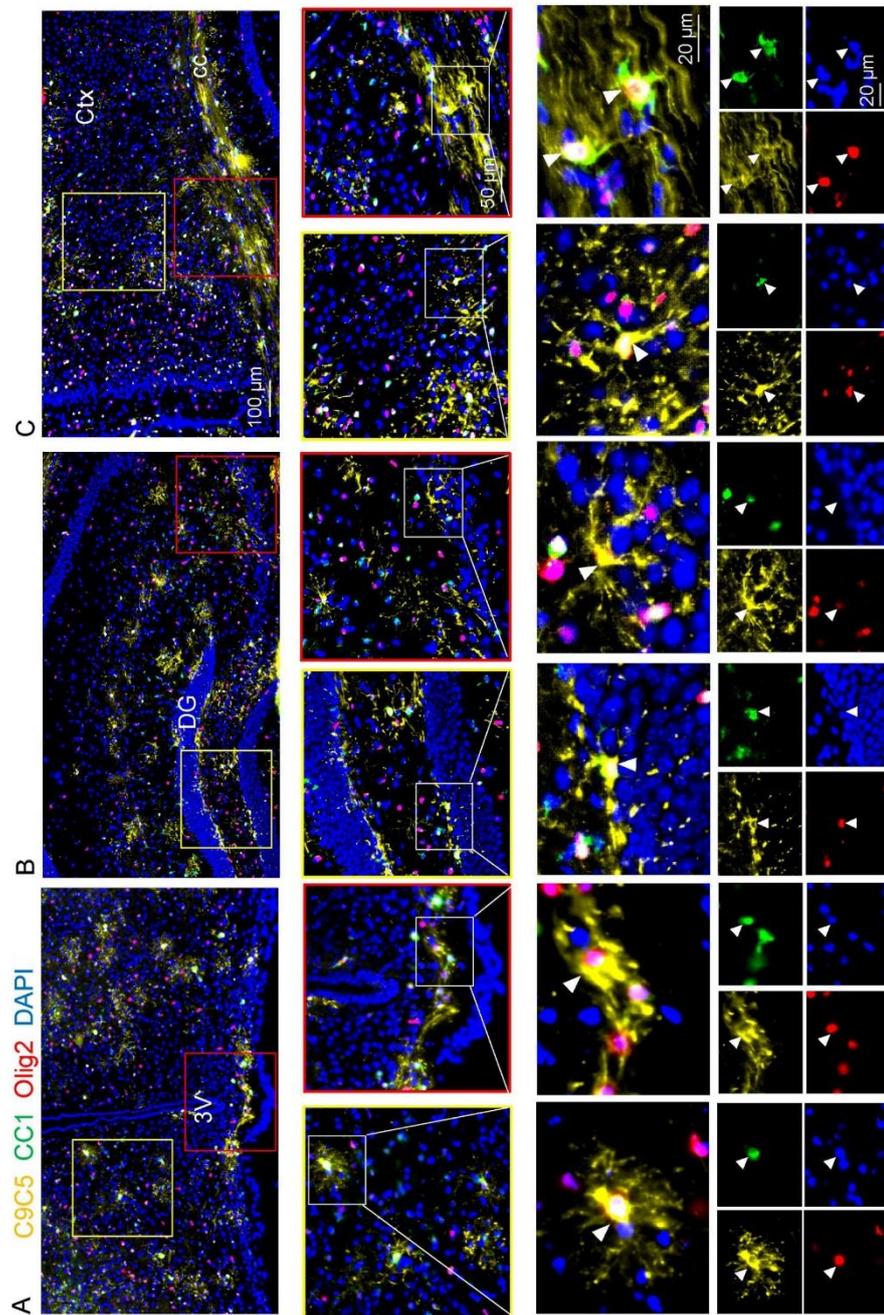
To further support that oligodendroglial cells are a source of Shh in the adult brain, we used single molecule multiplex fluorescent *in situ* hybridization to investigate Shh mRNA distribution. We successfully detected robust expression of Shh transcripts using RNAscope in a subset of scattered cells expressing the transcripts of *Olig2* and *Sox10* in the brain regions described above (Fig 4A–4E, Table 2). In forebrain regions, Shh mRNAs were detected in glutamic acid



**Fig 1. Characterization of the C9C5 anti-SHHN antibody expression pattern.** (A) Western blot of protein homogenates from HEK293 cells transfected with a mouse Shh (HEK-Shh) or control vector (HEK-mock) and from hypothalamic (Hpt), cerebellar (Cb) or cerebrocortical (Ctx) tissues of an adult mouse with the C9C5 antibody, and was reproduced with tissues from three other animals. A 22 kDa band, the expected size for the aminoterminal fragment of Shh, was detected in HEK-Shh cells and in tissues but was absent in HEK-mock cells and in blocking experiments (n = 3). A 47 kDa signal corresponding to the uncleaved Shh protein was detected in HEK-Shh cells but not in tissues. Actin served as a loading control. (B-C) Low-magnification photomontages of coronal brain sections of adult mice showing strong C9C5 immunoreactivity in almost all brain regions (B), which was absent in blocking experiments (n = 3) (C). Staining was replicated in the twenty adult mice used in this study. Nuclei stained with DAPI. 3V, third ventricle; Hpt, Hypothalamus; Ctx, cerebral cortex; Cb, cerebellum; cc, corpus callosum; DG, dentate gyrus of the hippocampus.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229362.g001>

decarboxylase (*GAD*)<sup>+</sup> GABAergic neurons (Fig 4G) as reported previously [10] and in *Sox10*<sup>+</sup>*Olig2*<sup>+</sup> oligodendroglial cells (Fig 4H).

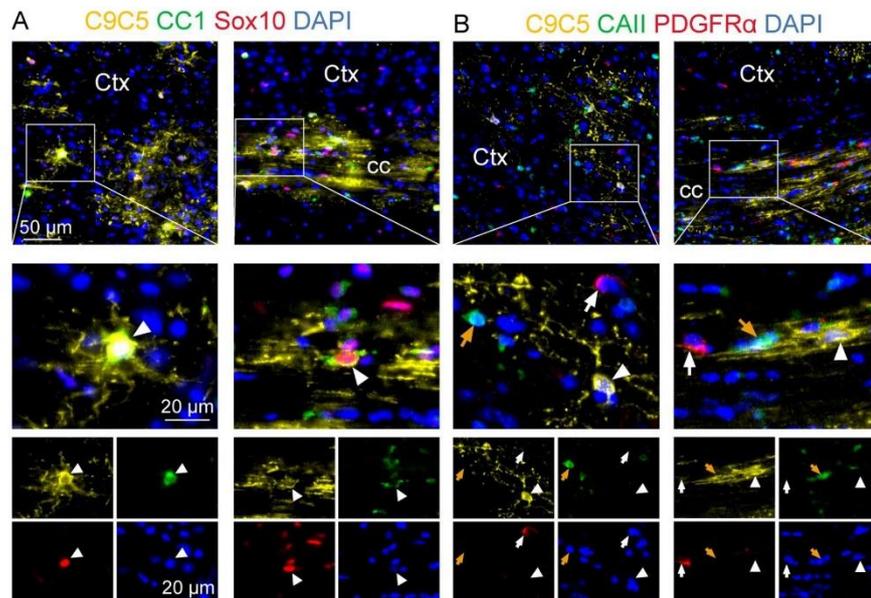


**Fig 2. C9C5<sup>+</sup> cells express the oligodendroglial markers CC1 and Olig2.** (A-C) Immunostaining of coronal brain sections from an adult mouse of the hypothalamic median eminence (A), the hippocampus (B), the cerebral cortex and corpus callosum (C) with the C9C5 antibody (yellow) and the oligodendroglial markers CC1 (green) and Olig2 (red). Yellow and red squares highlight magnifications of the ventromedial hypothalamic nucleus and the median eminence (A), the dentate gyrus and CA3 pyramidal layer (B) of the hippocampus, the cerebral cortex and the corpus callosum (C). White boxes show C9C5/CC1/Olig2 triple positive cells with stellate morphology presented in merge and single channels with the nuclear marker DAPI. Staining was replicated at least on three mice. 3V, third ventricle; Ctx, cerebral cortex; cc, corpus callosum; DG, dentate gyrus of the hippocampus.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229362.g002>

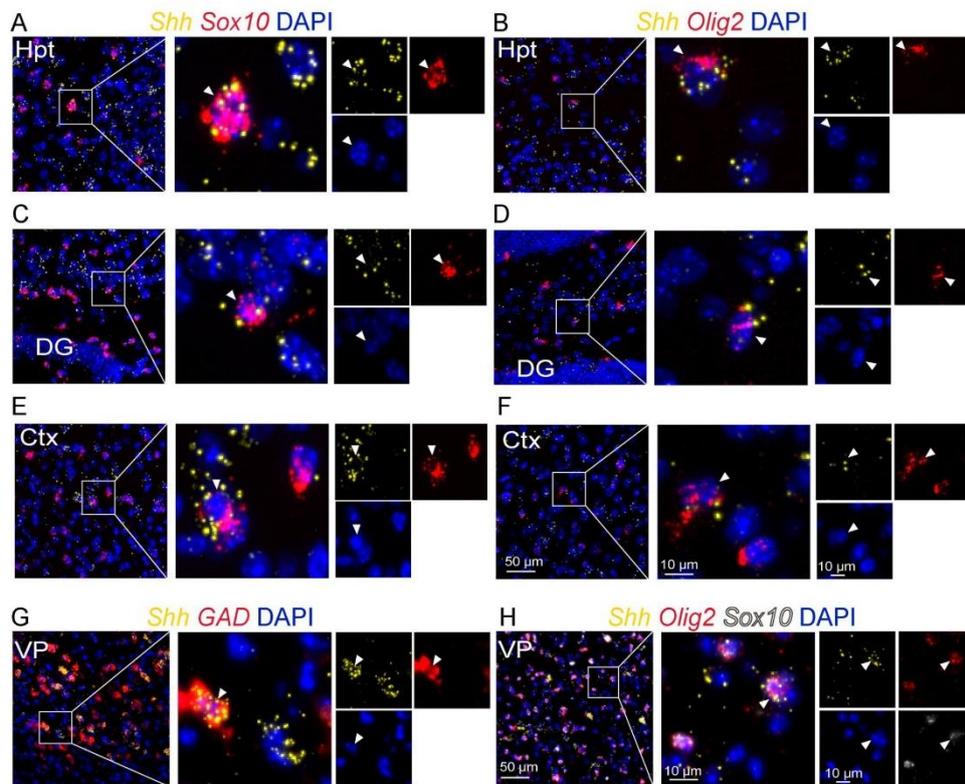
### Shh from C9C5<sup>+</sup> cells is localized next to Ptc-expressing cells

The distribution of the C9C5 signal in the oligodendroglial cell body and processes suggested that the associated Shh protein could be secreted to act locally on cells expressing its receptor Patched (Ptc). In the tuberal region of the hypothalamus of Ptc<sup>LacZ/+</sup> knock-in reporter mice, βgalactosidase (βgal) was strongly expressed in GFAP<sup>+</sup> (Fig 5A–5C) or S100β<sup>+</sup> (79.3 ± 3.1%, n = 4 animals) (Fig 5D) astrocyte nuclei. βgalactosidase was also detected with a lower intensity in cells positive for the neuronal marker HuC/D but was not identified in cells expressing the microglial marker Iba1 (Fig 5D). Using confocal microscopy, we showed that C9C5<sup>+</sup> cells and their processes were in close contact with cells showing an intense βgal staining (Fig 5E). These observations suggest that Shh secreted from the oligodendroglial cell could act on several neighboring astrocytes or neurons expressing Ptc.



**Fig 3. Characterization of C9C5<sup>+</sup> cells at different stages of the oligodendroglial lineage.** (A-B) Immunostaining of coronal brain sections from an adult mouse of the cerebral cortex and corpus callosum with the C9C5 antibody (yellow) and the oligodendroglial markers (A) CC1 (green) and Sox10 (red) or (B) CAII (green) and PDGFRα (red). White boxes (A, B) highlight magnifications of the cerebral cortex and the corpus callosum. (A) C9C5/CC1/Sox10 triple positive cells (white arrowhead) with stellate morphology are presented in merge and single channels with the nuclear marker DAPI. (B) C9C5<sup>+</sup> (white arrowhead), CAII<sup>+</sup> (orange arrow), and PDGFRα<sup>+</sup> (white arrow) cells are presented in merge and single channels with the nuclear marker DAPI. Note that C9C5 positive cells are CAII and PDGFRα negative. Staining was replicated at least on three mice. Ctx, cerebral cortex; cc, corpus callosum.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229362.g003>

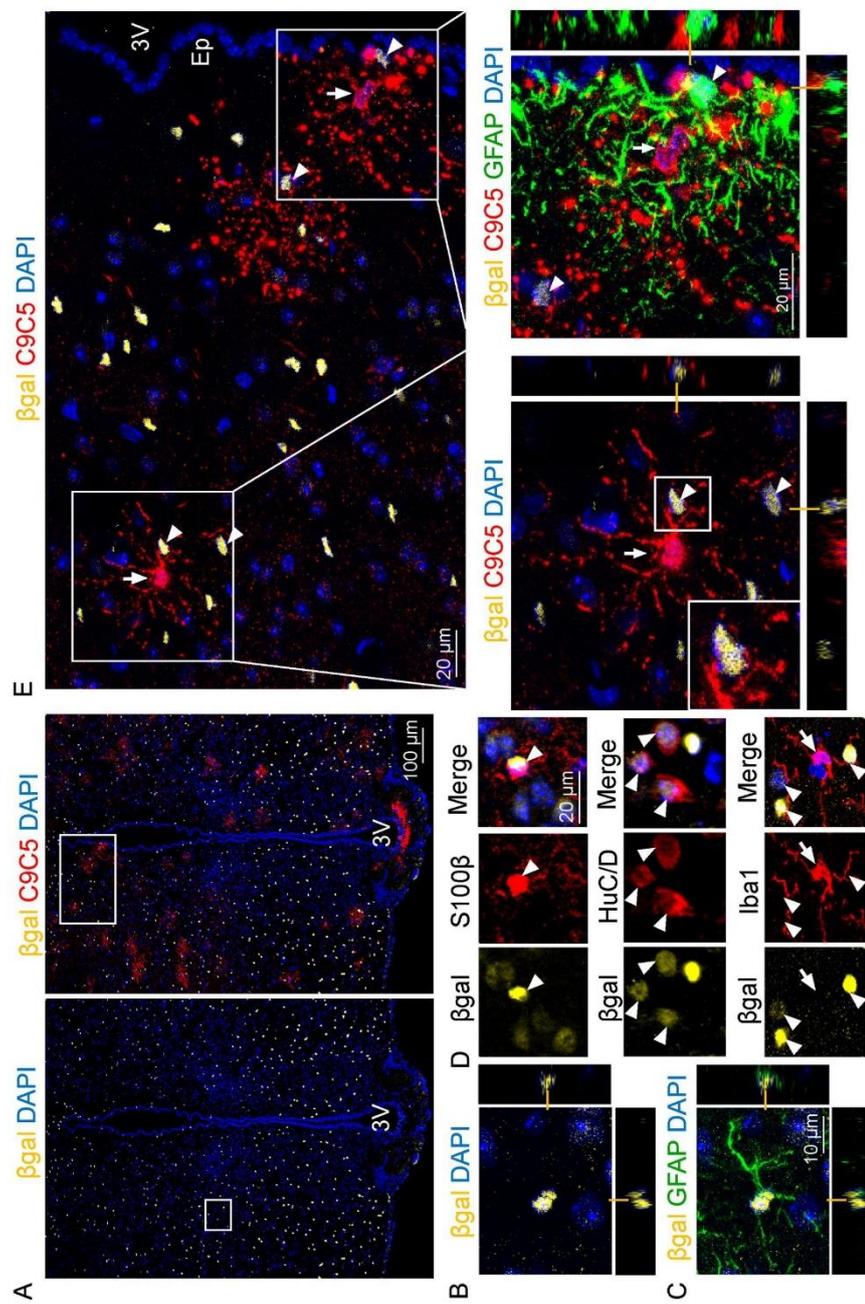


**Fig 4. Shh mRNA expression in oligodendroglial cells.** Multiplex *in situ* hybridization for Shh and for the oligodendroglial markers Olig2 and Sox10 as indicated, at the level of the tuberal region of the hypothalamus (Hpt) (A-B), the CA3 region of the hippocampus (C-D), the cerebral cortex (Ctx) (E-F), the ventral pallidum (VP) (H), and for the GABAergic marker GAD in the ventral pallidum (G). White boxes highlight magnifications of double Shh/Sox10 (A, C, E), Shh/Olig2 (B, D, F), Shh/GAD (G) or triple Shh/Sox10/Olig2 (H) positive cells (white arrowhead) presented in merge and single channels with the nuclear marker DAPI. Staining was replicated on three mice. DG, dentate gyrus of the hippocampus.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229362.g004>

### Distribution of C9C5<sup>+</sup> cells varies with age

Then, we investigated the presence of C9C5<sup>+</sup> cells in the brain during the postnatal period and in aged animals (Fig 6A–6G). In hypothalamic nuclei, C9C5 immunoreactivity was present in cells displaying stellate morphology starting at P10 with a pattern of cell distribution at P20 that mimicked the adult distribution (Fig 6B–6E). The number of C9C5<sup>+</sup> cells strongly decreased during ageing in the hypothalamus (Fig 6D–6G). In the ME, C9C5<sup>+</sup> cells were already observed at P4 (Fig 6A) while intense signal was present in adults and persisted in old animals (Fig 6D–6F), suggesting a different regulation of the signal over time compared to the nearby hypothalamic parenchyma. Quantification of the distribution of C9C5<sup>+</sup> cells with age in hypothalamic nuclei are presented in Fig 6G.



**Fig 5. C9C5<sup>+</sup> cells delineate Shh expression domains containing Ptc-expressing cells.** (A-E) Fluorescence confocal (A-C, E) imaging of βgalactosidase (βgal), C9C5, GFAP, S100β, HuC/D, and Iba1 immunostaining on coronal brain sections of adult

$Ptc^{lacZ/+}$  mouse hypothalamus at the level of the median eminence. (A, E) Detection of  $\beta$ gal signal (yellow) alone and together with C9C5 signal (red) indicated wide distribution of Ptc-expressing cells in hypothalamic nuclei. (B–C) Orthogonal views of the magnified white square (A, left) showing co-localization of  $\beta$ gal and the astroglial marker GFAP. (D) High magnifications of the hypothalamic parenchyma from independent experiments showing colocalization of  $\beta$ gal (white arrowheads) with the astroglial marker S100 $\beta$  or with the neuronal marker HuC/D, but not with the microglial marker Iba1 (white arrow). (E) White square magnification (from A, right) showing C9C5<sup>+</sup> cell bodies (white arrows) delineating Shh expression domains in the parenchyma and next to the ependymal layer (Ep) of the third ventricle (3V). White boxes highlight magnifications with orthogonal views of C9C5<sup>+</sup> processes contacting  $\beta$ gal<sup>+</sup> Ptc-expressing cells (white arrowheads). Staining was replicated on four mice. Nuclei stained with DAPI.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229362.g005>

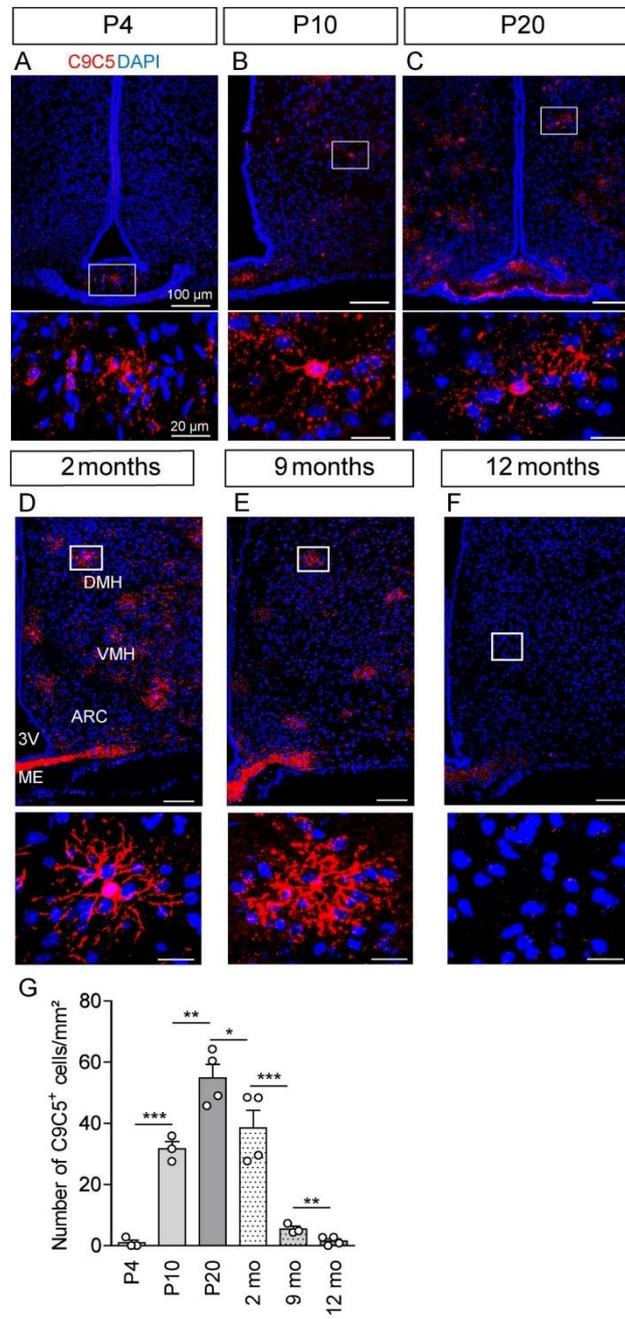
## Discussion

Here, we report the widespread distribution pattern of the C9C5 immunoreactivity in the adult mouse brain and show that C9C5 antibody marks a subset of CC1<sup>+</sup> (11–12%), Olig2<sup>+</sup> and Sox10<sup>+</sup> (3–6%), CAII<sup>+</sup> mature oligodendrocytes as quantified in the cerebral cortex and in the hypothalamus. These cells do not express the PDGFR $\alpha$  signal implicated in OPCs proliferation and in the inhibition of the expression of oligodendroglial maturation markers such as CC1 [18, 20]. Thus, these mature oligodendroglial cells constitute a source for delivering Shh to brain cells. Our experiments show that the C9C5 antibody recognizes ShhN in rodent brain extracts as previously reported [22, 23], and on postnatal mouse brain sections. These data are also in agreement with previous reports describing that C9C5 detects specifically Shh in ventral midbrain progenitor domains and in the diencephalic organizer zona limitans intrathalamica of mouse embryo [24, 25], and in adult mouse sensory neurons [26].

Interestingly, we also identify for the first time Shh mRNAs in Olig2<sup>+</sup> and Sox10<sup>+</sup> cells in the adult mouse brain using RNAscope which indicates that Shh is more widely expressed than originally reported [10, 14], and suggests novel physiological functions for this molecule. Thus, altogether, our data support that C9C5 recognizes Shh produced by a small population of mature oligodendrocytes. It is not the case for Shh from Purkinje cells of the cerebellar cortex [27, 28] reflecting possible difference in Shh post-translational modifications [1]. We cannot exclude that C9C5 may recognize another yet unknown protein showing SHHN homology, restricted to a subset of oligodendrocytes and which is not Desert Hedgehog or Indian Hedgehog that are not expressed in the rodent brain [2, 27].

Studies using other Shh antibodies [13, 14, 29] or reporter mouse lines [9, 14, 30] did not report Shh expression in oligodendroglial cells in normal adult mouse brain. However, a dynamic expression of Shh in PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup> and Olig2<sup>+</sup> oligodendrocyte progenitors occurs during remyelination [29]. This apparent discrepancy with our data may reflect different sensitivity of the reporters, of the mouse line constructs or of the antibodies used. For the latter, it may indicate different lipid modifications of ShhN [1] that might occur in oligodendrocyte precursor cells and mature oligodendrocytes.

Interestingly, the Shh signal labels the oligodendroglial cell body and decorates by intense puncta the processes extending at several cell diameters. Thus, Shh could be secreted to act locally on its receptor Ptc expressed by neighboring astrocytes and neurons. It is noteworthy that C9C5<sup>+</sup>CC1<sup>+</sup> cells are distributed in a grid-like manner with cells residing mostly in non-superposed domains. They constitute small Shh-expressing units that could distribute locally the protein in almost all brain regions and could represent a source for spreading Shh. Thus, our data suggest that besides neurons in the adult forebrain and cerebral cortex [9, 31] and in the cerebellar cortex [8], oligodendroglial cells are a potential source of Shh for signaling in astrocytes and neurons. The appearance of C9C5<sup>+</sup> and CC1<sup>+</sup> cells in the postnatal mouse brain overlaps the myelination peak that occurs between P10 and P20 [18] further arguing for a role of mature oligodendrocytes in postnatal Shh pathway regulation.



**Fig 6. C9C5 immunoreactivity in the mouse hypothalamus across life.** (A-F) Immunostaining with the C9C5 antibody on coronal sections of the hypothalamus at P4 (A) (n = 3), P10 (B) (n = 3), P20 (C) (n = 4), and at two (D) (n = 4), nine (E) (n = 3) and twelve (F) (n = 4) months. C9C5<sup>+</sup> cells are detected in hypothalamic nuclei at P10 until adulthood but not at P4. An age-associated decrease of C9C5<sup>+</sup> cells in the parenchyma but not in the median eminence (ME) was observed (D-F). Magnifications of white boxes show C9C5<sup>+</sup> cells with a stellate morphology, which were absent at P4 (A) and in twelve month-old animals (F). C9C5<sup>+</sup> cells are present in the ME at P4 (A). (G) Quantification of C9C5<sup>+</sup> cells across life (n = 3–4 per age). Means ± SEM. \* p < 0.05; \*\* p < 0.01; \*\*\* p < 0.001. Nuclei stained with DAPI. 3V, third ventricle; mo, months.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229362.g006>

**Table 1. Quantification of C9C5<sup>+</sup> cells in oligodendrocyte populations in the adult mouse brain.**

Marker	C9C5 <sup>+</sup> cells in oligodendrocyte population (%)	
	Hypothalamus	Cerebral cortex
PDGFRα	0	0*
Olig2	5 ± 1	6 ± 1
Sox10	4 ± 1	3 ± 1
CC1	12 ± 2	11 ± 2
CAII	0	0**

Data are from experiments presented in Figs 2 and 3 and S3 Fig and are means ± SEM from 3–4 mice.

\* One C9C5<sup>+</sup> cell / 364 PDGFRα<sup>+</sup> cells quantified

\*\* one C9C5<sup>+</sup> cell / 982 CAII<sup>+</sup> cells quantified.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229362.t001>

**Table 2. Analysis of Shh mRNA expression in Olig2- and Sox10-expressing cells in the adult mouse brain.**

Region	Shh <sup>+</sup> Olig2 <sup>+</sup> /Olig2 <sup>+</sup> (% cells)	Shh <sup>+</sup> Sox10 <sup>+</sup> /Sox10 <sup>+</sup> (% cells)
Hypothalamus	20.1 ± 3.1	32.3 ± 0.6
Cerebral cortex	12.0 ± 1.3	13.5 ± 0.9

Data are from RNAScope<sup>®</sup> experiments (means ± SEM, n = 3 mice)

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229362.t002>

Recently, an unsuspected oligodendrocyte heterogeneity has been reported by RNA sequencing of oligodendrocyte lineage cells both in the juvenile and adult mouse brain [32, 33]. Further studies of human brain from patients with multiple sclerosis or from spinal cord of mouse models of multiple sclerosis, revealed several clusters of oligodendroglial cells that could be further classified according to their gene expression pattern [34, 35]. It would be important to identify to which clusters C9C5<sup>+</sup>CC1<sup>+</sup> cells belong and to characterize their properties in CNS inflammation and during remyelination [36]. Thus, the oligodendroglial C9C5<sup>+</sup>Shh-associated signal should undoubtedly be taken into consideration when analyzing brain disorders associated to Shh signaling including brain tumors, neurodevelopmental disorders and neurodegenerative diseases [2].

### Supporting information

**S1 Fig. Western blot analysis of Shh protein with C9C5 with short and long exposure time.**

Twenty µg of RIPA solubilized samples from cerebellum (Cb) and hypothalamus (Hpt) and 1µg of mock or mShh transfected HEK293 homogenates were subjected to Western blot and immunodetection with C9C5 antibody (1/1000). Chemiluminescence was acquired with Chemidoc apparatus. The exposure time is indicated below. The 22 kDa (ShhN, filled arrowhead) and 47 kDa (uncleaved Shh; empty arrowhead) bands are indicated. A single band

corresponding to ShhN is detected in brain extracts after short and long time exposure, further supporting specificity of the C9C5 antibody.

(TIF)

**S2 Fig. Characterization of C9C5 immunoreactivity in the adult mouse cerebellum. (A-B)**

Immunostaining with C9C5 and CC1 antibodies on a coronal section of the cerebellum. (B) Magnification of red box indicates that Purkinje cell bodies (white arrowheads), and their projections in the molecular layer are not labeled by the C9C5 antibody. Magnification of white box highlights a C9C5 positive cell expressing the oligodendroglial marker CC1 (white arrow) within the granular cell layer. Staining was replicated on three mice Mol, molecular cell layer; Gr, granular cell layer; Px, Purkinje cells. Scale bar: A, 100  $\mu$ m. B, 50  $\mu$ m.

(TIF)

**S3 Fig. Characterization of C9C5<sup>+</sup> cells at different stages of the oligodendroglial lineage.**

(A-B) Immunostaining of coronal brain sections from an adult mouse of the hypothalamus at the level of the median eminence and of the dentate gyrus of the hippocampus with the C9C5 antibody (yellow) and the oligodendroglial markers (A) CC1 (green) and Sox10 (red) or (B) CAII (green) and PDGFR $\alpha$  (red). White boxes (A, B) highlight magnifications of the hypothalamic parenchyma and the granule cell layer of the dentate gyrus. (A) C9C5/CC1/Sox10 triple positive cells (white arrowhead) with stellate morphology are presented in merge and single channels with the nuclear marker DAPI. (B) C9C5<sup>+</sup> (white arrowhead), CAII<sup>+</sup> (orange arrow), PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup> (white arrow) cells are presented in merge and single channels with the nuclear marker DAPI. Note that C9C5 positive cells are CAII and PDGFR $\alpha$  negative. Staining was replicated on three mice. Hpt, hypothalamus; DG, dentate gyrus of the hippocampus.

(TIF)

**S1 Raw images.**

(PDF)

## Author Contributions

**Conceptualization:** Martial Ruat.

**Data curation:** Linda Tirou, Mariagiovanna Russo, Helene Faure, Giuliana Pellegrino, Ariane Sharif.

**Formal analysis:** Linda Tirou, Mariagiovanna Russo, Helene Faure, Giuliana Pellegrino, Ariane Sharif.

**Methodology:** Martial Ruat.

**Supervision:** Martial Ruat.

**Writing – original draft:** Martial Ruat.

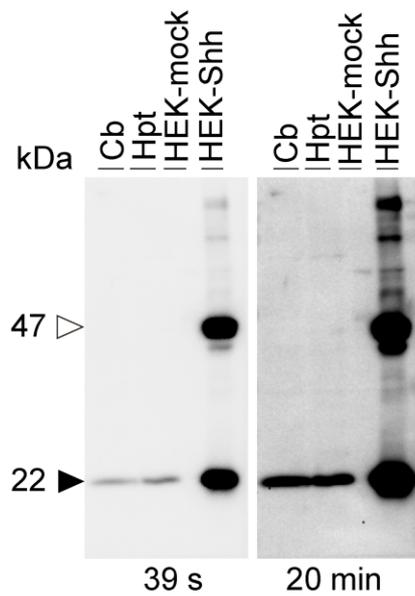
## References

1. Briscoe J, Thérond PP. The mechanisms of Hedgehog signalling and its roles in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013; 14(7):416–29. <https://doi.org/10.1038/nrm3598> PMID: 23719536.
2. Ruat M, Faure H, Daynac M. Smoothened, stem cell maintenance and brain diseases. *Top Med Chem* 2015; 16:147–71. [https://doi.org/10.1007/7355\\_2014\\_83](https://doi.org/10.1007/7355_2014_83)
3. Garcia ADR, Han YG, Triplett JW, Farmer WT, Harwell CC, Ihrie RA. The elegance of Sonic hedgehog: emerging novel functions for a classic morphogen. *J Neurosci.* 2018; 38(44):9338–45. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1662-18.2018> PMID: 30381425.

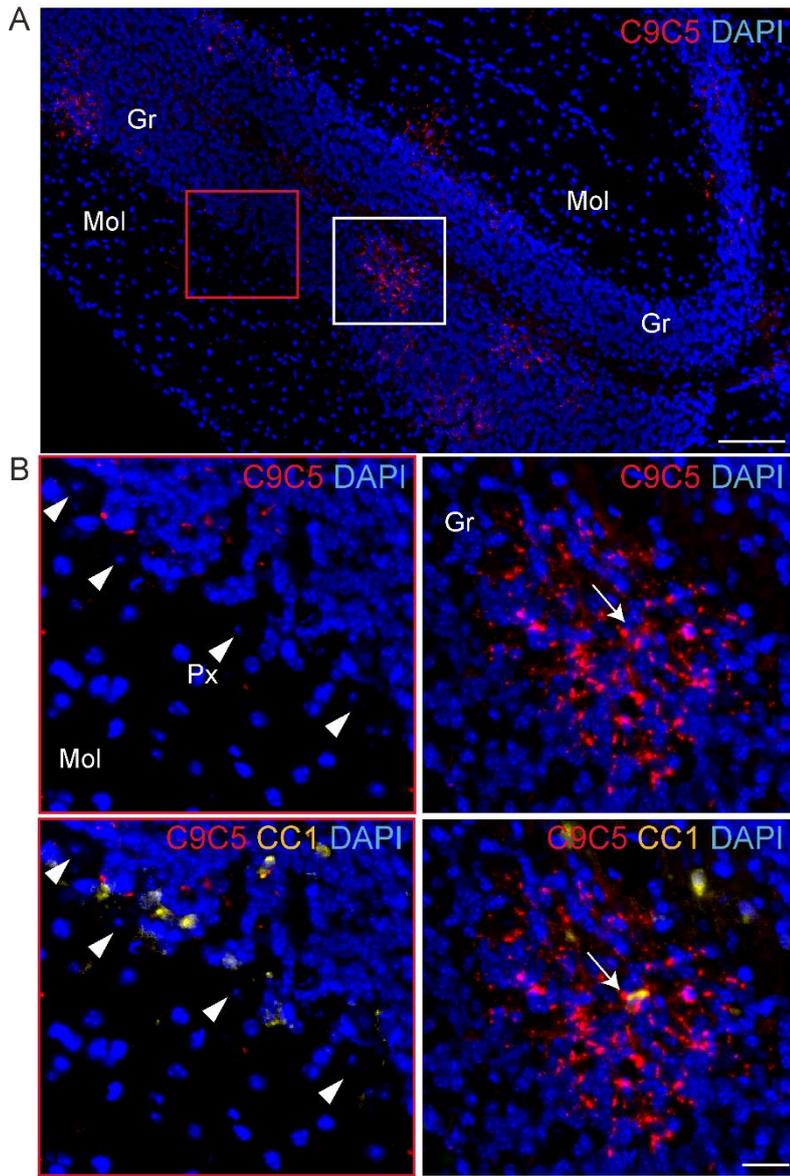
4. Ruat M, Hoch L, Faure H, Rognan D. Targeting of Smoothed for therapeutic gain. *Trends Pharmacol Sci.* 2014; 35(5):237–46. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2014.03.002> PMID: 24703627.
5. Allahyari RV, Clark KL, Shepard KA, Garcia ADR. Sonic hedgehog signaling is negatively regulated in reactive astrocytes after forebrain stab injury. *Scientific reports.* 2019; 9(1):565. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37555-x> PMID: 30679745.
6. Bezard E, Baufretton J, Owens G, Crossman AR, Dudek H, Taupignon A, et al. Sonic hedgehog is a neuromodulator in the adult subthalamic nucleus. *Faseb J.* 2003; 17(15):2337–8. <https://doi.org/10.1096/fj.03-0291fje> PMID: 14525941.
7. Pascual O, Traiffort E, Baker DP, Galdes A, Ruat M, Champagnat J. Sonic hedgehog signalling in neurons of adult ventrolateral nucleus tractus solitarius. *Eur J Neurosci.* 2005; 22(2):389–96. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04223.x> PMID: 16045492.
8. Farmer WT, Abrahamsson T, Chierzi S, Lui C, Zaelzer C, Jones EV, et al. Neurons diversify astrocytes in the adult brain through sonic hedgehog signaling. *Science.* 2016; 351(6275):849–54. <https://doi.org/10.1126/science.aab3103> PMID: 26912893.
9. Garcia AD, Petrova R, Eng L, Joyner AL. Sonic hedgehog regulates discrete populations of astrocytes in the adult mouse forebrain. *J Neurosci.* 2010; 30(41):13597–608. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0830-10.2010> PMID: 20943901.
10. Traiffort E, Moya KL, 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(5):839–50. <https://doi.org/10.1046/j.0953-816x.2001.01708.x> PMID: 11576188.
11. Charytoniuk D, Porcel B, Rodriguez Gomez J, Faure H, Ruat M, Traiffort E. Sonic Hedgehog signalling in the developing and adult brain. *J Physiol Paris.* 2002; 96(1–2):9–16. [https://doi.org/10.1016/s0928-4257\(01\)00075-4](https://doi.org/10.1016/s0928-4257(01)00075-4) PMID: 11755778.
12. Lai K, Kaspar BK, Gage FH, Schaffer DV. Sonic hedgehog regulates adult neural progenitor proliferation in vitro and in vivo. *Nat Neurosci.* 2003; 6(1):21–7. <https://doi.org/10.1038/nn983> PMID: 12469128.
13. Machold R, Hayashi S, Rutlin M, Muzumdar MD, Nery S, Corbin JG, et al. Sonic hedgehog is required for progenitor cell maintenance in telencephalic stem cell niches. *Neuron.* 2003; 39(6):937–50. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(03\)00561-0](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(03)00561-0) PMID: 12971894.
14. Ihrie RA, Shah JK, Harwell CC, Levine JH, Guinto CD, Lezameta M, et al. Persistent sonic hedgehog signaling in adult brain determines neural stem cell positional identity. *Neuron.* 2011; 71(2):250–62. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.05.018> PMID: 21791285.
15. Gonzalez-Reyes LE, Chiang CC, Zhang M, Johnson J, Arrillaga-Tamez M, Couturier NH, et al. Sonic Hedgehog is expressed by hilar mossy cells and regulates cellular survival and neurogenesis in the adult hippocampus. *Scientific reports.* 2019; 9(1):17402. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53192-4> PMID: 31758070.
16. Angot E, Loulier K, Nguyen-Ba-Charvet KT, Gadeau AP, Ruat M, Traiffort E. Chemoattractive activity of sonic hedgehog in the adult subventricular zone modulates the number of neural precursors reaching the olfactory bulb. *Stem Cells.* 2008; 26(9):2311–20. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2008-0297> PMID: 18617686.
17. Daynac M, Tirou L, Faure H, Mouthon MA, Gauthier LR, Hahn H, et al. Hedgehog Controls Quiescence and Activation of Neural Stem Cells in the Adult Ventricular-Subventricular Zone. *Stem Cell Reports.* 2016; 7(4):735–48. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2016.08.016> PMID: 27666792.
18. Laouarem Y, Traiffort E. Developmental and repairing production of myelin: the role of Hedgehog signaling. *Front Cell Neurosci.* 2018; 12:305. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00305> PMID: 30237763.
19. Ferent J, Cochard L, Faure H, Taddei M, Hahn H, Ruat M, et al. Genetic activation of hedgehog signaling unbalances the rate of neural stem cell renewal by increasing symmetric divisions. *Stem Cell Reports.* 2014; 3(2):312–23. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2014.05.016> PMID: 25254344.
20. Dang TC, Ishii Y, Nguyen V, Yamamoto S, Hamashima T, Okuno N, et al. Powerful Homeostatic Control of Oligodendroglial Lineage by PDGFRalpha in Adult Brain. *Cell reports.* 2019; 27(4):1073–89 e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.03.084> PMID: 31018125.
21. Matsusue Y, Horii-Hayashi N, Kirita T, Nishi M. Distribution of corticosteroid receptors in mature oligodendrocytes and oligodendrocyte progenitors of the adult mouse brain. *J Histochem Cytochem.* 2014; 62(3):211–26. <https://doi.org/10.1369/0022155413517700> PMID: 24309510.
22. Eitan E, Petralia RS, Wang YX, Indig FE, Mattson MP, Yao PJ. Probing extracellular Sonic hedgehog in neurons. *Biol Open.* 2016; 5(8):1086–92. <https://doi.org/10.1242/bio.019422> PMID: 27387534.
23. Rivell A, Petralia RS, Wang YX, Clawson E, Moehl K, Mattson MP, et al. Sonic hedgehog expression in the postnatal brain. *Biol Open.* 2019; 8(3). <https://doi.org/10.1242/bio.040592> PMID: 30837226.

24. Tang M, Villaescusa JC, Luo SX, Guitarte C, Lei S, Miyamoto Y, et al. Interactions of Wnt/beta-catenin signaling and sonic hedgehog regulate the neurogenesis of ventral midbrain dopamine neurons. *J Neurosci*. 2010; 30(27):9280–91. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0860-10.2010> PMID: 20610763.
25. Andreu-Cervera A, Anselme I, Karam A, Laclef C, Catala M, Schneider-Maunoury S. The ciliopathy gene *Ftm/Rpgrip11* controls mouse forebrain patterning via region-specific modulation of Hedgehog/Gli signaling. *J Neurosci*. 2019; 39(13):2398–415. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2199-18.2019> PMID: 30692221.
26. Lu WJ, Mann RK, Nguyen A, Bi T, Silverstein M, Tang JY, et al. Neuronal delivery of Hedgehog directs spatial patterning of taste organ regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017; 115(2):E200–E9. <https://doi.org/10.1073/pnas.1719109115> PMID: 29279401.
27. Traiffort E, Charytoniuk DA, Faure H, Ruat M. Regional distribution of sonic hedgehog, patched, and smoothened mRNA in the adult rat brain. *J Neurochem*. 1998; 70(3):1327–30. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1998.70031327.x> PMID: 9489757
28. Wallace VA. Purkinje-cell-derived Sonic hedgehog regulates granule neuron precursor cell proliferation in the developing mouse cerebellum. *Curr Biol*. 1999; 9(8):445–8. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(99\)80195-x](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(99)80195-x) PMID: 10226030
29. Ferent J, Zimmer C, Durbec P, Ruat M, Traiffort E. Sonic Hedgehog Signaling Is a Positive Oligodendrocyte Regulator during Demyelination. *J Neurosci*. 2013; 33(5):1759–72. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3334-12.2013> PMID: 23365216.
30. Sanchez MA, Sullivan GM, Armstrong RC. Genetic detection of Sonic hedgehog (Shh) expression and cellular response in the progression of acute through chronic demyelination and remyelination. *Neurobiol Dis*. 2018; 115:145–56. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2018.04.003> PMID: 29627579.
31. Hill SA, Blaeser AS, Coley AA, Xie Y, Shepard KA, Harwell CC, et al. Sonic hedgehog signaling in astrocytes mediates cell-type-specific synaptic organization. *Elife*. 2019; 8. <https://doi.org/10.7554/eLife.45545> PMID: 31194676.
32. Marques S, Zeisel A, Codeluppi S, van Bruggen D, Mendanha Falcao A, Xiao L, et al. Oligodendrocyte heterogeneity in the mouse juvenile and adult central nervous system. *Science*. 2016; 352(6291):1326–9. <https://doi.org/10.1126/science.aaf6463> PMID: 27284195.
33. Chen R, Wu X, Jiang L, Zhang Y. Single-Cell RNA-Seq Reveals Hypothalamic Cell Diversity. *Cell reports*. 2017; 18(13):3227–41. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.03.004> PMID: 28355573.
34. Falcao AM, van Bruggen D, Marques S, Meijer M, Jakel S, Agirre E, et al. Disease-specific oligodendrocyte lineage cells arise in multiple sclerosis. *Nat Med*. 2018; 24(12):1837–44. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0236-y> PMID: 30420755.
35. Jakel S, Agirre E, Mendanha Falcao A, van Bruggen D, Lee KW, Knuesel I, et al. Altered human oligodendrocyte heterogeneity in multiple sclerosis. *Nature*. 2019; 566(7745):543–7. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-0903-2> PMID: 30747918.
36. Niu J, Tsai HH, Hoi KK, Huang N, Yu G, Kim K, et al. Aberrant oligodendroglial-vascular interactions disrupt the blood-brain barrier, triggering CNS inflammation. *Nat Neurosci*. 2019; 22(5):709–18. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0369-4> PMID: 30988524.

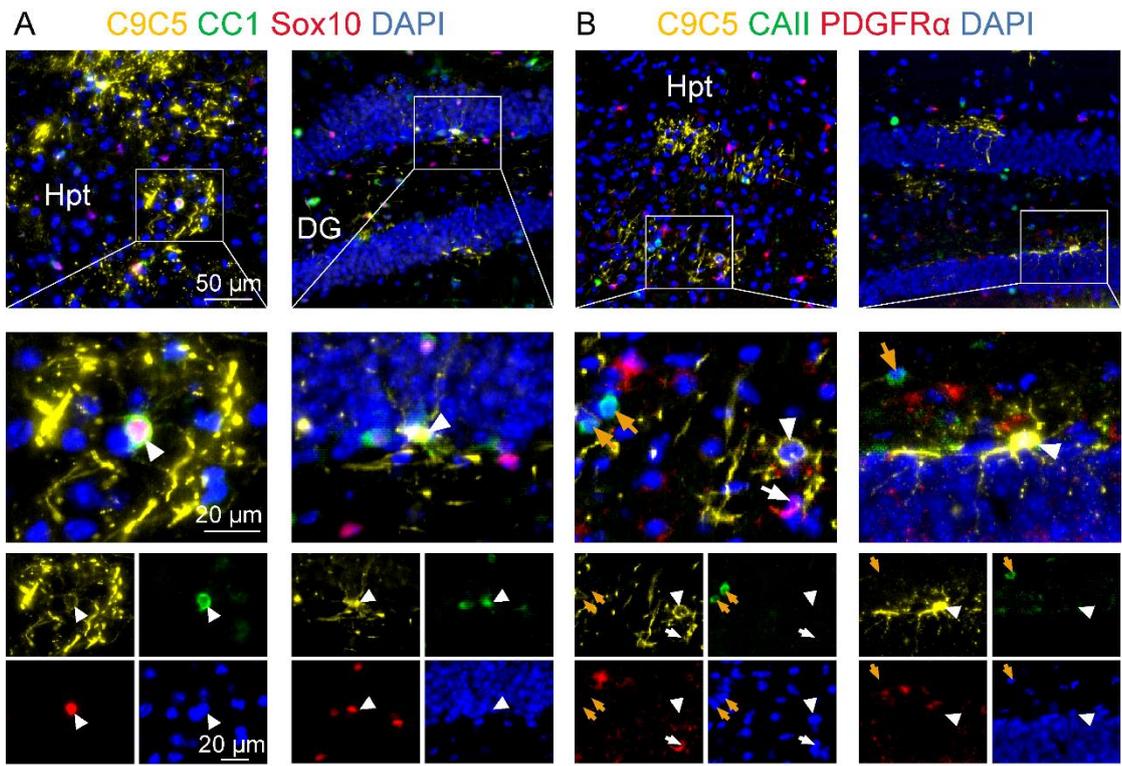
S1 Fig



**Western blot analysis of Shh protein with C9C5 with short and long exposure time.** 20  $\mu$ g of RIPA solubilized samples from cerebellum (Cb) and hypothalamus (Hpt) and 1  $\mu$ g of mock or mShh transfected HEK293 homogenates were subjected to Western blot and immunodetection with C9C5 antibody (1/1000). Signal was revealed with ECL-plus and acquired with Chemidoc apparatus. The exposure time is indicated below each picture. The 22 kDa (ShhN, filled arrowhead) and 47 kDa bands (uncleaved Shh; empty arrowhead) are indicated. A single band corresponding to ShhN molecular weight is detected in brain extracts after short and long time exposure supporting specificity of the C9C5 antibody.



S2 Fig



S3 Fig

**Article 3, Tirou *et al*, soumission prévue à *Molecular Metabolism***

**Linda Tirou**, Mariagiovanna Russo, Hélène Faure, Giuliana Pellegrino, Clement Demongin, Mathieu Daynac, Ariane Sharif, Jérémy Amosse, Soazig Lelay, Raphael Denis, Serge Luquet, Mohammed Taouis, Yacir Benomar and Martial Ruat. Astrocytic Patched deficiency impairs systemic glucose metabolism. Soumission prévue à *Molecular Metabolism*.

## Résumé

La voie de signalisation Sonic Hedgehog (Shh) est active dans le cerveau de rongeur adulte où elle assure divers rôles notamment dans le maintien des cellules souches neurales. La liaison du ligand Shh sur son récepteur Patched (Ptc) lève la répression qu'exerce ce dernier sur le récepteur Smoothed (Smo). L'activation de Smo entraîne une cascade d'évènements cytoplasmiques aboutissant à la transcription des gènes cibles de la voie Shh dont les facteurs Gli1-3. Cette suite d'évènements constitue la signalisation Shh dite « canonique ». D'autres voies Shh « non canoniques » existent également, elles ont la particularité de ne pas induire la transcription des facteurs Gli. Bien que l'expression de transcrits de la voie Shh ait été rapportée dans l'hypothalamus, son rôle dans cette structure n'est pas connu. L'hypothalamus est composé de plusieurs noyaux participant à la régulation de l'homéostasie énergétique dont le noyau arqué comprenant des neurones orexigéniques NPY et anorexigéniques POMC régulant la prise alimentaire et la dépense énergétique. Ces cellules collaborent avec des noyaux intra- et extra-hypothalamiques pour moduler l'activité d'organes périphériques via le système nerveux autonome. Les astrocytes hypothalamiques peuvent être informés de l'état métabolique via les récepteurs aux hormones qu'ils expriment et seraient ainsi également impliqués dans le contrôle de l'homéostasie énergétique. La présence de la voie Shh dans les astrocytes hypothalamiques et son rôle dans les fonctions métaboliques reste à déterminer.

A l'aide d'un anticorps développé par notre équipe (167Ab) et un anticorps commercial (N19) ciblant Shh, nous avons identifié la présence de la forme biologiquement active du ligand et de son précurseur dans l'hypothalamus de souris adulte. L'utilisation de smFISH (single-molecule fluorescent *in situ* hybridization), une technique à haute sensibilité permettant de détecter chaque molécule d'ARN d'un gène donné, a révélé l'expression de Ptc dans des astrocytes GFAP<sup>+</sup> et S100β<sup>+</sup> et des neurones HuC/D<sup>+</sup>. A l'inverse, les transcrits de Gli1-3 sont principalement présents dans les astrocytes.

Nous avons ensuite utilisé la lignée de souris transgéniques Glast-Cre<sup>ERT2</sup>-YFP-Ptc<sup>-/-</sup> (YFP-Ptc<sup>-/-</sup>), modèle d'activation conditionnelle de la voie Shh, basée sur la délétion du régulateur négatif Ptc et l'expression du

rapporteur YFP, dans les cellules  $Glast^+$  pour étudier le rôle de la voie Shh dans les astrocytes (Daynac et al., 2016b; Ferent et al., 2014). Les souris  $Glast-Cre^{ERT2}-YFP-Ptc^{+/+}$  ( $YFP-Ptc^{+/+}$ ), produites en parallèle et utilisées comme contrôles dans notre étude, présentent des cellules  $Glast^+$  non délétées pour Ptc mais exprimant la protéine YFP.

Nous avons comparé l'effet de la délétion de Ptc dans les astrocytes de deux régions cérébrales, le cortex et l'hypothalamus, chez ces souris après traitement au tamoxifène à l'âge de 8 semaines. L'analyse par smFISH révèle que le signal Gli1 est plus élevé dans l'hypothalamus que dans le cortex chez les animaux contrôles. La mesure des niveaux d'expression de Gli1-3, gènes cibles de la voie Shh, révèle une augmentation des transcrits de Gli1 dans le cortex et l'hypothalamus des animaux  $YFP-Ptc^{-/-}$ , 4 semaines post-tamoxifène. L'analyse par smFISH démontre que le nombre d'astrocytes exprimant des transcrits de Gli1 est augmenté dans le cortex des animaux  $YFP-Ptc^{-/-}$  tandis que les astrocytes  $Gli3^+$  sont réduits. Dans l'hypothalamus, la délétion de Ptc n'affecte pas le nombre d'astrocytes  $Gli1^+$ . Cependant une augmentation des astrocytes exprimant Gli3 est observée dans le noyau arqué et le noyau dorsomédial. Le signal pour Gli2 n'est pas affecté dans ces structures. Ces résultats suggèrent une variabilité de l'état d'activation de la voie Shh dans différentes régions du cerveau avec une activation plus importante de la voie Shh dans l'hypothalamus en situation physiologique. Cette analyse révèle également l'activation de la voie Shh canonique dans les astrocytes  $Glast^+$  suite à la délétion de Ptc et la stimulation d'une voie médiée par Gli3 dans des astrocytes nouvellement recrutés.

Le suivi du poids des souris  $YFP-Ptc^{-/-}$  et contrôles a mis en avant une absence de gain de poids chez les animaux délétés et nous a conduit à examiner, plus en détail, les paramètres métaboliques de ces souris. Nous avons ainsi démontré une réduction importante des tissus adipeux, 32 semaines après induction de la délétion. L'examen des tissus adipeux de ces souris a également mis en évidence un rétrécissement de la taille des adipocytes chez les souris  $YFP-Ptc^{-/-}$ . Ces effets s'accompagnent de niveaux faibles de leptine, hormone synthétisée par cet organe. Les niveaux de glucose, insuline et NEFA (non-esterified fatty acids) sont également fortement diminués chez les souris  $YFP-Ptc^{-/-}$  et similaires à ceux observés chez des animaux plus jeunes. L'insuline était déjà inférieure chez les souris délétées en comparaison aux contrôles, 4 semaines après

traitement au tamoxifène.

Afin de comprendre les mécanismes de cette différence de poids, nous avons mesuré divers paramètres métaboliques des souris YFP-Ptc<sup>+/+</sup> et YFP-Ptc<sup>-/-</sup> en cage métabolique. Cet examen a révélé une prise alimentaire, une dépense énergétique et une activité locomotrice similaires. Le ratio d'échange respiratoire est, cependant, significativement inférieur en journée chez les souris YFP-Ptc<sup>-/-</sup> par rapport aux animaux contrôles, indiquant une consommation préférentielle des lipides suite à la délétion de Ptc. En accord avec ces résultats, nous avons détecté une oxydation supérieure des acides gras chez les souris délétées en journée.

Nous avons ensuite analysé la réponse des souris lors de tests de tolérance au glucose (GTT) et à l'insuline (ITT), au cours desquels les niveaux de glucose sont mesurés suite à l'injection de glucose ou insuline chez des souris ayant été mises à jeun. L'injection de glucose entraîne une augmentation des niveaux sanguins de glucose chez les deux groupes de souris, 4 semaines post-tamoxifène. Cependant, les souris YFP-Ptc<sup>-/-</sup> parviennent plus rapidement à revenir à des niveaux homéostatiques de glucose. Cette différence est conservée au cours du temps et devient même plus marquée chez l'animal âgé (32 semaines post-tamoxifène) en raison de l'incapacité des souris contrôles à retourner à un niveau basal de glucose au cours de GTT et ITT.

Par la suite, nous nous sommes intéressés aux effets de la délétion astrocytaire de Ptc dans le cadre d'un régime riche en lipides, condition entraînant une prise de poids et un dysfonctionnement métabolique similaires à ceux observés chez l'animal âgé. Les souris YFP-Ptc<sup>-/-</sup> et contrôles ont ainsi été soumises à une alimentation riche en graisses pendant onze semaines. Le suivi du poids au cours de cette période révèle que seules les souris YFP-Ptc<sup>+/+</sup> présentent une prise de poids continue tandis que les souris délétées maintiennent une valeur constante de leur poids. De même, nous avons observé une masse moins importante de tissus adipeux chez les souris YFP-Ptc<sup>-/-</sup> en comparaison des souris contrôles. Il est à noter que les autres organes n'ont pas été affectés à l'exception du foie qui présente une coloration différente. Enfin, l'examen des réponses aux GTT, avant et après l'administration du régime, démontre une réponse altérée chez les souris contrôles qui

ne parviennent plus à revenir à leur niveau basal suite à l'injection de glucose. A l'inverse, les souris YFP-Ptc<sup>-/-</sup> présentent une réponse similaire aux deux temps et plus rapide que celle des souris YFP-Ptc<sup>+/+</sup>.

Pour déterminer les mécanismes responsables des altérations métaboliques présentes chez les animaux YFP-Ptc<sup>-/-</sup>, nous avons mesuré par qPCR les niveaux de transcrits associés à plusieurs voies de signalisation dont celles de l'insuline et de l'inflammation, mais aussi à des transporteurs. Cette analyse a mis en avant, chez la souris YFP-Ptc<sup>-/-</sup> 4 semaines post-tamoxifène, une expression supérieure du récepteur de l'insuline et de LKB1, modulateur positif de la voie de l'insuline, tandis que des régulateurs négatifs de cette signalisation, SOCS3 et TLR4, sont réduits bien que de façon non significative. Ces différences ne sont pas retrouvées chez l'animal âgé (32 semaines post-tamoxifène) où d'autres modifications apparaissent, notamment l'augmentation de l'expression du transporteur de glucose GLUT4. D'autres transporteurs au glucose GLUT1 et glutamate GLAST, ne sont pas affectés. Une autre altération ayant uniquement lieu chez l'animal âgé, est l'augmentation de l'expression de NPY et la diminution des niveaux de POMC. L'expression des gènes associés à la voie de l'inflammation est très peu touchée par la délétion de Ptc, seule une réduction significative de CD11b est visible, 32 semaines après induction de la recombinaison.

Nous avons, ensuite, analysé l'effet de la délétion astrocytaire de Ptc sur la capacité de ces cellules gliales à répondre aux variations de glucose dans le milieu. La mise en culture d'astrocytes issus de nouveau-nés murins Ptc<sup>f/f</sup> a permis d'induire la délétion de Ptc dans ces cellules via l'apport de Cre-recombinase par adénovirus. Nous avons également mis au point une technique de mesure *in vitro* de l'entrée de glucose dans les astrocytes via l'utilisation d'un dérivé tritié non métabolisable de ce substrat, le [<sup>3</sup>H]2D-glucose. Cette analyse a révélé que la délétion de Ptc n'affectait pas l'entrée de glucose au sein des astrocytes. Pour compléter cette étude, nous avons mesuré l'entrée de glucose au sein de cellules mésenchymateuses MEFs délétées pour Smo ou Ptc. La perte de Smo entraîne une diminution de l'expression de Gli1 au sein de ces MEFs tandis qu'une augmentation est observée lors de la délétion de Ptc. Cependant, ces modifications n'affectent pas l'entrée de glucose dans ces cellules.

L'ensemble de ces résultats met en avant la capacité de la voie Shh astrocytaire à moduler l'homéostasie énergétique. Un grand nombre d'astrocytes hypothalamiques expriment les éléments nécessaires (Ptc, Gli1-3) pour répondre au signal Shh. La délétion de Ptc dans les astrocytes  $\text{Glast}^+$  permet de prévenir les altérations métaboliques se développant habituellement avec l'âge ou induites par la consommation d'un régime riche en graisses (prise de poids, modifications des niveaux d'hormones et résistance à l'insuline). Plusieurs mécanismes se mettent en place suite à la délétion astrocytaire de Ptc pour induire le phénotype métabolique, dont la modification du profil d'utilisation des substrats, l'expression plus élevée du récepteur à l'insuline et la diminution des niveaux d'insuline. La réduction des tissus adipeux chez les souris  $\text{YFP-Ptc}^{-/-}$  pourrait ainsi être induite par l'augmentation de l'oxydation des acides gras tandis que les niveaux inférieurs d'insuline chez ces souris suggèrent une modification de la sécrétion ou production d'insuline par le pancréas. D'autre part, l'expression augmentée du récepteur à l'insuline dans l'hypothalamus des souris  $\text{YFP-Ptc}^{-/-}$  jeunes pourrait refléter une activation plus importante de la voie de l'insuline et expliquer la réponse plus rapide aux variations de glucose. Ces effets sont associés à une activation de la voie Shh dans l'hypothalamus et une augmentation du nombre d'astrocytes  $\text{Gli3}^+$  dans le noyau arqué et dorsomédial suggérant la possibilité d'une voie Shh non canonique. L'absence d'effet de la délétion de Ptc sur l'entrée de glucose dans les astrocytes indique que le phénotype métabolique des souris  $\text{YFP-Ptc}^{-/-}$  passe par la modification d'un autre processus. Ainsi la délétion de Ptc dans les astrocytes  $\text{Glast}^+$  pourrait conduire à l'activation d'une voie Shh impliquant Gli3 qui pourrait modifier la libération, par les astrocytes, d'un facteur intervenant dans la régulation de neurones hypothalamiques participant au contrôle de l'activité d'organes périphériques (oxydation des acides gras dans les tissus adipeux, production d'insuline dans le pancréas et entrée de glucose dans les tissus). La voie Shh astrocytaire hypothalamique se présente ainsi comme une cible thérapeutique potentielle dans le cadre de dysfonctionnements métaboliques tels que l'obésité.

## **Astrocytic Patched deficiency impairs systemic glucose metabolism**

**Authors:** Linda Tirou<sup>1</sup>, Mariagiovanna Russo<sup>1</sup>, Helene Faure<sup>1</sup>, Giuliana Pellegrino<sup>1</sup>, Clement Demongin<sup>1</sup>, Mathieu Daynac<sup>1</sup>, Ariane Sharif<sup>2</sup>, Yacir Benomar<sup>3</sup>, Mohammed Taouis<sup>3</sup>, Jeremy Amosse<sup>4</sup>, Soazig Lelay<sup>4</sup>, Raphaël Denis<sup>5</sup>, Serge Luquet<sup>5</sup> and Martial Ruat<sup>1\*</sup>

### **Affiliations:**

<sup>1</sup> CNRS, University Paris-Saclay, UMR-9197, Neuroscience Paris-Saclay Institute, 1 Avenue de la Terrasse, F-91198, Gif-sur-Yvette, France

<sup>2</sup> Inserm, Jean-Pierre Aubert Research Center, UMR-S 1172, Development and Plasticity of the Neuroendocrine Brain, University of Lille, School of Medicine, Lille Cedex, France.

<sup>3</sup> CNRS, University Paris-Saclay, UMR 9197, Neuroscience Paris-Saclay Institute, Molecular Neuroendocrinology of Food Intake, Orsay, France.

<sup>4</sup> INSERM U1063, Oxidative Stress and Metabolic Pathologies, Angers University, Rue des Capucins, F-49100 Angers France.

<sup>5</sup> Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Unité BFA, CNRS, UMR 8251, Paris, France.

**\*Correspondence:** Martial Ruat, CNRS, UMR-9197, Neuroscience Paris-Saclay Institute, 1 Avenue de la Terrasse, F-91198, Gif-sur-Yvette, France. Tel: 33 1 69 82 36 41; e-mail: ruat@inaf.cnrs-gif.fr

## ABSTRACT

**Objective:** Astrocytes are glial cells proposed as the main Sonic Hedgehog (Shh)-responsive cells in the adult brain. Their roles in mediating Shh functions are still poorly understood. In the hypothalamus, they support neuronal circuits implicated in the regulation of energy metabolism. Here, we investigated the impact of genetic activation of Shh signaling on hypothalamic astrocytes and characterized its effects on energy metabolism.

**Methods:** We first analyzed the distribution of gene transcripts of the Shh pathway (*Ptc*, *Gli1*, *Gli2*, *Gli3*) in astrocytes using single molecule fluorescence *in situ* hybridization combined to immunohistofluorescence and of Shh peptides by western blotting in mouse hypothalamus. We metabolically phenotyped *Glast-Cre<sup>ERT2</sup>-YFP-Ptc<sup>-/-</sup>* (*YFP-Ptc<sup>-/-</sup>*) mice and their control littermates over time and under high-fat-diet to investigate the potential effects of conditionnal astrocytic deletion of the Shh receptor Patched (*Ptc*) on systemic glucose metabolism. Molecular and biochemical assays were used to analyze the alteration of pathways implicated in energy metabolism, inflammation or glucose and insulin transports. Primary astrocyte cultures were used to evaluate a potential role of Shh signaling in glucose transport.

**Results :** Shh peptides were the highest in the hypothalamic extracts of adult mice and a large population of astrocytes expressed *Ptc* and *Gli1-3* mRNAs in the hypothalamus. Characterization of Shh signaling after conditional *Ptc* deletion in *YFP-Ptc<sup>-/-</sup>* mice revealed heterogeneity in hypothalamic astrocyte populations. The activation of Shh signaling in *Glast<sup>+</sup>* astrocytes was associated to a higher sensitivity to glucose assessed by glucose and insulin tolerance tests. This effect was maintained over time and associated to lower blood insulin levels. *YFP-Ptc<sup>-/-</sup>* mice exhibited a strong lean phenotype related to the absence of body weight gain. They presented a reduction of white and brown adipose tissues accompanied by an increase of fatty acid oxidation evaluated in metabolic cage, while food intake, locomotor activity and body temperature were not altered. At the cellular level, *Ptc* deletion did not affect

glucose uptake in primary astrocyte cultures. In the hypothalamus, the activation of astrocytic Shh pathway led to an increase of insulin signaling genes expression.

**Conclusions :** We define hypothalamic Shh action on astrocytes as a novel master regulator of energy metabolism. Thus, in the hypothalamus, Shh signaling in astrocytes appears to have a central role in counteracting metabolic defects observed during aging and obesity.

**KEYWORDS:** Hypothalamus, Astrocyte, Glucose, Aging, Obesity, Hedgehog

## 1 Introduction

In the mature central nervous system (CNS), the Sonic Hedgehog (Shh) signaling pathway is associated to stem cell maintenance in the main neurogenic niches and to brain repair. Shh signaling is also responsible for shaping neuronal and glial circuit plasticity. The Shh protein is thus involved in the communication between neurons and glial cells [1; 2]. The astrocytes have been identified as the main cells that respond to Shh in the CNS [3]. Astrocytic Shh signaling observed after brain injury promotes neuroprotection [4] whereas activation of the pathway in these cells may be responsible for a decrease of neuronal activity [5; 6] and for keeping their physiology in the cerebellum [7]. Astrocytes also promote the growth of brain tumor [8]. The amino-terminal active fragment of Shh (ShhN), which results from the cleavage of a Shh precursor, is widely distributed in the adult brain regions of rodent. Shh is proposed to be secreted or axonally transported by various populations of neurons, including GABAergic, cholinergic and cerebro-cortical neurons [1 ; 2]. Recently, a subpopulation of mature oligodendroglial cells have also been described as a potential source of the protein for astrocytes and neurons [9]. In the brain, the Shh ligand and its associated signaling pathway have been proposed to be of interest for palliating some physiological defects associated to neurodegenerative diseases such as Parkinson disease [10] and for remyelination, by regulating adult born brain progenitors to provide new oligodendrocytes [11; 12].

Activation of Shh signaling requires the binding of the Shh ligand to its receptor Patched (Ptc). This effect will de-repress the constitutive inhibition exerted by Ptc on Smoothed (Smo), a G-protein coupled receptor, and lead to a complex modulation of the zinc finger transcription factors glioma-associated oncogenes 1-3 (Gli1, Gli2, Gli3). Activation of canonical Shh signaling leads to the upregulation of target genes including *Gli1* and *Ptc* [13; 14]. However, several non-canonical mechanisms of Shh signaling, not associated to an increase of *Gli1* transcription and often depending on nontranscriptional events, have been

reported in neural tissues, both during development and in the adulthood [5; 6; 15-20]. Other non-canonical mechanisms of Shh signaling such as insulin independent glucose uptake or anti-adipogenic effects that are AMPK-dependent still have to be characterized in neural cells [21; 22]. Of interest, one of the main role of astrocytes is to provide metabolic support to brain cells. Hypothalamic astrocytes, through insulin signaling, are involved in glucose transport from blood into the brain and are responsible for POMC neurons activation implicated in a tight regulation of systemic glucose metabolism [23-25]. In the hypothalamus, the distribution of cells expressing Shh and its receptor Ptc [26; 27] and the transcription factors Gli1-Gli3 [3] have been reported in rat and mouse, respectively. However, a detailed analysis of their distribution as well as the potential role of Shh signaling in the hypothalamus and in the control of energy metabolism has not been investigated yet.

Here, we combine *in vitro* and *in vivo* analysis of genetic activation of Shh signaling to study its potential roles in hypothalamic astrocytes. Characterization and quantification of conditional Ptc invalidation in Glast<sup>+</sup> astrocytes revealed heterogeneity in the astrocyte population in hypothalamic nuclei. We report, for the first time, an effect of Shh signaling in astrocytes implicated in the regulation of whole body energy homeostasis. Interestingly, fasted mutant animals with Ptc specific deletion in Glast cells, displayed an increased sensitivity to glucose and decreased blood insulin levels. They also exhibited a strong lean phenotype over time characterized by a dramatic decrease in white (WAT) and brown (BAT) adipose tissues, accompanied by an increase of fatty acid oxidation. Of interest, astrocytic Shh signaling enabled the counteraction of age-associated and diet-induced metabolic alterations. Ptc deletion did not affect glucose uptake in primary astrocyte cultures, suggesting that Ptc is not involved in glucose transport in these cells. Activation of the astrocytic Shh pathway was associated to an increase of insulin signaling gene expression. Thus, we report an unsuspected novel role of Shh

signaling in astrocytes for hypothalamic regulation of energy metabolism in the adult rodent brain.

## 2. Materials and Methods

### 1.1 Animal procedures

C57BL6/J were purchased from Janvier Labs (France). *Glast-Cre<sup>ERT2</sup>;Ptc<sup>fl/fl</sup>;R26R-YFP* (called *YFP-Ptc<sup>-/-</sup>* after recombination) and *Ptc<sup>fl/fl</sup>;R26R-YFP* offsprings were generated as described [28]. Adult male mice were used except when stated. Animals were group-housed, maintained in 12 h light/12 h dark cycle with food and water ad libitum and were individually caged for metabolic experiments. To generate diet-induced-obesity (DIO) mouse models, *YFP-Ptc<sup>+/+</sup>* and *YFP-Ptc<sup>-/-</sup>* mice were placed on high fat diet (HFD; #U8978P) with 60% kcal from fat or standard chow diet (CD; #M20) with 8% kcal from fat (Special Diet Services, France) for 12 weeks. Animals' body weights were measured regularly. Adult *YFP-Ptc<sup>+/+</sup>* and *YFP-Ptc<sup>-/-</sup>* mice were used for glucose and insulin tolerance tests, hormone assays and metabolic experiments. All animal experiments were performed in accordance with the Council Directive 2010/63EU of the European Parliament and were approved (project n°4558) by the French ethic committee (C2EA – 59 Comite Paris Centre et Sud).

### 1.2 Hypothalamic astrocyte primary culture and AAV infection

Hypothalami were dissected from postnatal day 1 (P1) pups from *Ptc<sup>fl/fl</sup>;R26R-YFP* mice and kept in cold DMEM/F-12 (#31330.038, Invitrogen). Tissues were crushed through a 20 µm Nylon mesh (Buisine, Clermont de l'Oise, France) using a cell scraper and cells centrifuged and seeded in T25 flasks in DMEM/F-12 supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS) and 100 units/ml penicillin-streptomycin both from Invitrogen. Cells were

incubated at 37 °C under 5% CO<sub>2</sub> until confluency (12-15 days *in vitro* (DIV)) with medium changed every 3 days. Then to remove contaminants, shaking of the sealed flask was performed for 24 h at room temperature with one change of equilibrated culture medium. The day after, cells were split for future use.

Astrocytes from *Ptc<sup>ff</sup>*; R26R-YFP mice (DIV 8- 18), were seeded in Poly-D-lysine (PDL) (Sigma) -coated 24-well plates at a density of 50 000 cells per well. The day after, they were infected with AAV-Cre (#7012) or AAV-GFP (#7006) (Vector Biolabs), MOI 50 000 in 250 µl of serum free DMEM-F12 + 0.4% AdenoBOOST™ (#SB-P-AV-101-01, Sirion Biotech) for 6 h. Cells were washed twice in PBS and then cultured in regular medium for 5 days. Medium was changed to serum free media for 24 h and [<sup>3</sup>H]-2-deoxy-D-glucose uptake assay, RNA extraction and immunocytochemistry were performed the day after.

### 1.3 Cell line culture and transfection

All cells lines were cultured at 37 °C under 5% CO<sub>2</sub> in DMEM (#41966-029, Invitrogen) with 10% FCS. HEK293 and NIH3T3 cell lines were from ATCC and 4C20 *Smo<sup>-/-</sup>* and P2A6 *Ptc<sup>-/-</sup>* mouse embryonic fibroblasts lines (MEFs) were kindly provided by Dr. P. Beachy, (Stanford University School of Medicine, Stanford, CA, USA). HEK293 were transfected using XtremeGENE9 (Sigma) with pRK5-mouse *Shh* (P. Beachy), pRK5-mouse *Ptc* or pRK5 empty vector [29] and harvested 48 h later for Western blot analysis. MEF were seeded into PDL-coated 24-well plates at 50 000 cells/well and transfected using 0.75 µl of *TransIT-2020* reagent (Mirus) and 10 ng of pRK5-mouse *Ptc* or pRK5-mouse *Smo* [29] supplemented with pRK5 empty vector (240 ng). Cells were starved 24 h later to perform [<sup>3</sup>H]-2-deoxy-D-glucose uptake assays or RNA extraction 48 h post-transfection.

#### 1.4 [<sup>3</sup>H]-2-deoxy-D-glucose uptake assay

The assay was performed on astrocytes or MEFs after 24 h starvation. Plates were washed once with warmed glucose-free DMEM (#11966025, Invitrogen) and incubated for 15 min in the same medium. Then, final 50 nM of 2-deoxy-D-glucose (2-DG) (Sigma) including 0.2  $\mu$ ci (12.3 nM) of [<sup>3</sup>H]-2-deoxy-D-glucose (specific activity: 35.2 Ci/mmol, Perkin Elmer), were added and incubated for 15 min. Reactions were terminated by aspiration and the wells washed four times with 500  $\mu$ l cold Krebs-Hepes buffer (NaCl 113 mM, KCl 3 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2 mM, MgSO<sub>4</sub> 1.2 mM, CaCl<sub>2</sub> 2.5 mM, NaHCO<sub>3</sub> 25 mM, glucose 5.5 mM, HEPES 1.5 mM, pH 7.2). Cells were digested (0.2 M NaOH, 30 min, 50°C, 500  $\mu$ l), and both radioactivity was quantified using a liquid scintillation counter (Wallac) and protein content determined using Bradford protein assay (Sigma). Cytochalasin B (10 mM, Sigma) was used to determine non-facilitated [<sup>3</sup>H]-2-deoxy-D-glucose uptake. The glucose uptake was assessed on three different astrocytes cultures and two independent experiments for MEFs.

#### 1.5 Western blotting

Tissues from C57BL/6J adult mice (n= 10 for SVZ, hypothalamus and hippocampus; n= 3 for cortex and cerebellum) were homogenized in ice-cold buffer Tris-HCl 10 mM pH 7.4; EDTA, 1 mM, supplemented with complete inhibitor cocktail (TE) (Sigma) and membranes were prepared by centrifugation at 100 000 g. Total homogenates of transfected HEK293 cells were prepared in TE. Protein content was determined using Micro Lowry kit (Sigma). Proteins from tissues (40  $\mu$ g) and cell samples (3  $\mu$ g) were electrophoresed and probed as described [30]. Following antibodies were used: goat anti-mSHH-N (N19, SantaCruz, 1/2000), rabbit anti-mSHH-N (167Ab, [30], 1/1000) and rabbit anti-tubulin (T5192, Sigma, 1/1000). 167Ab blocking experiments were realized as described [30]. N19 antibody was blocked by overnight pre-incubation at 4°C with human SHH-N N19 peptide (4  $\mu$ g/ml) (SantaCruz).

Chemiluminescence (Pierce ECL+, Thermo) was acquired with Chemidoc apparatus (Bio-Rad) and densitometry analysis was performed using ImageLab software (Bio-Rad).

### 1.6 Food intake, locomotor activity, body temperature and indirect calorimetry

Six YFP-Ptc<sup>+/+</sup> and YFP-Ptc<sup>-/-</sup> mice, 13 weeks after tamoxifen treatment, were monitored during 8 h for energy expenditure, oxygen consumption and carbon dioxide production, respiratory exchanged rate (RER;  $VCO_2/VO_2$ ), food intake and locomotor activity using metabolic cages (Labmaster; TSE Systems, Bad Homburg, Germany). Activity was recorded using infrared light beam-based locomotion monitoring system (beam breaks/h). Mice were individually housed with free access to regular chow and acclimated to the chambers for 48 h before experimental measurements. Data analysis was carried out with Excel XP (Microsoft) using extracted raw values of  $VO_2$ ,  $VCO_2$  (in ml/h) and energy expenditure (kJ/h). Subsequently, each value was expressed either per total body weight or whole lean tissue mass extracted from the EchoMRI analysis as described [31]. See the Supplementary Methods for further details. The rectal body temperature was measured in the morning with a thermometer probe (BIO-TK8851, rectal probe BIOBRET-3) lubricated with vaseline (Cooper).

### 1.7 Glucose and insulin tolerance tests

Glucose tolerance test (GTT) was performed as described [32]. Overnight fasted mice received intraperitoneally 2 g glucose/kg of body weight and blood samples were collected through their tail vein (n = 4-7/group). Plasma glucose was determined at 0, 15, 30, 60 and 120 min post-glucose challenge using Accu-Check system. For insulin tolerance test (ITT), mice were fasted for 5h and received an intraperitoneal injection of 1 U insulin/kg of body weight (n = 5-7/group). Glycemia was determined as for GTT.

### 1.8 Hormone assays

Blood samples of overnight fasted mice (n = 4-9/ group) were collected from aorta and treated with 1% 0.4 M K3-EDTA (for 1 month post-tamoxifen treated mice) or 12 U/mL of heparin (for HFD or 7 months post-tamoxifen treated mice). Plasma was collected by centrifugation (13 000 g, 4°C for 30 min) and stored at -80°C. Hormone plasma levels were assessed using mouse ELISA kits from MERCK-Millipore for insulin (EZRMI-13K), leptin (EZML682K) and adiponectin (EZMADP-60K). Non-esterified fatty acids (NEFAs) were assayed using WAKO kit (Sobodia).

### 1.9 RNA isolation, RT-qPCR and RT-PCR assays

RNA was extracted from dissected tissues of individual mouse (n = 4/group) or from MEF (on two independent experiments with three biological replicates), reverse transcribed and submitted to real-time quantitative PCR (qPCR) as described [32]. GAPDH and  $\beta$ -Actin were used as internal controls. Specific qPCR primers (Eurofins) are listed in Supplemental Table 1. For conventional RT-PCR of Ptc transcripts from mouse tissues and MEF, cDNAs, were prepared as described above for qPCR. Then, they were amplified using Flexi Go-Taq (Promega) with primers (mPTC11; AAAGCCGAAGTTGGCCATGGGTAC and mPTC7R; TGTCTGTCTTCACTGAATGC) described previously [33].

### 1.10 Immunohistochemistry

Mice, under deep anesthesia, were perfused with 4% paraformaldehyde. Brain sections from were cut on the cryostat (14  $\mu$ m) (n = 3-4/group). For immunostaining, sections were incubated 1 h in PBS, 0.25 % Triton-X100, 1 % BSA and 1 h with donkey anti-mouse Fab fragment (1/50, 715-007-003, Jackson IR). The primary antibodies were incubated overnight at 4°C: chicken anti-GFP (1/1000, GFP-1020, Avès labs) for YFP detection, rabbit anti-GFAP (1/500,

ZO33429-2, Dako), mouse anti-S100 $\beta$  (1/500, S2532, Sigma), mouse anti-HuC/D (1/500, A21271, Molecular Probes). Next, slices were incubated with the appropriate fluorescent secondary antibody (1/400, Millipore or Jackson-IR) for 2 h at room temperature. Staining was replicated on at least three different mice as indicated. Nuclei were counterstained with DAPI. Images were acquired with a 20X objective (N.A. 0.75) using fluorescence (Leica DM2000) or 63X objective on confocal (Leica TCS SP8) microscope. For the later, Z-stacks 5.9  $\mu$ m thick, containing 15 Z-sections images were analyzed using LAS-X software (Leica) and reconstructed in ImageJ 1.52p (NIH) and Photoshop CS3 (Adobe).

### 1.11 Immunocytochemistry

Cells on coverslips were washed twice in PBS, fixed 20 min with ice-cold 4%PFA, washed three times in PBS and immunofluorescence performed as described above with 2h incubation of primary antibody (chicken anti-GFP; 1/300) and without Fab fragment blocking.

### 1.12 Single molecule fluorescent *in situ* hybridization

Single molecule fluorescent *in situ* hybridization (smfISH) was performed on 14  $\mu$ m frozen brain sections of adult mice (n = 3/group) using the RNAscope® Multiplex Fluorescent Kit-v2 according to the manufacturer's protocols (Advanced Cell Diagnostics). Intensity comparison was made with identical parameters. Specific probes were used to detect Patched (Ptc): 402811-C2, Glis1: 430781-C3, Gli1: 311001-C2, Gli2: 405771-C2, Gli3: 445511-C3 and Ptc<sup>del</sup>: 581621 (floxed region of Ptc) mRNAs. Positive cells are associated to more than two RNAscope signals.

### 1.13 Statistics

Data are represented as the mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Statistical significance was determined by unpaired two-tailed Student's t-test (Excel) or Mann and Whitney test (Anastats).

### 1.14 Cell counting and statistical analysis

Quantification of *Ptc<sup>del+</sup>Glast<sup>+</sup>S100 $\beta$ <sup>+</sup>* co-stainings in the hypothalamic parenchyma was performed on sections obtained at the level of the median eminence from three YFP-Ptc<sup>+/+</sup> and YFP-Ptc<sup>-/-</sup> mice 10 days after tamoxifen treatment. The number of *Glast<sup>+</sup>S100 $\beta$ <sup>+</sup>* counted cells per animal ranged between 28 and 48 cells in the arcuate nucleus (ARC), 90 and 144 cells in the ventromedial hypothalamic nucleus (VMH).

Quantification of *Gli1<sup>+</sup>Glast<sup>+</sup>S100 $\beta$ <sup>+</sup>*, *Gli2<sup>+</sup>Glast<sup>+</sup>S100 $\beta$ <sup>+</sup>* and *Gli3<sup>+</sup>S100 $\beta$ <sup>+</sup>* co-stainings in the cerebral cortex and in the hypothalamic parenchyma was performed on sections obtained at the level of the median eminence from three YFP-Ptc<sup>+/+</sup> and YFP-Ptc<sup>-/-</sup> mice 10 days after tamoxifen treatment (except for *Gli2<sup>+</sup>Glast<sup>+</sup>S100 $\beta$ <sup>+</sup>* in the arcuate of YFP-Ptc<sup>+/+</sup> mice, n=2). The number of *Glast<sup>+</sup>S100 $\beta$ <sup>+</sup>* counted cells per animal ranged between 34 and 67 cells in the ARC, 118 and 279 cells in the VMH, 133 and 332 cells in the dorsomedial hypothalamic nucleus (DMH), 255 and 388 cells in the cerebral cortex. The number of S100 $\beta$ <sup>+</sup> counted cells per animal ranged between 32 and 84 cells in the ARC, 141 and 216 cells in the VMH, 159 and 275 cells in the DMH, 245 and 291 cells in the cerebral cortex. Countings of co-localised stainings were done using ROI and multi-point ImageJ tools. Quantitative data are expressed as the mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Comparisons between two experimental groups were made using Mann and Whitney test. A value of  $p < 0.05$  was considered statistically significant. Graphs were drawn using GraphPad Prism 5.2 (GraphPad Software, Inc).

## 2 Results

### 2.1 Hypothalamic astrocytes express Patched and Gli1-3 transcription factors

We first investigated the distribution of Sonic Hedgehog (Shh) proteins in adult mouse brain tissues and in HEK293 cells expressing mouse Shh using N19 and 167Ab, two specific Shh antibodies [30; 34-36]. On Western blot, two bands of 47 kDa and 22 kDa corresponding to the uncleaved and aminoterminal active fragment of Shh (ShhN), respectively, were identified (Figure 1A). These signals were absent in blocking experiments (Figure Sup. 1A-D) consistent with the presence of uncleaved Shh and ShhN signal in these tissues. ShhN was the highest in the hypothalamic extracts suggesting elevated Shh signaling in this brain region.

To further investigate Shh signaling in the hypothalamus, we used single molecule fluorescent *in situ* hybridization (smFISH), a highly sensitive technique, to investigate the hypothalamic distribution of the mRNAs encoding the Shh receptor Patched (Ptc) and the Gli1-3 transcription factors associated to the pathway [1]. Using RNAscope, we first successfully detected wide distribution of Ptc mRNAs in adult hypothalamic nuclei, including the dorsomedial hypothalamic nucleus (DMH), ventromedial hypothalamic (VMH) and arcuate (ARC) nuclei (Figure 1B-F). We observed intense signal associated to Ptc mRNAs around the nuclei of *Glast*, GFAP and S100 $\beta$  positive cells in the various hypothalamic nuclei (Figure 1C-E). *Ptc*<sup>+</sup>GFAP<sup>+</sup> cells displayed a stellated morphology suggesting that they were astrocytes (Figure 1C). Ptc mRNA expression was moderate in HuC/D<sup>+</sup> cells corresponding to neurons in hypothalamic parenchyma (Figure 1F). Interestingly, we further identified by RNAscope intense signals indicating expression of *Gli1* and *Gli2* in *Glast*<sup>+</sup>S100 $\beta$ <sup>+</sup> cells (Figure 1G-H), and moderate expression of *Gli3* in S100 $\beta$ <sup>+</sup> cells (Figure 1I). Gli1, Gli2, Gli3 associated RNAscope-signals were rarely observed outside of these cells in the hypothalamus. Altogether, these data suggest that a large population of hypothalamic astrocytes expressed Ptc and Gli1-3 mRNAs and should be responsive to Shh signaling.

## 2.2 Deletion of the Hh receptor *Ptc* from *Glast*<sup>+</sup> astrocytes in the adult mice

To investigate the role of *Ptc* in astrocytes, we used YFP-*Ptc*<sup>+/+</sup> and YFP-*Ptc*<sup>-/-</sup> mice [28; 37] in which YFP expression and *Ptc* deletion are initiated by tamoxifen (Tx)-mediated activation of the Cre recombinase in all the progeny of the recombined glutamate aspartate transporter-positive (*Glast*) cells. We have previously shown that recombination occurs in neural stem cells (NSCs) in the ventricular-subventricular zone (V-SVZ) of the lateral ventricles and in astrocytes adjacent to this region upon Tx treatment in the adult mice [28]. In the VMH of YFP-*Ptc*<sup>+/+</sup> and YFP-*Ptc*<sup>-/-</sup> mice 7 days after Tx, we have now observed numerous YFP<sup>+</sup> cells displaying a stellate morphology attributed to astrocytes. These cells were positive for the astroglial markers GFAP and S100 $\beta$  (Figure 2A-B and Figure Sup. 2A-H) but were not labelled by the neuronal marker HuC/D, nor the oligodendrocyte precursor cell marker NG2 (Figure 2A-B and Figure Sup. 2I-L). These data showed that after Tx, YFP recombination occurred in GFAP and S100 $\beta$  positive astrocytes in hypothalamic nuclei consistent with *Glast*-specific expression of the Cre-recombinase.

To further characterize *Ptc* deletion upon Tx treatment, we analyzed the hypothalamic expression of transcripts for *Ptc* and *Ptc* deleted (*Ptc*<sup>del</sup>) for the floxed region containing exons 8-9 which should be removed in YFP-*Ptc*<sup>-/-</sup> mice (Figure 2C-D). First, we detected by RT-PCR, *Ptc*<sup>del</sup> mRNA only in the hypothalamus of YFP-*Ptc*<sup>-/-</sup> mice 10 days after Tx while *Ptc* mRNA was detected in YFP-*Ptc*<sup>+/+</sup> and was strongly decreased in YFP-*Ptc*<sup>-/-</sup> (Figure 2C). Secondly, we assayed the expression of *Ptc* transcripts by RNAscope using a specific probe (*Ptc*<sup>del</sup>) designed against *Ptc* mRNA sequence which should be deleted in *Glast*<sup>+</sup> recombined cells in YFP-*Ptc*<sup>-/-</sup> mice (Figure 2D). We performed RNAscope for *Ptc*<sup>del</sup> and *Glast* mRNAs combined with immunohistofluorescence (IHF) for the astrocyte marker S100 $\beta$ . Thus, we identified *Ptc* mRNA expression in the vast majority (87-94%) of *Glast*<sup>+</sup>S100 $\beta$ <sup>+</sup> astrocytes in the hypothalamic parenchyma of YFP-*Ptc*<sup>+/+</sup> mice 10 days after Tx as shown in the ARC and VMH nuclei (Figure

2E-I, Table 1). In YFP-Ptc<sup>-/-</sup> mice, Ptc mRNA signal was detected in only 12-14% of Glast<sup>+</sup>S100β<sup>+</sup> cells in hypothalamic nuclei (Figure 2E-I, Table 1). As a control of the Ptc<sup>del</sup> probe, Ptc mRNAs were still observed in Glast/S100β negative cells in YFP-Ptc<sup>-/-</sup> mice (Figure 2F, H, white arrowhead) as observed in YFP-Ptc<sup>+/+</sup> mice (Figure 2G, white arrowhead) and with another Ptc RNAscope probe (Figure 1F). Further analysis of these data indicated that Ptc has been deleted in 84-87% of triple Ptc<sup>+</sup>Glast<sup>+</sup>S100β<sup>+</sup> cells. Altogether, these results demonstrated Glast-specificity and high efficiency of inducible cre-mediated recombination upon Tx in YFP-Ptc<sup>+/+</sup> and YFP-Ptc<sup>-/-</sup> mice leading to Ptc deletion in Glast<sup>+</sup>S100β<sup>+</sup> astrocytes in YFP-Ptc<sup>-/-</sup> mice.

**Table 1. Comparison of Gli1, Gli2 and Gli3 expression in the hypothalamus and cerebral cortex upon Ptc deficiency in Glast<sup>+</sup> astrocytes.**

	Ptc <sup>+</sup> cells (%)		Gli1 <sup>+</sup> cells (%)		Gli2 <sup>+</sup> cells (%)		Gli3 <sup>+</sup> cells (%)	
	(Glast <sup>+</sup> S100β <sup>+</sup> )		(Glast <sup>+</sup> S100β <sup>+</sup> )		(Glast <sup>+</sup> S100β <sup>+</sup> )		(S100β <sup>+</sup> )	
	YFP-Ptc <sup>+/+</sup>	YFP-Ptc <sup>-/-</sup>	YFP-Ptc <sup>+/+</sup>	YFP-Ptc <sup>-/-</sup>	YFP-Ptc <sup>+/+</sup>	YFP-Ptc <sup>-/-</sup>	YFP-Ptc <sup>+/+</sup>	YFP-Ptc <sup>-/-</sup>
Hypothalamus								
DMH	-	-	96 ± 1	96 ± 1	86 ± 7	83 ± 4	83 ± 4	91 ± 0.3*
VMH	94 ± 1	12 ± 1*	97 ± 1	98 ± 1	80 ± 2	81 ± 4	83 ± 2	89 ± 2
ARC	87 ± 1	14 ± 1*	88 ± 3	86 ± 3	63 ± 4	58 ± 6	72 ± 3	82 ± 0.2*
Cortex	-	-	71 ± 6	94 ± 1*	54 ± 4	43 ± 4	88 ± 3	70 ± 4*

Data are from RNAscope experiments with Ptc<sup>del</sup>, Gli1-3 probes as depicted in Figures 2E-H, 3B-C, Figures sup. 3A-L4 and 4A-B. Data are means ± SEM, n =3/ group. \*p<0.05 vs age-matched YFP-Ptc<sup>+/+</sup> mice by Mann and Whitney test.

### 2.3 Ptc deficiency in *Glast*<sup>+</sup> astrocytes modifies *Gli1* and *Gli3* transcription

We then explored whether the mRNA levels of *Gli1*, *Gli2* and *Gli3* transcription factors were modified in hypothalamic nuclei upon *Ptc* deficiency in *Glast*<sup>+</sup> astrocytes. In comparison, we analyzed *Gli1-3* distribution in the cerebral cortex of these mice, a tissue showing a low *Shh* protein expression (Figure 1A and Figure Sup. 1). In these tissues, 4 weeks after Tx, *Ptc* deficiency in *Glast*<sup>+</sup> astrocytes induced a 2-6 fold increase of *Gli1* expression detected by qRT-PCR, whereas *Gli2* and *Gli3* mRNA levels were not modified (Figure 3A) as well as other genes associated to *Shh* pathway (Figure Sup. 4C).

Then, we investigated in these tissues, the expression of *Gli1-2* and *Gli3* mRNAs cell distribution in *Glast*<sup>+</sup>*S100β*<sup>+</sup> and *S100β*<sup>+</sup> astrocytes, respectively by RNAscope combined to IHF (Figure 3B-C, Figures Sup. 3A-L<sup>4</sup> and 4A-B). Analysis of these experiments are recapitulated in Table 1. These data indicated that 1) *Gli1* transcription was high in hypothalamic astrocytes and low in cerebrocortical astrocytes in YFP-*Ptc*<sup>+/+</sup> (Figure 3B, Figure Sup. 3A-C<sup>4</sup> and G-I<sup>4</sup>); 2) the number of cortical astrocytes expressing *Gli1* increased upon *Ptc* deficiency (Figure 3B-C, Figure Sup. 3G-L<sup>4</sup>); 3) the number of *S100β*<sup>+</sup> astrocytes expressing *Gli3* was significantly increased in the ARC and DMH but not in the VMH, and decreased in the cerebral cortex of YFP-*Ptc*<sup>-/-</sup> mice (Figure Sup. 4B); 4) the number of *Gli2* positive astrocytes was not affected by *Ptc* deletion (Figure Sup. 4A).

### 2.4 Ptc deficiency in *Glast*<sup>+</sup> astrocytes impairs adipose tissues

Next, we assessed the adult phenotype of YFP-*Ptc*<sup>-/-</sup> animals. These mice were born healthy and at a Mendelian ratio. However, 6 weeks after Tx, we observed that YFP-*Ptc*<sup>-/-</sup> mice started to display a lean phenotype and were not gaining weight over time (Figure 4A-B). Further analysis revealed that subcutaneous (SAT), visceral (VAT) and brown (BAT) adipose tissues were severely affected in YFP-*Ptc*<sup>-/-</sup> mice 32 weeks after Tx (Figure 4C). We performed

histological and tissues weight analysis to quantify these defects. In YFP-Ptc<sup>-/-</sup> mice, the adipocytes sizes were dramatically reduced and were correlated with a decrease of total subcutaneous (82%), visceral (88%), and brown (52%) adipose tissues (Figure 4D-E). We did not detect any modification of tissue weight for the liver (Figure 4D). Despite a marked impairment of BAT, we did not observed any modification of the body temperature 25 weeks after Tx (Figure 4F).

## 2.5 Ptc deficiency in Glast<sup>+</sup> astrocytes enhances glucose and insulin responses over time

Analysis of blood insulin in overnight fasted animals indicated a significant lower level in YFP-Ptc<sup>-/-</sup> animals compared to YFP-Ptc<sup>+/+</sup> littermates over time (Figure 4G-H). However blood insulin level was similar in YFP-Ptc<sup>-/-</sup> mice 4 and 32 weeks after Tx whereas it was increased in YFP-Ptc<sup>+/+</sup> mice 32 weeks after Tx (Table 2). These data indicated a tight control of the insulin metabolic pathway in YFP-Ptc<sup>-/-</sup> mice over time.

To further investigate the effects of Ptc deletion on metabolism, we analyzed glucose and insulin tolerance, energy expenditure and we measured important adipokines implicated in glucose and lipid metabolism. Interestingly, fasted YFP-Ptc<sup>-/-</sup> animals displayed an increased sensitivity to glucose in a glucose tolerance test (GTT) that was maintained over time (Figure 4I). No difference in response during GTT was assessed between the two cohorts of mice before Tx (Figure Sup. 5A) demonstrating that Tx-induced Ptc deletion in Glast<sup>+</sup> cells was responsible to the increased sensitivity to glucose in YFP-Ptc<sup>-/-</sup> mice. Two weeks after Tx, the blood glucose concentration was already significantly lower 15 min after glucose injection in YFP-Ptc<sup>-/-</sup> animals compared to YFP-Ptc<sup>+/+</sup> littermates whereas it was in the same range between the two groups before and 120 min after injection (Figure 4I). Consistent with this observation, YFP-Ptc<sup>+/+</sup> mice exhibited a much higher area under the curve (AUC) of blood glucose (Figure 4I). Adult female YFP-Ptc<sup>-/-</sup> mice also displayed an increased glucose sensitivity after Tx over time

confirmed by a significantly higher AUC (Figure Sup. 5B). Interestingly, 32 weeks after Tx, YFP-Ptc<sup>+/+</sup> mice did not succeed to reach back their glucose baseline (Figure 4I) presumably reflecting an age-associated insulin resistance.

We did not detect any change in glucose concentration between YFP-Ptc<sup>+/+</sup> and YFP-Ptc<sup>-/-</sup> animals in the insulin tolerance test (ITT) during the first (4-14) weeks after Tx (Figure 4J, Table 2). However, blood glucose levels in the ITT were lower in YFP-Ptc<sup>-/-</sup> mice 32 weeks after Tx (Figure 4J, Table 2), presumably reflecting age-associated insulin resistance in YFP-Ptc<sup>+/+</sup> mice which was supported by high glucose levels observed in the GTT in these animals (Figure 4I). Thus, these data suggested that Ptc deletion in Glast<sup>+</sup> astrocytes prevents age-associated metabolic alterations.

Blood leptin was not modified 4 weeks after Tx between YFP-Ptc<sup>+/+</sup> and YFP-Ptc<sup>-/-</sup> animals, increased in YFP-Ptc<sup>+/+</sup> aged animals but was kept at a low level in YFP-Ptc<sup>-/-</sup> mice 32 weeks after Tx (Table 2). These values were in agreement with reduced adipose tissues in YFP-Ptc<sup>-/-</sup> animals (Figure 4C-E). Analysis of non-esterified fatty acid (NEFA) indicated a significant lower concentration in YFP-Ptc<sup>-/-</sup> animals 32 weeks after Tx whereas no significant change occurred between control and YFP-Ptc<sup>-/-</sup> mice 4 weeks after Tx. Interestingly, adiponectin level was similar in both groups (Table 2) despite the marked difference in the weight of white adipose tissues in these animals (Figure 4C-E), suggesting an increased production from the adipose tissue of YFP-Ptc<sup>-/-</sup> mice.

We did not detect change in food intake in YFP-Ptc<sup>-/-</sup> mice compared to control animals 13 weeks after Tx (Figure 5A). Energy expenditure and locomotor activity were also not different between the two cohorts of mice (Figure 5B-C). However, we identified an altered O<sub>2</sub>-consumption/CO<sub>2</sub>-production rate with a significant decrease of the respiratory exchange ratio which was diminished during the day for YFP-Ptc<sup>-/-</sup> mice (Figure 5D-E). These observations indicated that the percentage of fatty acid oxidation was significantly increased

during the day in YFP-Ptc<sup>-/-</sup> mice, whereas it was reduced during the night (Figure 5F-G). Altogether, these data suggested that YFP-Ptc<sup>-/-</sup> mice utilized fatty acid bulk energy during the day and transformed glucose to fatty acid during the night.

## 2.6 Ptc deficiency in Glast<sup>+</sup> astrocytes prevents adult mice from high fat diet-induced weight gain

As Ptc deficiency in Glast<sup>+</sup> astrocytes impairs fat depots, increases glucose sensitivity and prevents age-associated insulin resistance, we challenged 11 weeks-post-Tx YFP-Ptc<sup>+/+</sup> and YFP-Ptc<sup>-/-</sup> mice with high fat diet (HFD) for a total of 12 weeks (Figure 6A). Beginning at the second week, YFP-Ptc<sup>+/+</sup> mice gained more weight than YFP-Ptc<sup>-/-</sup> mice that did not show any increase over time (Figure 6B-C). At the end of the challenge, SAT, VAT and BAT of YFP-Ptc<sup>-/-</sup> mice were severely impaired whereas the weight of kidneys, heart, spleen and liver were not (Figure 6E). The liver of YFP-Ptc<sup>-/-</sup> mice did not show steatosis observed for YFP-Ptc<sup>+/+</sup> liver (Figure 6D). Under glucose challenge, blood glucose levels returned to near baseline in YFP-Ptc<sup>-/-</sup> animals before HFD and at the end of the treatment, whereas YFP-Ptc<sup>+/+</sup> mice had higher increase of blood glucose levels which did not return to baseline 120 min after injection (Figure 6F-G). In the ITT, blood glucose levels decreased 30-90 min after insulin injection in both YFP-Ptc<sup>+/+</sup> and YFP-Ptc<sup>-/-</sup> mice but YFP-Ptc<sup>+/+</sup> mice displayed higher blood glucose levels throughout the ITT (Figure 6H). We also observed that, when on HFD, YFP-Ptc<sup>-/-</sup> animals displayed lower insulin and leptin blood levels compared to YFP-Ptc<sup>+/+</sup> mice whereas adiponectin levels were not modified (Table 2). Altogether, these data indicated that Ptc mutant mice, when submitted to a HFD, were able to maintain an increased sensitivity to glucose, to prevent insulin resistance with a severe impairment of adipose tissue depots thus preventing HFD-induced obesity traits.

**Table 2. Plasma variables in YFP-Ptc<sup>+/+</sup> and YFP-Ptc<sup>-/-</sup> fasted mice and high fat diet.**

	YFP-Ptc <sup>+/+</sup>	YFP-Ptc <sup>-/-</sup>	YFP-Ptc <sup>+/+</sup>	YFP-Ptc <sup>-/-</sup>	YFP-Ptc <sup>+/+</sup>	YFP-Ptc <sup>-/-</sup>
	Chow diet				High fat diet <sup>Δ</sup>	
	4 weeks post-Tx		32 weeks post-Tx		22 weeks post-Tx	
Glucose (mg/dl)	97.8 ± 5.8	90.8 ± 7.5	99.0 ± 8.7	63.0 ± 7.5*	-	-
Insulin (ng/ml)	0.35 ± 0.08	0.13 ± 0.05*	1.09 ± 0.41	0.15 ± 0.04*	2.08 ± 0.24	0.15 ± 0.05***
Leptin (ng/ml)	0.31 ± 0.08	0.19 ± 0.04	14.8 ± 3.4	0.36 ± 0.21**	28.2 ± 4.9	2.4 ± 1.5***
NEFA (μmol/l)	1590 ± 83	1529 ± 91	1901 ± 180	1294 ± 78*	-	-
Adiponectin (ng/ml)	-	-	10822 ± 1230	12835 ± 1129	8457 ± 1061	10961 ± 881

Data are mean ± SEM, n = 4-9/group. \*p<0.05; \*\*p<0.01 and \*\*\*p<0.001 vs age-matched YFP-Ptc<sup>+/+</sup> mice by Student's t-test. Δ12 weeks of high fat diet.

## 2.7 Molecular analysis of pathways upon Ptc deficiency in Glast<sup>+</sup> astrocytes indicates modifications of insulin signaling

Then, we analyzed the expression levels of key genes involved in glucose transports, energy homeostasis, insulin sensitivity and inflammation by qRT-PCR in hypothalamic tissues from YFP-Ptc<sup>+/+</sup> and YFP-Ptc<sup>-/-</sup> mice 4 and 32 weeks after Tx (Figure 7A-B). At 4 weeks after Tx, we observed a significant up-regulation of the insulin receptor (IR) and LKB1, and a down regulation of the negative regulators of the insulin pathway SOCS3 and TLR4, albeit it did not reach significance (Figure 7A). These modifications were not observed in mutant animals 32 weeks after Tx (Figure 7B). The expression of the glucose transporter of glucose Glut4 was up-regulated 32 weeks post Tx in mutant mice but not 4 weeks after Tx, whereas Glut1 and Glast were not modified overtime (Figure 7A-B). The increase in fatty acid oxidation (Figure 5F-G) and the marked impairment in adiposity depots (Figure 4C-E) observed in YFP-Ptc<sup>-/-</sup> mice was accompanied by a decrease of TNFα and IL6 inflammatory genes 4 weeks after Tx whereas a significant decrease of CD11b was observed in mutant animals 32 weeks after Tx (Figure 7A-

B). However, most of the other genes of the inflammatory pathway, including GFAP, were not modified in the mutant animals (Figure 7A-B).

## 2.8 Ablation of Patched in *Glast* positive cells does not modify glucose availability in astrocytes

Next, we investigated the effect of *Ptc* deletion in *Glast*<sup>+</sup> cells on glucose availability in primary hypothalamic astrocyte cultures of YFP-*Ptc*<sup>fl/fl</sup> pups at postnatal day 1 that were infected with an adenovirus for Cre delivery for recombination, or an adenovirus for GFP expression. First, we demonstrated that the adenoviral delivery of GFP or Cre led to a wide expression of GFP and YFP in astrocyte cultures, respectively (Figure 8A-B) and to the deletion of *Ptc*-floxed region mRNA as evidenced by qRT-PCR analysis (Figure Sup. 6A). The loss of the *Ptc* receptor was not accompanied by modification of [<sup>3</sup>H]-2-deoxy-D-glucose (<sup>3</sup>H-DG) uptake during a 15 min-assay in these cells, whereas treatment with Cytochalasin B, an inhibitor of glucose transporters [38 ; 39] blocked ~ 80% of <sup>3</sup>H-DG uptake (Figure 8C). We then investigated whereas <sup>3</sup>H-DG uptake in *Ptc*<sup>-/-</sup> MEFs and *Smo*<sup>-/-</sup> MEFs was modified upon rescue with *Ptc* and *Smo* overexpressing vectors, respectively. We observed robust expression of both *Ptc* and *Smo* transcripts upon overexpression of *Ptc* and *Smo* vectors, respectively, and upregulation of the Hh pathway in *Ptc*<sup>-/-</sup> MEF cells indicated by high *Gli1* transcription as expected (Figure Sup. 6B-D). However, we did not detect modification of <sup>3</sup>H-DG uptake in these cells upon rescue with *Ptc* or *Smo*, whereas Cytochalasin B efficiently inhibited <sup>3</sup>H-DG uptake by ~ 95% (Figure 8D). Altogether, these data indicated that ablation of *Ptc* in primary astrocyte cultures or of both *Ptc* and *Smo* in MEFs does not affect the endogenous tone of glucose uptake in these cells.

### 3 Discussion

Here, we provide *in vivo* evidence that Shh signaling in the brain exerts a key role in the control of energy metabolism. We demonstrated that genetic activation of Shh signaling in *Glast* positive astrocytes in the adult brain results in a lean phenotype associated to an increase of fatty acid oxidation. In our genetically engineered model, *Ptc* deficiency in *Glast* positive astrocytes was accompanied by significant modifications of glucose and insulin responses, resulting in an increase of blood glucose uptake and a decrease of blood insulin levels, with a pronounced resistance to age-associated and diet-induced metabolic alterations. Gene expression associated to Shh and insulin signaling was modified in hypothalamic tissues from these mutant animals whereas astrocyte glucose availability was not altered in primary hypothalamic astrocyte cultures upon *Ptc* deletion. Altogether, these data argue for a hypothalamic control of energy metabolism through Shh signaling regulation in astrocytes.

To achieve selective activation of Shh signaling in astrocytes, we used a time-dependent Cre driver regulated by the *Glast* promoter widely used for specific expression of transgene in astrocytes [7; 23 ; 40; 41]. First, we identified selective expression of the YFP reporter in GFAP positive hypothalamic astrocytes but not in cells expressing the neuronal marker HuCD or the oligodendroglial marker NG2. Then, we demonstrated that *Ptc* expression occurred in 87-94% of hypothalamic astrocytes expressing S100 $\beta$  and *Glast*. Single cell analysis of *Ptc* expression in YFP-*Ptc*<sup>+/+</sup> and YFP-*Ptc*<sup>-/-</sup> mice brain sections by RNAscope showed that nearly all hypothalamic astrocytes underwent Cre-mediated recombination which was further supported by RT-PCR analysis of hypothalamic extracts showing a decrease of *Ptc* mRNA and an increase of *Ptc*<sup>del</sup> transcripts observed in YFP-*Ptc*<sup>-/-</sup> mice.

The effects of *Ptc* deficiency are relatively strong. The marked lean phenotype of YFP-*Ptc*<sup>-/-</sup> mice, also observed upon high fat diet, was accompanied by a profound decrease of both

white and brown adipose tissues, a significant increased glucose sensitivity and reduced insulin levels. They might reflect the high level of Ptc inactivation in hypothalamic  $\text{Glast}^+$  astrocytes observed in our experiments and the important role of astrocytes in regulating these parameters [24]. Interestingly, the increase in glucose sensitivity was already observed 4 days post-Tx suggesting that the action of central Ptc inactivation on blood glucose homeostasis is rapid.

We identified a non-uniform distribution of Ptc, Gli1, Gli2 and Gli3 in hypothalamic nuclei of the adult mouse suggesting that complex canonical and non-canonical Shh signaling occur in this region: i) Gli1-Gli3 were almost exclusively expressed in astrocytes whereas Ptc was also present in neurons, in agreement with our previous work [9]; ii) Gli1-Gli3 were highly expressed in most hypothalamic astrocytes (80-97%), except in the ARC where Gli2 and Gli3 expression was lower (63-72%).

Analysis by qRT-PCR of brain extracts indicated that Gli1 transcription associated to canonical Shh signaling was increased in hypothalamic and cerebrocortical regions of  $\text{YFP-Ptc}^-/-$  mice whereas Gli2, Gli3 and other genes associated to Shh signaling were not modified. However, quantitative cell analysis of Gli1-3 transcripts distribution in  $\text{S100}\beta$  astrocytes by RNAscope revealed a more complex regulation of Shh signaling in these regions. Importantly, in the hypothalamus, the number of  $\text{Gli1}^+$  and  $\text{Gli2}^+$  recombined astrocytes were not modified upon Ptc deletion. However, the population of  $\text{Gli3}^+$  astrocytes was increased in the ARC and DMH, decreased in cerebrocortical regions and was not affected in the VMH of these animals. In comparison, intense RNAscope Gli1 signals were evidenced in almost all cerebrocortical astrocytes (94%) of  $\text{YFP-Ptc}^-/-$  mice suggesting that Ptc deletion has led to canonical Shh signaling in these cells. Thus, altogether, these data indicated an opposite effect of Shh signaling activation on Gli3 regulation in ARC and DMH astrocytes compared to cerebrocortical astrocytes. In the cortex, the increased number of  $\text{Gli1}^+$  and the decreased number of  $\text{Gli3}^+$  astrocytes, observed upon Ptc deletion, may be associated to a downregulation of the repressive

form of Gli3 (Gli3<sup>R</sup>), antagonist of the Shh pathway and an increase of Gli1 transcription. Indeed, Gli3<sup>R</sup> has been proposed to play a dominant role in regulating Shh signaling in mature cerebrocortical astrocytes and to mediate astrocyte gliosis [42]. Further experiments should address whereas the increased level of Gli3 transcripts in hypothalamic nuclei reflect an increase of Gli3<sup>R</sup>, or of the activated forms of Gli3 (Gli3<sup>A</sup>) which have been described in embryo [43; 44]. Thus, despite the presence of Gli1 in hypothalamic astrocytes reflecting canonical Shh signaling [3; 26; 42], other non-canonical Gli dependent and independent mechanisms may exist in these cells [2; 13].

Recently, Ptc deletion in Glast<sup>+</sup> astrocytes in the adult brain was associated to an upregulation in the cortex of the inward-rectifying K<sup>+</sup> channel Kir4.1 [45] involved in glutamate uptake [46; 47]. Interestingly, we did not detect modifications of gene expression levels for the astrocyte-specific glutamate transporter Glast, nor glucose transporters Glut1 and Glut4 in YFP-Ptc<sup>-/-</sup> animals four weeks post Tx. However, Glut4 level was significantly upregulated thirty-two weeks post Tx suggesting that glucose transport might be affected in the brain of aged mutant animals.

Our data clearly illustrated that Ptc deletion in Glast<sup>+</sup> astrocytes resulted in lowered blood insulin levels both in young and aged animals. The blood insulin levels were kept low and in the same range over time in YFP-Ptc<sup>-/-</sup> mice suggesting a tight control of insulin secretion and regulation. Our experiments indicated that after injection into the blood, glucose was rapidly and efficiently uptaken by tissues both in young and aged mutant animals, an effect also observed upon challenge with HFD. Indeed, the mutant animals were able to counteract both the insulin resistance observed in aged animals or resulting from diet-induced obesity.

The body weight of control littermates and mutant animals was not significantly different six weeks after Tx despite a tighter control of blood glucose availability in YFP-Ptc<sup>-/-</sup>

mice. The lean phenotype observed in the mutant mice was associated to profound alterations of adipose tissues metabolism, including SAT, VAT and BAT, the size of adipocytes being considerably reduced upon Ptc deletion. The lean phenotype was also associated to changes in fatty acid oxidation which increased during the day and decreased during the night. We did not detect modification of the body temperature, the food intake, nor the energy expenditure in these mutant animals indicating that the circuitry implicated in these complex behaviors [24 ; 48] were not affected.

In mice lacking the receptor Ptc in *Glast*<sup>+</sup> cells, the weight of SAT, VAT and BAT but not of internal organs, was significantly lower after a challenge with HFD. Moreover, their liver did not display steatosis which is a hallmark of an exacerbated response to HFD. Thus, these data suggested that deleting Ptc in *Glast*<sup>+</sup> cells prevented features encountered in obesity such as excessive accumulation of adipose tissues, but also insulin resistance and liver steatosis.

Genetic variants of human Ptc with loss-of-function mutations are associated with medulloblastoma, a pediatric brain tumor with devastating effects [13]. Mice with mutations in Ptc are proposed as models of medulloblastoma [49 ; 50]. However, whether these mutations are associated with impaired energy metabolism and weight gain in human or in rodent has not been reported at our knowledge. In *Ptc*<sup>mes/mes</sup>, the deletion of the carboxyl-terminal region of Ptc is accompanied by a reduced white fat mass whereas glucose levels are not affected [51]. Thus, it would suggest that the truncated Ptc region is not involved in mediating Ptc effects in the control of blood glucose homeostasis by hypothalamic astrocytes in our experiments. It would be of interest to investigate if human inactivating Ptc alleles contribute to a lean phenotype in individuals with or without additional genetic predisposition to obesity.

Further work should identify the transduction mechanisms involved in mediating astrocytic Ptc effects on the control of energy metabolism and if small molecule modulators of

Smoothed are of interest in their modulation. Smo antagonists are in clinic for treating medulloblastoma and basal cell carcinoma associated to dysfunction of Hh signaling [52 ; 53]. Interestingly, one of these molecules, GDC0449 has been proposed to act as a non-canonical Smo agonist driving insulin-independent glucose uptake mediated by Ampk in muscle and brown adipose tissues [21] highlighting the complex transduction mechanisms associated to Hh signaling in tissues. Other canonical or non-canonical Smo agonists [13 ; 54] are not yet in clinic but might be of interest for dissecting the *in vitro* and *in vivo* biochemical and molecular events associated with Shh signaling in astrocytes. Ptc deletion in primary culture of astrocytes did not modify glucose uptake, and biochemical experiments using MEF-Ptc<sup>-/-</sup> and MEF-Smo<sup>-/-</sup> did not support the hypothesis that Ptc mediates glucose uptake in these cells. Thus, astrocytes do not share the non-canonical Ampk axis implicated in glucose uptake in muscle and adipose tissues [21] and the metabolic effects of astrocytic Ptc deletion does not seem mediated by a modification of astrocytes glucose uptake.

Hh signaling implication in adipose tissue development and as a potent inhibitor of fat formation has been documented both in rodent and in *Drosophila* whereas the modulation by the pathway of adiposity in these tissues in the adult stage is still poorly understood [55 ; 56 ; 57 ; 58]. Here, we report another level of regulation of adipose tissue physiology in the adult mice, induced by the alteration of central Hh signaling.

Hypothalamic nuclei including the ARC, the VMH and the DMH are involved in the control of systemic glucose homeostasis through the complex regulation of multiple neuronal populations and by the regulation of glial circuitry [59]. One hypothesis to explain the observed effects is that the genetic manipulation of Shh signaling in astrocytes has modified the release of an endogenous molecule that participates in the central control of energy homeostasis. Part of this regulation may also involved parasympathetic nervous activities since the autonomic

nervous system controls key events mediated by peripheral tissues implicated in metabolic activities such as the liver, muscle and fat, but also pancreatic hormone secretion [24; 48].

#### **4 Conclusions**

Shh signaling is present in mouse hypothalamus astrocytes. Conditional genetic activation of the pathway in  $Glast^+$  astrocytes results in an increased sensitivity of blood glucose levels and to lower blood insulin. Strikingly, the strong, lean phenotype observed in the mutant animals was associated to a blockade of weight gain with a profound reduction of white and brown adipose tissues, and to an increase of fatty acid oxidation. Thus, Shh signaling in astrocytes appears to have a central role in counteracting metabolic defects observed during aging and obesity. This study revealed how hypothalamic astrocytes impact significantly the physiology and pathophysiology through Shh signaling.

## **Acknowledgments**

M. R. and L. T. are the recipient of a doctoral fellowship from the Ministère de la Recherche and L.T. from Fondation pour l'Aide à la Recherche sur la Sclérose En Plaque (ARSEP), respectively. This work was supported by grants from ARSEP, Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC) and CNRS to M. R.\*

## **Conflict of Interest Statement**

The authors have no competing interests to declare.

## **Author Contributions**

L.T., M.R., G.P., H.F and A.S. were responsible for data collection, analysis and interpretation, M.R.\* for the conception and design of the work, interpretation and drafting. Critical revision of the article and final approval was confirmed by all authors.

## **Data Accessibility Statement**

Contact the corresponding author for primary data material accesement.

## **Abbreviations**

3V, third ventricle;  $\beta$ gal,  $\beta$ galactosidase, Cb, cerebellum; cc, corpus callosum; CNS, central nervous system; Ctx, cortex; DG, dentate gyrus; Ep, ependymal layer; GFAP, glial fibrillary acidic protein; GST, glutathione-S-transferase; HEK, human embryonic kidney; Hpt, hypothalamus; Iba1, ionized calcium-binding adapter molecule 1; ME, median eminence; Olig2, oligodendrocyte transcription factor 2; Ptc, Patched; Shh, Sonic Hedgehog; ShhN, amino-terminal fragment of Shh; Sox10, SRY-Box 10.

## References

- [1] Ruat, M., Faure, H., Daynac, M., 2015. Smoothened, stem cell maintenance and brain diseases. *Top Med Chem* 16:147-171.
- [2] Garcia, A.D.R., Han, Y.G., Triplett, J.W., Farmer, W.T., Harwell, C.C., Ihrle, R.A., 2018. The elegance of Sonic hedgehog: emerging novel functions for a classic morphogen. *J Neurosci* 38(44):9338-9345.
- [3] 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(41):13597-13608.
- [4] Allahyari, R.V., Clark, K.L., Shepard, K.A., Garcia, A.D.R., 2019. Sonic hedgehog signaling is negatively regulated in reactive astrocytes after forebrain stab injury. *Sci Rep* 9(1):565.
- [5] 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(2):389-396.
- [6] Bezard, E., Baufreton, J., Owens, G., Crossman, A.R., Dudek, H., Taupignon, A., et al., 2003. Sonic hedgehog is a neuromodulator in the adult subthalamic nucleus. *Faseb J* 17(15):2337-2338.
- [7] Farmer, W.T., Abrahamsson, T., Chierzi, S., Lui, C., Zaelzer, C., Jones, E.V., et al., 2016. Neurons diversify astrocytes in the adult brain through sonic hedgehog signaling. *Science* 351(6275):849-854.
- [8] Liu, Y., Yuelling, L.W., Wang, Y., Du, F., Gordon, R.E., O'Brien, J.A., et al., 2017. Astrocytes Promote Medulloblastoma Progression through Hedgehog Secretion. *Cancer Res* 77(23):6692-6703.
- [9] Tirou, L., Russo, M., Faure, H., Pellegrino, G., Sharif, A., Ruat, M., 2020. C9C5 positive mature oligodendrocytes are a source of Sonic Hedgehog in the mouse brain. *PLoS One* 15(2):e0229362.
- [10] Gonzalez-Reyes, L.E., Verbitsky, M., Blesa, J., Jackson-Lewis, V., Paredes, D., Tillack, K., et al., 2012. Sonic hedgehog maintains cellular and neurochemical homeostasis in the adult nigrostriatal circuit. *Neuron* 75(2):306-319.
- [11] Ferent, J., Zimmer, C., Durbec, P., Ruat, M., Traiffort, E., 2013. Sonic Hedgehog Signaling Is a Positive Oligodendrocyte Regulator during Demyelination. *J Neurosci* 33(5):1759-1772.
- [12] 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(7573):448-452.
- [13] Ruat, M., Hoch, L., Faure, H., Rognan, D., 2014. Targeting of Smoothened for therapeutic gain. *Trends Pharmacol Sci* 35(5):237-246.
- [14] Kong, J.H., Siebold, C., Rohatgi, R., 2019. Biochemical mechanisms of vertebrate hedgehog signaling. *Development* 146(10).
- [15] Bourikas, D., Pekarik, V., Baeriswyl, T., Grunditz, A., Sadhu, R., Nardo, M., et al., 2005. Sonic hedgehog guides commissural axons along the longitudinal axis of the spinal cord. *Nat Neurosci* 8(3):297-304.
- [16] 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(11):4482-4487.
- [17] 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(20):3927-3936.

- [18] 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(3):349-362.
- [19] 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(5634):843-846.
- [20] D'Amico, D., Antonucci, L., Di Magno, L., Coni, S., Sdruscia, G., Macone, A., et al., 2015. Non-canonical Hedgehog/AMPK-Mediated Control of Polyamine Metabolism Supports Neuronal and Medulloblastoma Cell Growth. *Dev Cell* 35(1):21-35.
- [21] Teperino, R., Amann, S., Bayer, M., McGee, S.L., Loipetzberger, A., Connor, T., et al., 2012. Hedgehog Partial Agonism Drives Warburg-like Metabolism in Muscle and Brown Fat. *Cell* 151(2):414-426.
- [22] Fleury, A., Hoch, L., Martinez, M.C., Faure, H., Taddei, M., Petricci, E., et al., 2016. Hedgehog associated to microparticles inhibits adipocyte differentiation via a non-canonical pathway. *Sci Rep* 6:23479.
- [23] Garcia-Caceres, C., Quarta, C., Varela, L., Gao, Y., Gruber, T., Legutko, B., et al., 2016. Astrocytic Insulin Signaling Couples Brain Glucose Uptake with Nutrient Availability. *Cell* 166(4):867-880.
- [24] Garcia-Caceres, C., Baland, E., Prevot, V., Luquet, S., Woods, S.C., Koch, M., et al., 2019. Role of astrocytes, microglia, and tanycytes in brain control of systemic metabolism. *Nat Neurosci* 22(1):7-14.
- [25] Dallerac, G., Zapata, J., Rouach, N., 2018. Versatile control of synaptic circuits by astrocytes: where, when and how? *Nat Rev Neurosci* 19(12):729-743.
- [26] 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 Neuroscience* 11:3199-3214.
- [27] 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(2):323-333.
- [28] Ferent, J., Cochard, L., Faure, H., Taddei, M., Hahn, H., Ruat, M., et al., 2014. Genetic activation of hedgehog signaling unbalances the rate of neural stem cell renewal by increasing symmetric divisions. *Stem Cell Reports* 3(2):312-323.
- [29] Masdeu, C., Faure, H., Coulombe, J., Schoenfelder, A., Mann, A., Brabet, I., et al., 2006. Identification and characterization of Hedgehog modulator properties after functional coupling of Smoothed to G15. *Biochem Biophys Res Commun* 349(2):471-479.
- [30] 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(5):839-850.
- [31] Peterfi, Z., Farkas, I., Denis, R.G.P., Farkas, E., Uchigashima, M., Fuzesi, T., et al., 2018. Endocannabinoid and nitric oxide systems of the hypothalamic paraventricular nucleus mediate effects of NPY on energy expenditure. *Mol Metab* 18:120-133.
- [32] Poizat, G., Alexandre, C., Al Rifai, S., Riffault, L., Crepin, D., Benomar, Y., et al., 2019. Maternal resistin predisposes offspring to hypothalamic inflammation and body weight gain. *PLoS One* 14(3):e0213267.
- [33] Zibat, A., Uhmman, A., Nitzki, F., Wijgerde, M., Frommhold, A., Heller, T., et al., 2009. Time-point and dosage of gene inactivation determine the tumor spectrum in conditional *Ptch* knockouts. *Carcinogenesis* 30(6):918-926.
- [34] Angot, E., Loulier, K., Nguyen-Ba-Charvet, K.T., Gadeau, A.P., Ruat, M., Traiffort, 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(9):2311-2320.

- [35] Andreu-Cervera, A., Anselme, I., Karam, A., Laclef, C., Catala, M., Schneider-Maunoury, S., 2019. The ciliopathy gene *Ftm/Rpgrip11* controls mouse forebrain patterning via region-specific modulation of Hedgehog/Gli signaling. *J Neurosci* 39(13):2398-2415.
- [36] Rivell, A., Petralia, R.S., Wang, Y.X., Clawson, E., Moehl, K., Mattson, M.P., et al., 2019. Sonic hedgehog expression in the postnatal brain. *Biol Open* 8(3).
- [37] Daynac, M., Tirou, L., Faure, H., Mouthon, M.A., Gauthier, L.R., Hahn, H., et al., 2016. Hedgehog Controls Quiescence and Activation of Neural Stem Cells in the Adult Ventricular-Subventricular Zone. *Stem Cell Reports* 7(4):735-748.
- [38] Augustin, R., 2010. The protein family of glucose transport facilitators: It's not only about glucose after all. *IUBMB Life* 62(5):315-333.
- [39] Lachaal, M., Spangler, R.A., Jung, C.Y., 2001. Adenosine and adenosine triphosphate modulate the substrate binding affinity of glucose transporter GLUT1 in vitro. *Biochim Biophys Acta* 1511(1):123-133.
- [40] Barca-Mayo, O., Pons-Espinal, M., Follert, P., Armirotti, A., Berdondini, L., De Pietri Tonelli, D., 2017. Astrocyte deletion of *Bmal1* alters daily locomotor activity and cognitive functions via GABA signalling. *Nat Commun* 8:14336.
- [41] Zhang, N., Zhang, Z., He, R., Li, H., Ding, S., 2020. GLAST-CreER(T2) mediated deletion of GDNF increases brain damage and exacerbates long-term stroke outcomes after focal ischemic stroke in mouse model. *Glia*.
- [42] Petrova, R., Garcia, A.D., Joyner, A.L., 2013. Titration of GLI3 repressor activity by sonic hedgehog signaling is critical for maintaining multiple adult neural stem cell and astrocyte functions. *J Neurosci* 33(44):17490-17505.
- [43] Bai, C.B., Stephen, D., Joyner, A.L., 2004. All mouse ventral spinal cord patterning by hedgehog is Gli dependent and involves an activator function of Gli3. *Dev Cell* 6(1):103-115.
- [44] Bowers, M., Eng, L., Lao, Z., Turnbull, R.K., Bao, X., Riedel, E., et al., 2012. Limb anterior-posterior polarity integrates activator and repressor functions of GLI2 as well as GLI3. *Dev Biol* 370(1):110-124.
- [45] Hill, S.A., Blaeser, A.S., Coley, A.A., Xie, Y., Shepard, K.A., Harwell, C.C., et al., 2019. Sonic hedgehog signaling in astrocytes mediates cell-type-specific synaptic organization. *Elife* 8.
- [46] Djukic, B., Casper, K.B., Philpot, B.D., Chin, L.S., McCarthy, K.D., 2007. Conditional knock-out of Kir4.1 leads to glial membrane depolarization, inhibition of potassium and glutamate uptake, and enhanced short-term synaptic potentiation. *J Neurosci* 27(42):11354-11365.
- [47] Tong, X., Ao, Y., Faas, G.C., Nwaobi, S.E., Xu, J., Haustein, M.D., et al., 2014. Astrocyte Kir4.1 ion channel deficits contribute to neuronal dysfunction in Huntington's disease model mice. *Nat Neurosci* 17(5):694-703.
- [48] Timper, K., Bruning, J.C., 2017. Hypothalamic circuits regulating appetite and energy homeostasis: pathways to obesity. *Dis Model Mech* 10(6):679-689.
- [49] Yang, Z.J., Ellis, T., Markant, S.L., Read, T.A., Kessler, J.D., Bourbonlous, M., et al., 2008. Medulloblastoma can be initiated by deletion of Patched in lineage-restricted progenitors or stem cells. *Cancer Cell* 14(2):135-145.
- [50] Goodrich, L.V., Milenkovic, L., Higgins, K.M., Scott, M.P., 1997. Altered neural cell fates and medulloblastoma in mouse patched mutants. *Science* 277(5329):1109-1113.
- [51] Li, Z., Zhang, H., Denhard, L.A., Liu, L.H., Zhou, H., Lan, Z.J., 2008. Reduced white fat mass in adult mice bearing a truncated Patched 1. *Int J Biol Sci* 4(1):29-36.
- [52] Dlugosz, A., Agrawal, S., Kirkpatrick, P., 2012. Vismodegib. *Nat Rev Drug Discov* 11(6):437-438.
- [53] Burness, C.B., 2015. Sonidegib: First Global Approval. *Drugs* 75(13):1559-1566.

- [54] 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.
- [55] Pospisilik, J.A., Schramek, D., Schnidar, H., Cronin, S.J., Nehme, N.T., Zhang, X., et al., 2010. *Drosophila* genome-wide obesity screen reveals hedgehog as a determinant of brown versus white adipose cell fate. *Cell* 140(1):148-160.
- [56] Nosavanh, L., Yu, D.H., Jaehnig, E.J., Tong, Q., Shen, L., Chen, M.H., 2015. Cell-autonomous activation of Hedgehog signaling inhibits brown adipose tissue development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112(16):5069-5074.
- [57] Braune, J., Weyer, U., Matz-Soja, M., Hobusch, C., Kern, M., Kunath, A., et al., 2017. Hedgehog signalling in myeloid cells impacts on body weight, adipose tissue inflammation and glucose metabolism. *Diabetologia* 60(5):889-899.
- [58] Lee, H.J., Jo, S.B., Romer, A.L., Lim, H.J., Kim, M.J., Koo, S.H., et al., 2015. Overweight in mice and enhanced adipogenesis in vitro are associated with lack of the hedgehog coreceptor *boc*. *Diabetes* 64(6):2092-2103.
- [59] Ruud, J., Steculorum, S.M., Bruning, J.C., 2017. Neuronal control of peripheral insulin sensitivity and glucose metabolism. *Nat Commun* 8:15259.
- [60] Arch, J.R., Hislop, D., Wang, S.J., Speakman, J.R., 2006. Some mathematical and technical issues in the measurement and interpretation of open-circuit indirect calorimetry in small animals. *Int J Obes (Lond)* 30(9):1322-1331.
- [61] Even, P.C., Mokhtarian, A., Pele, A., 1994. Practical aspects of indirect calorimetry in laboratory animals. *Neurosci Biobehav Rev* 18(3):435-447.

## Figure legends

**Figure 1: Analysis of Hedgehog signaling in the mouse hypothalamus.** (A) Western blot analysis of Hedgehog (Hh) protein levels in brain tissues from adult mice (n=3) and in HEK293 cells transfected with a mouse Sonic Hedgehog (HEK(mShh)) or control (HEK(mock)) vector. N19 and 167Ab Shh antibodies reveal bands at 47 kDa and 22 kDa corresponding to Shh protein precursor and active form, respectively. Tubulin served as a loading control (SVZ, subventricular zone of the lateral ventricles). (B-F) RNAscope for Patched (Ptc) mRNA combined with immunohistofluorescence for GFAP (C), S100 $\beta$  (D), HuC/D (F) or with RNAscope for *Glast* mRNA (E) on coronal sections of the tuberal region of the hypothalamus from adult mice. Higher magnifications show Ptc mRNA (yellow arrowheads) in GFAP<sup>+</sup> (C), S100 $\beta$ <sup>+</sup> (D), *Glast*<sup>+</sup> (E), and HuC/D<sup>+</sup> (F) cells in the hypothalamic parenchyma and presented in merge and single channels with the nuclear marker DAPI. (G-I) RNAscope for *Gli1* (G), *Gli2* (H), *Gli3* (I) mRNAs combined with RNAscope for *Glast* mRNA (G, H) and with immunohistofluorescence for S100 $\beta$  (G-I) on coronal sections of the tuberal region of the hypothalamus showing the ventromedial hypothalamic nuclei from adult mice. Magnifications show expression of *Gli1*, *Gli2* and *Gli3* mRNAs in *Glast*<sup>+</sup>S100 $\beta$ <sup>+</sup> cells (G, H) and S100 $\beta$ <sup>+</sup> cells (I) (white arrowheads), respectively, and presented in merge and single channels with the nuclear marker DAPI. Staining was replicated on three mice. Scale bars, 100  $\mu$ m in (B) and 20  $\mu$ m in (C-I). 3V, third ventricle.

**Figure 2. Removal of Patched receptor from *Glast* expressing cells in the mouse hypothalamus.** (A-B) Immunohistofluorescence for YFP, GFAP and HuC/D on coronal sections of the tuberal region of the hypothalamus showing the ventromedial hypothalamic nucleus (VMH) of YFP-Ptc<sup>+/+</sup> (A) and YFP-Ptc<sup>-/-</sup> (B) mice 7 days after tamoxifen (Tx). Dashed

boxes shown at higher magnification highlight expression of YFP reporter (arrowheads) in GFAP<sup>+</sup> cells but not in HuC/D<sup>+</sup> cells in YFP-Ptc<sup>+/+</sup> and YFP-Ptc<sup>-/-</sup> mice by confocal analysis. (C) RT-PCR analysis of Ptc expression in hypothalamic extracts from YFP-Ptc<sup>+/+</sup> (n=3) and YFP-Ptc<sup>-/-</sup> (n=3) mice 4 weeks after Tx. Ptc mRNA (Ptc, 731 bp) is detected in all groups. Deleted Ptc mRNA fragment (Ptc<sup>del</sup>, 451 bp) is revealed only in YFP-Ptc<sup>-/-</sup> mice as well as a splice variant of Ptc mRNA (Ptc $\Delta$ 10, 575 bp). GAPDH mRNA amplification served as a control. (D) Scheme representing Ptc mRNA (exons 3 to 11, E3-E11) and resulting Ptc<sup>del</sup> mRNA obtained after recombination (lower panel). Ptc<sup>del</sup> probe for multiplex *in situ* hybridization is targeting regions of Ptc mRNA corresponding to the floxed region (exons 8 and 9) (Zibat et al, *Carcinogenesis*, 2009). (E, H) RNAscope at the level of the tuberal region of the hypothalamus from YFP-Ptc<sup>+/+</sup> and YFP-Ptc<sup>-/-</sup> mice 10 days after Tx, for Ptc<sup>del</sup> (E-H) and *Glast* (G, H), combined with immunohistofluorescence for S100 $\beta$  (G, H). (G-H) High magnifications, presented in merge and single channels with the nuclear marker DAPI, show Ptc<sup>del</sup> signal in *Glast*<sup>+</sup>S100 $\beta$ <sup>+</sup> cells of YFP-Ptc<sup>+/+</sup> mice (G, yellow arrowheads) but not in YFP-Ptc<sup>-/-</sup> mice (H, yellow arrowheads). As expected, Ptc<sup>del</sup> signal is present in cells negative for *Glast* and S100 $\beta$  in both YFP-Ptc<sup>+/+</sup> and YFP-Ptc<sup>-/-</sup> mice (G-H, white arrowheads). (I) Quantitative analysis of Ptc<sup>del</sup> cells in *Glast*<sup>+</sup>S100 $\beta$ <sup>+</sup> cells population in the arcuate nucleus (ARC) and the VMH of YFP-Ptc<sup>+/+</sup> and YFP-Ptc<sup>-/-</sup> mice 10 days after Tx. Bar graphs represent mean  $\pm$  SEM. n = 3 mice/group; \*\*\*, p < 0.001 by Student's t-test. Staining (A, B, E-H) was replicated on three mice. Scale bars, 20  $\mu$ m in (A-B, G-H) and 100  $\mu$ m in (E-F). 3V, third ventricle.

**Figure 3: Analysis of Hedgehog signaling in *Glast*<sup>+</sup> astrocytes after Patched deletion.** (A) mRNA levels for *Gli1*, *Gli2* and *Gli3* measured by qRT-PCR in the hypothalamus and the cerebral cortex of YFP-Ptc<sup>+/+</sup> and YFP-Ptc<sup>-/-</sup> mice 4 weeks after tamoxifen (Tx). Actin served

as a housekeeping gene for relative mRNA expression levels (n=4 mice). (B) RNAscope for *Gli1* and counterstaining for DAPI on coronal sections of the tuberal region of the hypothalamus highlighting the ventromedial hypothalamic nuclei and cerebral cortex of YFP-Ptc<sup>+/+</sup> and YFP-Ptc<sup>-/-</sup> mice 10 days after Tx. Insets highlight the difference of RNAscope signal intensity between hypothalamus and cerebral cortex at the level of a single cell. (C) Quantitative analysis of RNAscope signals for *Gli1* mRNA in *Glast*<sup>+</sup> and *S100β*<sup>+</sup> cells in hypothalamic nuclei and cerebral cortex from YFP-Ptc<sup>+/+</sup> and YFP-Ptc<sup>-/-</sup> mice. Bar graphs (A, C) represent mean ± SEM. n = 3-4 mice/group, \*p<0.05 by Mann and Whitney test. Staining was replicated on three mice. Scale bars, 50 μm in (B). ARC, arcuate; VMH, ventromedial hypothalamic nucleus; DMH, dorsomedial hypothalamic nucleus.

**Figure 4: Long-term deletion of Patched in *Glast*<sup>+</sup> astrocytes prevents age-associated metabolic alterations.** (A) Representative images of YFP-Ptc<sup>+/+</sup> and YFP-Ptc<sup>-/-</sup> mice 20 weeks after tamoxifen (Tx) treatment. (B) Time course of body weight. Data are represented as mean ± SEM, (n = 7-10 mice/group). (C) Dissected subcutaneous (SAT), visceral (VAT) and brown (BAT) adipose tissues from YFP-Ptc<sup>+/+</sup> and YFP-Ptc<sup>-/-</sup> mice 32 weeks after Tx. (D) Ratio of total organ to body weights. Mass of SAT, VAT and BAT were reduced in YFP-Ptc<sup>-/-</sup> mice whereas liver mass did not differ between the two cohorts of mice. Data are represented as mean ± SEM. n = 6-9 mice/group for SAT, VAT and BAT, n= 3-4 mice/group for liver. (E) Representative hematoxylin and eosin (H&E) stained sections of SAT, VAT and BAT. Histology analysis of white and brown tissues shows a strong reduction of cell size in SAT, VAT and BAT in YFP-Ptc<sup>-/-</sup> mice compared to their control littermates. H&E staining was replicated on four mice per group. Scale bars, 100 μm. (F) Rectal temperature of YFP-Ptc<sup>+/+</sup> (35.8 ± 0.2°C) and YFP-Ptc<sup>-/-</sup> (35.5 ± 0.4°C) mice was not different 25 weeks after Tx. Bar graphs represent mean ± SEM. n = 14-16 mice/group. (G-H) Plasma insulin levels of overnight

fasted YFP-Ptc<sup>+/+</sup> and YFP-Ptc<sup>-/-</sup> mice 4 (G) and 32 weeks (H) after Tx. Bar graphs represent mean  $\pm$  SEM. n = 6-8 mice/group. (I-J) Evolution over time of glucose (I) and insulin (J) responses assessed by glucose and insulin tolerance tests performed on fasted YFP-Ptc<sup>+/+</sup> and YFP-Ptc<sup>-/-</sup> mice. Weeks after Tx are indicated. Insets represent area under curve (AUC) of the associated graphs. Data are represented as mean  $\pm$  SEM. n = 4-7 mice/group. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001; NS, no significant change by Student's t-test. GTT, glucose tolerance test; ITT, insulin tolerance test.

**Figure 5: Mice deleted for Ptc in Glast<sup>+</sup> astrocytes exhibit alterations of substrate profile.**

(A) Mean food intake reported to lean body weight (BW) during day, night and summed in YFP-Ptc<sup>+/+</sup> and YFP-Ptc<sup>-/-</sup> mice 13 weeks after tamoxifen. (B) Energy expenditure normalized per BW. (C) Locomotor activity expressed as 24 h representative profile. (D and E) Respiratory exchange ratio (RER) 24h profile (D) and representative bar graph showing the mean during day and night (E). (F and G) Fatty acid oxidation 24h profile (F) and representative bar graph of the mean during day and night (G). Data are represented as mean  $\pm$  SEM. n = 6 mice/group, \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001.

**Figure 6: Ptc deletion in Glast<sup>+</sup> cells blocks HFD-induced obesity and alteration of glucose response.**

(A) Diagram representing course of experiments: high fat diet (HFD) was started 11 weeks after the end of tamoxifen treatment (Tx) and lasted for 12 weeks. Glucose tolerance tests (GTT) were performed 10 and 20 weeks after Tx and insulin tolerance test (ITT) 22 weeks after Tx. Mice were euthanized and tissues samples taken 23 weeks after Tx. (B) Representative images of YFP-Ptc<sup>+/+</sup> and YFP-Ptc<sup>-/-</sup> mice after 12 weeks of HFD. (C) Time course of body weight reported to first measure done just after Tx treatment in YFP-Ptc<sup>+/+</sup> and YFP-Ptc<sup>-/-</sup> mice.

Data are represented as mean  $\pm$  SEM. n= 8-11 mice/group \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 by Student's t-test. (D-E) Dissected livers (D) and ratio of total organ to body weights (E) at the end of the HFD challenge. Mass of SAT, VAT and BAT were reduced in YFP-Ptc<sup>-/-</sup> whereas liver, spleen, kidney and heart mass did not differ significantly between the two cohorts. Data are represented as mean  $\pm$  SEM from n = 4-6 mice/group. \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 by Student's t-test. (F-H) Blood glucose levels measured during glucose (F and G) and insulin (H) tolerance tests on fasted YFP-Ptc<sup>+/+</sup> and YFP-Ptc<sup>-/-</sup> mice. Insets represent area under the curve (AUC) of the associated graphs. Data are represented as mean  $\pm$  SEM. n = 6 mice/group, \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 by Student's t-test. GTT, glucose tolerance test; ITT, insulin tolerance test; SAT, subcutaneous adipose tissue; VAT, visceral adipose tissue; BAT, brown adipose tissue.

**Figure 7: Effect of Ptc deletion in Glast<sup>+</sup> cells on the regulation of genes implicated in insulin response, transport and inflammation.** mRNA transcripts levels for genes involved in the regulation of the insulin pathway, of glucose and glutamate transport and inflammation measured by qRT-PCR in the hypothalamus and the cerebral cortex of YFP-Ptc<sup>+/+</sup> and YFP-Ptc<sup>-/-</sup> mice 4 weeks (A) and 32 weeks (B) after tamoxifen. Actin was used as a housekeeping gene for relative mRNA expression levels. Bar graphs represent mean  $\pm$  SEM. n=3-4 mice/group, \*p<0.05 by Mann and Whitney test.

**Figure 8: Glucose uptake is not affected in hypothalamic astrocytes and in mouse embryonic fibroblasts upon Ptc deletion *in vitro*.** (A-B) Primary cultures of hypothalamic astrocytes from YFP-Ptc<sup>fl/fl</sup> mice were infected with AAV-GFP (A) as control, or AAV-Cre (B) to induce YFP expression and Ptc deletion upon recombination (see Fig. Sup. 6). Five days

post-infection, cells expressed GFP or YFP as detected by immunofluorescence with a GFP antibody. (C) Cytochalasin B (10  $\mu$ M) inhibited (79.5%) glucose uptake in cultured astrocytes infected with AAV-GFP as assessed using a 15 min [ $^3$ H]-2-deoxy-D-glucose ( $^3$ H-DG) uptake assay. No difference in  $^3$ H-DG glucose uptake was observed in astrocytes infected with AAV-Cre compared to astrocytes infected with AAV-GFP indicating that Ptc deletion did not affect significantly the endogenous tone of glucose uptake in these cells. Data are from three infections on three different cultures (n = 17, AAV-GFP; n = 19, AAV-Cre; n = 3 Cytochalasin B). (D) Ptc<sup>-/-</sup> and Smo<sup>-/-</sup> MEFs were subjected to  $^3$ H-DG glucose uptake after transfection with an empty control vector (Mock) or a vector for Ptc (Ptc<sup>-/-</sup> MEF) or Smo (Smo<sup>-/-</sup> MEF) expression, respectively, for rescue (see Figure Sup. 6C-D). Analysis of  $^3$ H-DG uptake assay (15 min) measured 48 h after transfection indicated no difference between mocked or rescued cells (n = 10 -12) whereas Cytochalasin B (10  $\mu$ M) inhibited more than 95% of  $^3$ H-DG uptake in mocked cells (n = 3). These data suggested that both Ptc and Smo did not modify the baseline of glucose uptake in these cells. Scale bars, 100  $\mu$ m. Bar graphs represent mean  $\pm$  SEM. \*\*\*p<0.001 by Student's t-test. NS, no significant change.

**Figure Sup. 1. Characterization of N19 and 167Ab antibodies directed against Shh.**

(A) Western blot of protein homogenates from HEK293 cells transfected with a mouse Shh (HEK(mShh)) or control vector (HEK(mock)) and from subventricular zone of the lateral ventricles (SVZ), hypothalamic (Hypothalamus), cerebellar (Cerebellum) or cerebrocortical (Cortex) tissues of adult mice with 167Ab (A, B) and N19 (C, D) antibodies. A 22 kDa band, the expected size for the aminoterminal fragment of Shh (ShhN) and a 47 kDa signal corresponding to the uncleaved Shh protein were detected in HEK(mShh) cells but was absent in HEK(mock) cells (A, C) and in blocking experiments (B, D). The 22 kDa ShhN band was evidenced in tissues with 167Ab (A) but not with N19 antibodies (C) and was absent in

blocking experiments (B). The 47 kDa band was evidenced in tissues with N19 antibodies (C) but not with 167Ab (A) and was absent in blocking experiments (D). Tubulin served as a loading control. n = 3-10 mice.

**Figure Sup. 2. YFP reporter is expressed in GFAP<sup>+</sup> and S100 $\beta$ <sup>+</sup> astrocytes but not cells of the oligodendrocyte lineage.** Immunostaining of coronal brain sections from YFP-Ptc<sup>+/+</sup> mice 7 days after Tamoxifen in the hypothalamus parenchyma for YFP reporter (B, D, F, H, J, L), glial markers S100 $\beta$  (C-D) and GFAP (G-H) and oligodendroglial precursor cell marker NG2 (K-L). YFP<sup>+</sup>S100 $\beta$ <sup>+</sup> (A-D, white arrows) and YFP<sup>+</sup>GFAP<sup>+</sup> (E-H, white arrows) cells are present in the hypothalamus parenchyma while NG2<sup>+</sup> cells do not display YFP signal (I-L, white arrowheads). Scale bars, 20  $\mu$ m.

**Figure Sup. 3. Gli1 transcripts are differentially expressed by Glast<sup>+</sup>S100 $\beta$ <sup>+</sup> astrocytes of the hypothalamic parenchyma compared to the cerebral cortex in YFP-Ptc<sup>+/+</sup> and YFP-Ptc<sup>-/-</sup> mice.** (A-L<sup>4</sup>) RNAscope for Gli1 and Glast mRNA combined with immunohistofluorescence for S100 $\beta$  on coronal sections of the tuberal region of the hypothalamus (A-F<sup>4</sup>) and the cerebral cortex (G-L<sup>4</sup>) from YFP-Ptc<sup>+/+</sup> (A-C<sup>4</sup>, G-I<sup>4</sup>) and YFP-Ptc<sup>-/-</sup> (D-F<sup>4</sup>, J-L<sup>4</sup>) mice 10 days post-tamoxifen. In YFP-Ptc<sup>+/+</sup> mice, Gli1 mRNA signal is stronger in hypothalamus parenchyma (A) compared to the cerebral cortex (G). Increased Gli1 signal is observed in the cortex of YFP-Ptc<sup>-/-</sup> (J-L<sup>4</sup>) compared to YFP-Ptc<sup>+/+</sup> (G-I<sup>4</sup>) mice. White squares highlight magnification of the ventromedial hypothalamic nuclei (B, E) and the cortex (H, K). Dashed boxes show *Gli1/Glast/S100 $\beta$*  triple positive cells presented in merge and single channels with the nuclear marker DAPI (C-C<sup>4</sup>, F-F<sup>4</sup>, I-I<sup>4</sup>, L-L<sup>4</sup>). Scale bars, 100  $\mu$ m in (A-B, D-E, G-H, J-K) and 20  $\mu$ m in (C-C<sup>4</sup>, F-F<sup>4</sup>, I-I<sup>4</sup>, L-L<sup>4</sup>).

**Figure Sup. 4. Distribution of Gli2 and Gli3 transcripts in *Glast*<sup>+</sup> and/or *S100β*<sup>+</sup> astrocytes from the hypothalamus parenchyma and the cerebral cortex of YFP-Ptc<sup>+/+</sup> and YFP-Ptc<sup>-/-</sup> mice.** (A, B) RNAscope for Gli2 (A) and Gli3 (B) mRNAs on coronal sections of the tuberal region of the hypothalamus showing the ventromedial hypothalamic nucleus (VMH) and the cerebral cortex of YFP-Ptc<sup>+/+</sup> and YFP-Ptc<sup>-/-</sup> mice 10 days after tamoxifen (Tx) treatment. Insets present RNAscope signal distribution and intensity in single cells. (A, B) Quantitative analysis of *Gli2*<sup>+</sup> cells (A) and *Gli3*<sup>+</sup> cells (B) in *Glast*<sup>+</sup>*S100β*<sup>+</sup> and *S100β*<sup>+</sup> cell populations, respectively, in the arcuate nucleus (ARC), VMH, dorsomedial hypothalamic nucleus (DMH) and the cerebral cortex. Bar graphs represent mean ± SEM, n = 3 mice/group (except for Gli2 in ARC of YFP-Ptc<sup>+/+</sup> mice, n = 2). \*p<0.05 by Mann and Whitney test. Scale bars, 100 μm in (A-B) and 10 μm in insets. (C) mRNA levels for Hedgehog signaling related genes measured by qRT-PCR in the hypothalamus of YFP-Ptc<sup>+/+</sup> and YFP-Ptc<sup>-/-</sup> mice 4 weeks after Tx. Actin was used as a housekeeping gene for relative mRNA expression. Bar graphs represent mean ± SEM, n=4 mice/group.

**Figure Sup. 5. Altered glucose response in YFP-Ptc<sup>-/-</sup> but not in YFP<sup>+/+</sup> mice occurs upon recombination and is observed in female YFP-Ptc<sup>-/-</sup> mice overtime.** (A) No difference in glucose tolerance test (GTT) was detected between YFP-Ptc<sup>+/+</sup> and YFP-Ptc<sup>-/-</sup> male mice 2 weeks before tamoxifen treatment (Tx). 3 weeks after Tx, the same YFP-Ptc<sup>-/-</sup> mice display improved glucose tolerance compared to control littermates. Data are represented as mean ± SEM. n= 4-6 mice/group. \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 by Mann and Whitney test. (B) Evolution over time of glucose responses assessed by GTT on fasted female YFP-Ptc<sup>+/+</sup> and YFP-Ptc<sup>-/-</sup> mice during GTT. Weeks after Tx are indicated. Insets represent area under curve (AUC) for

associated graph. Data are represented as mean  $\pm$  SEM. n = 5-7 mice/group, \*p<0.05 by Mann and Whitney test.

**Figure Sup. 6. Characterization of Hedgehog signaling genes expression in primary cultures of hypothalamic astrocytes, MEFs and NIH3T3 cells.** (A) RT-PCR analysis of *Ptc* expression in primary cultures of hypothalamic astrocytes from YFP-*Ptc*<sup>fl/fl</sup> mice infected with AAV-GFP or AAV-Cre. *Ptc* mRNA fragment (*Ptc*, 731bp) signal is lower in AAV-Cre infected samples. Deleted *Ptc* mRNA fragment (*Ptc*<sup>del</sup>, 451bp) is only identified in AAV-Cre infected samples indicating that AAV-Cre delivery led to efficient recombination of the *Ptc* floxed allele. GAPDH mRNA amplification served as control. (B) mRNA levels for *Gli1* measured by qRT-PCR in NIH3T3, *Ptc*<sup>-/-</sup> MEFs and *Smo*<sup>-/-</sup> MEFs. (C-D) mRNA levels for *Ptc* and *Smo* measured by qRT-PCR in *Ptc*<sup>-/-</sup> MEFs (C) and *Smo*<sup>-/-</sup> MEFs (D) after transfection with control plasmid (mock) and *Ptc* or *Smo* plasmid, respectively. GAPDH served as a housekeeping gene for relative mRNA expression. Data are from two independent experiments with three biological replicates. Data are represented as means  $\pm$  SEM. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 by Student's t-test. NS, no significant change.

## Supplementary Methods

### *Animals, indirect calorimetry and activity measurements using beam breaks*

Adults YFP-Ptc<sup>+/+</sup> and YFP-Ptc<sup>-/-</sup> mice were housed in stainless steel cages in a room maintained at  $22.5 \pm 1^\circ\text{C}$  with light from 7:00 am. to 7:00 pm. Food (#A03, Safe, Augy, France) and water were given ad libitum unless otherwise stated. Mice were kept individually for at least 7 days in their own metabolic cages with training bottle and training food container (TSE system) before the cage (bedding included) being placed in the calorimetric platform. All animals were acclimated for 48h in calorimetric cages before experimental measurements.

Mice were analyzed for whole energy expenditure (EE), oxygen consumption and carbon dioxide production, respiratory exchange rate ( $\text{RER} = \text{VCO}_2/\text{VO}_2$ , where V is volume), and locomotor activity using calorimetric cages with bedding, water and with or without food (Labmaster, TSE Systems GmbH, Bad Homburg, Germany). The ratio of gases was determined through an indirect open circuit calorimeter [S1, S2] [60; 61]. This system monitors O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> concentration by volume at the inlet ports of a tide cage through which a known flow of air is being ventilated (0.4 L/min), and compared regularly to a reference empty cage. The air sensors were calibrated with O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> mixture of known concentrations (Air Liquide, S.A. France). Oxygen consumption, carbon dioxide production and EE were recorded every 10 min for each animal during the entire experiment. Whole energy expenditure was calculated using the Weir equation respiratory gas exchange measurements [S3]. Ambulatory movement was recorded using an infrared light beam-based activity monitoring system with online measurement at 100 Hz. Data analysis was performed using Excel XP using extracted raw value of VO<sub>2</sub> consumed, VCO<sub>2</sub> production (expressed in ml/h), and energy expenditure (Kcal/h). Subsequently, each value was normalized to whole lean tissue mass extracted from the EchoMRI analysis. D'après Peterfi et al, *Molecular Metabolism*, 2018.

### **Supplemental references**

[S1] Arch, J.R., Hislop, D., Wang, S.J., and Speakman, J.R. (2006). Some mathematical and technical issues in the measurement and interpretation of open-circuit indirect calorimetry in small animals. *International Journal of Obesity* 30, 1322-1331.

[S2] Even, P.C., Mokhtarian, A., and Pele, A. (1994). Practical aspects of indirect calorimetry in laboratory animals. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 18, 435-447.

[S3] Weir, J.B. (1949). New methods for calculating metabolic rate with special reference to protein metabolism. *The Journal of Physiology* 109, 1-9.

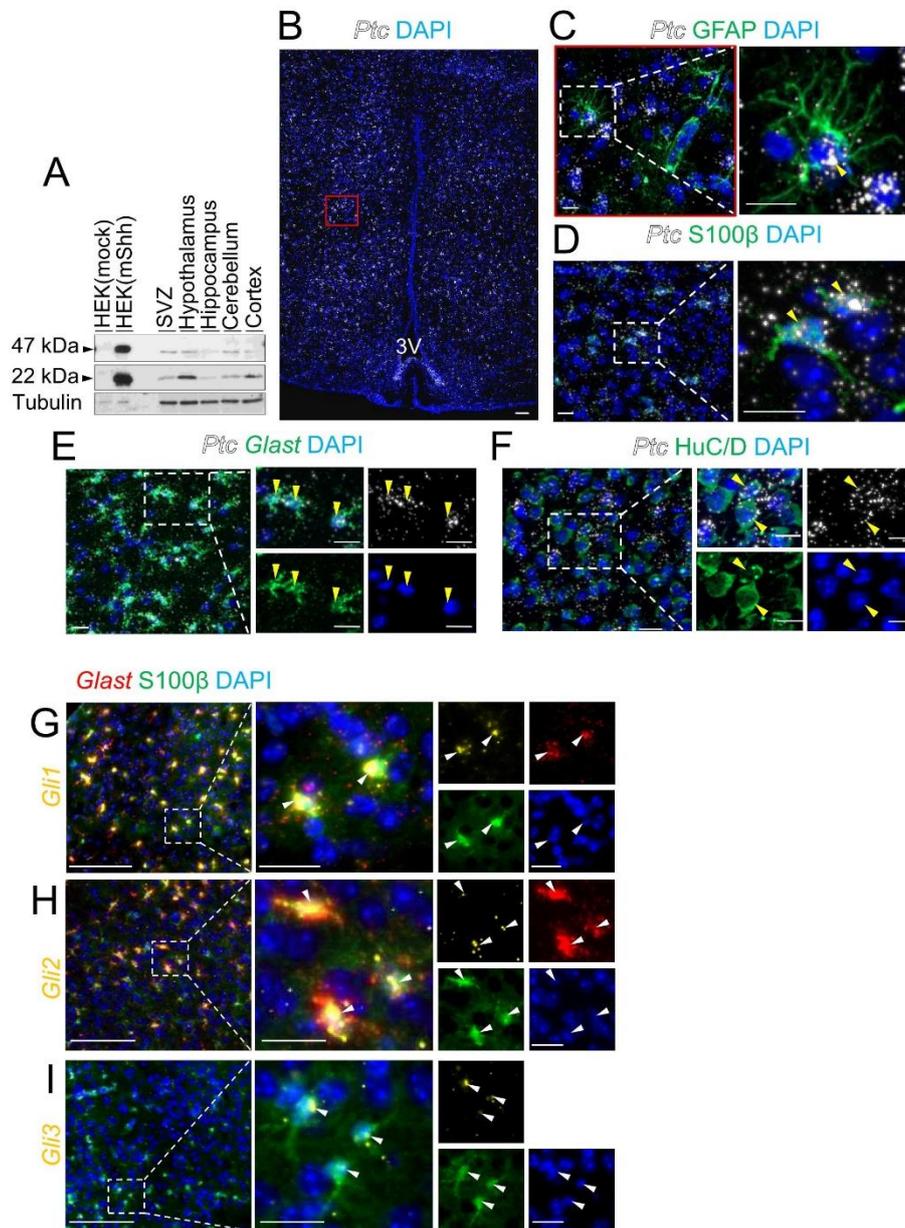


Figure 1.

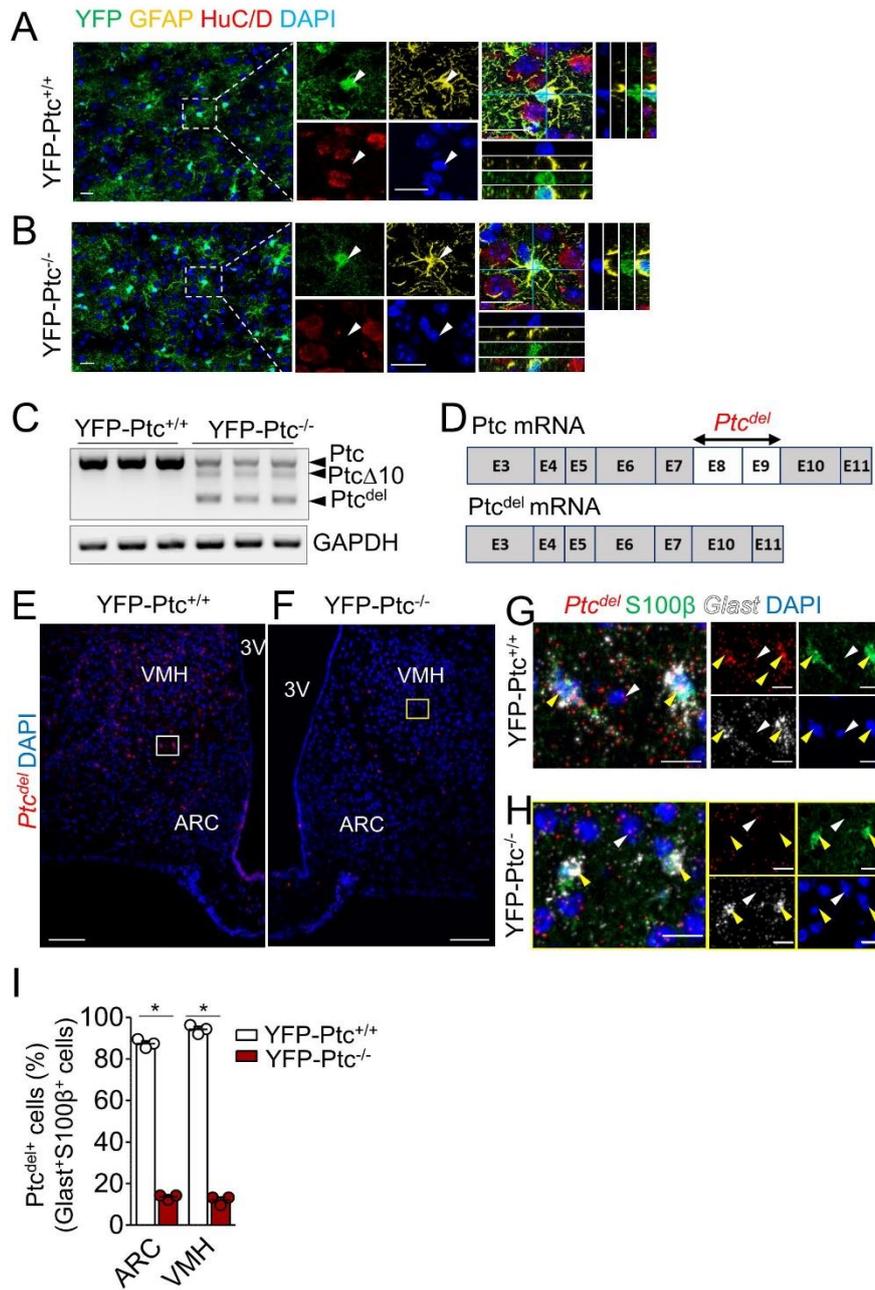
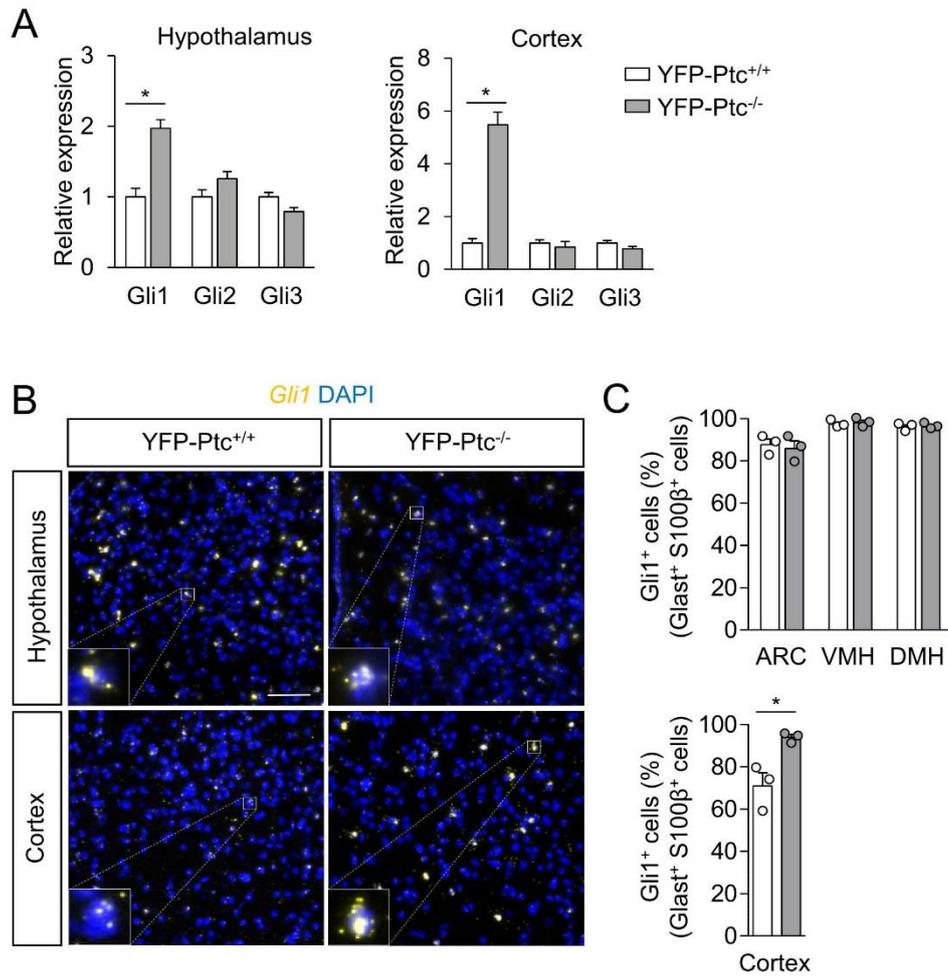
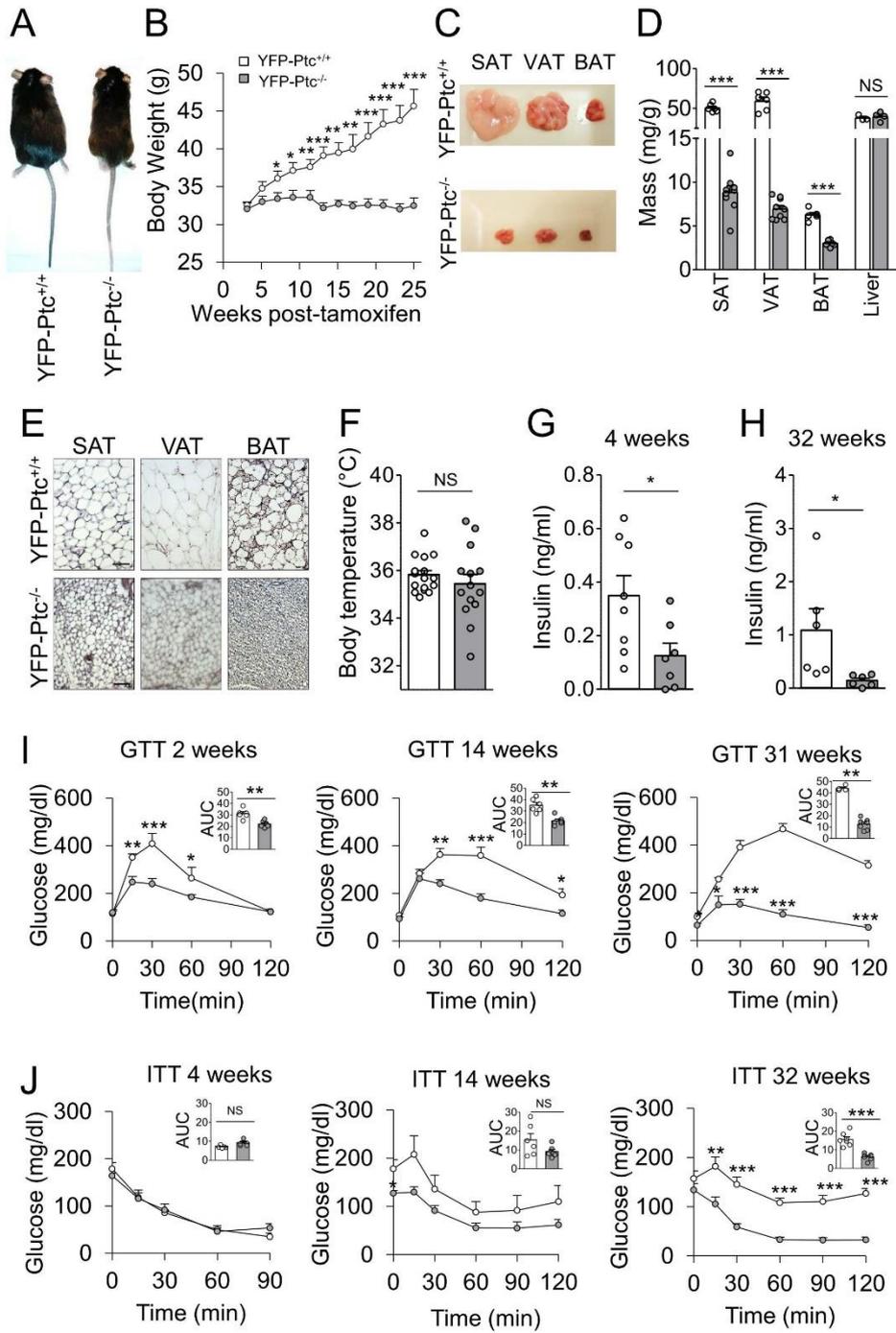


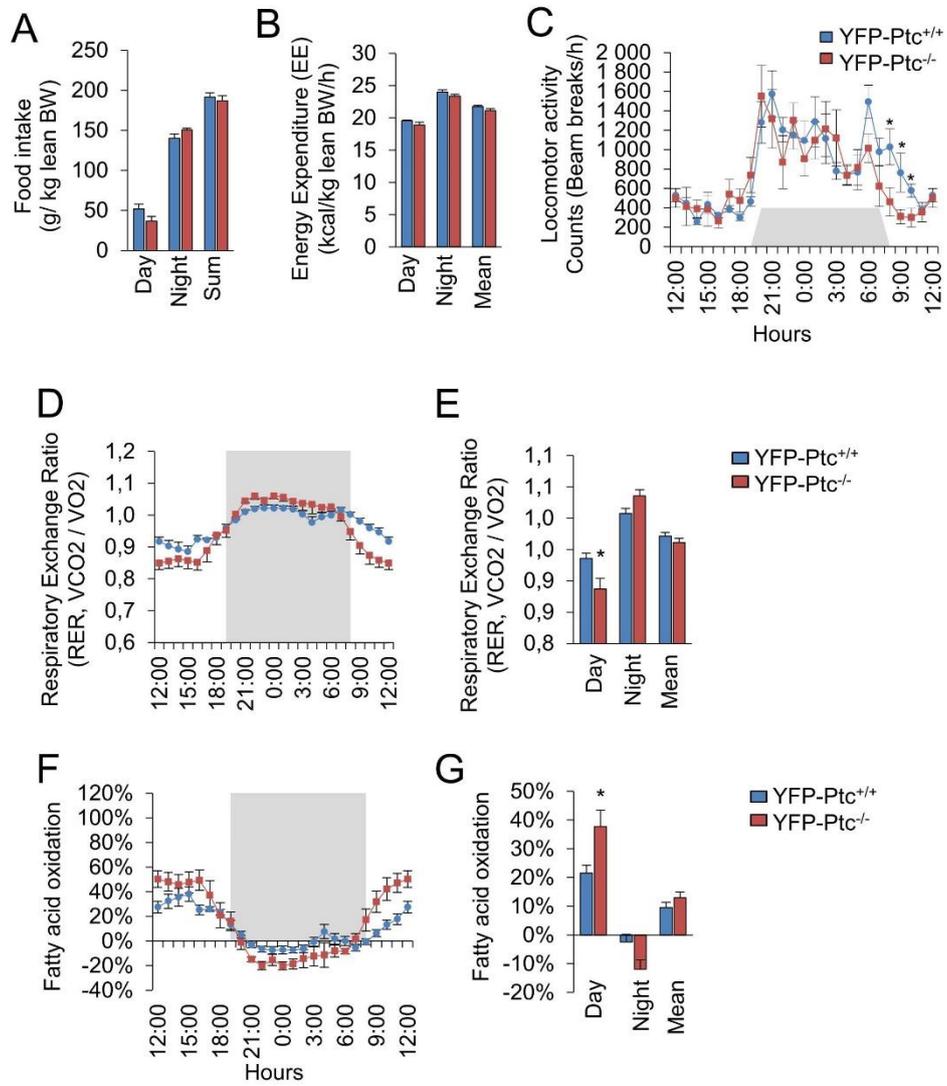
Figure 2.



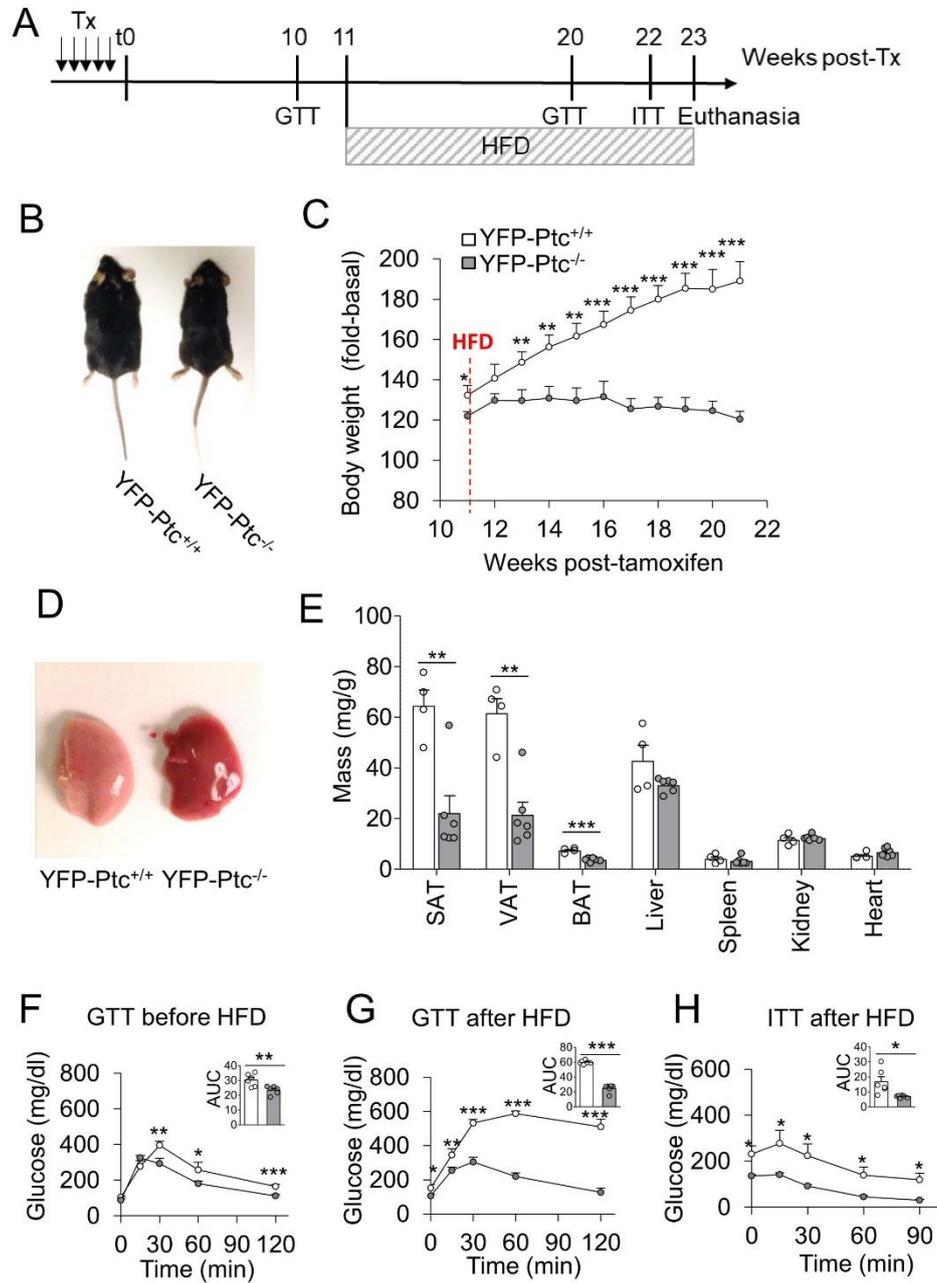
**Figure 3.**



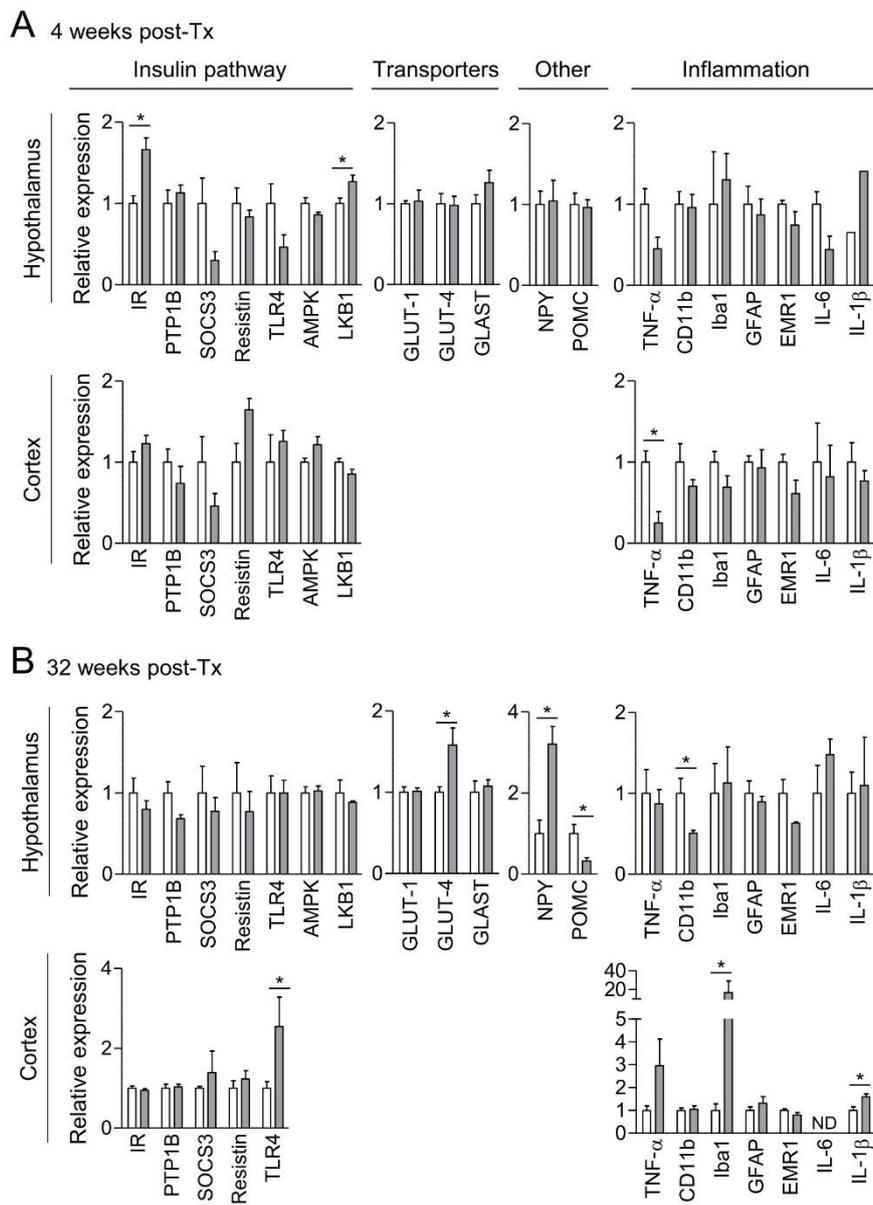
**Figure 4.**



**Figure 5.**



**Figure 6.**



**Figure 7.**

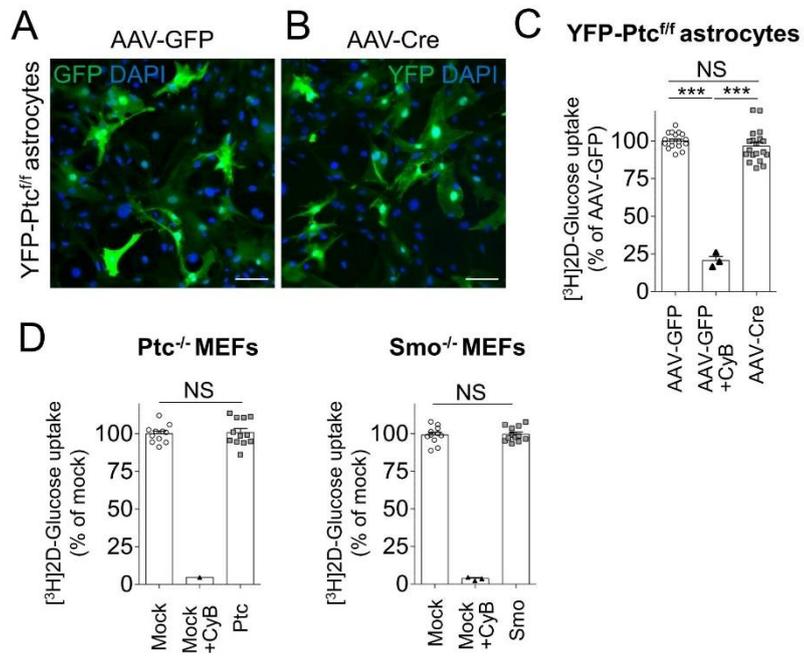
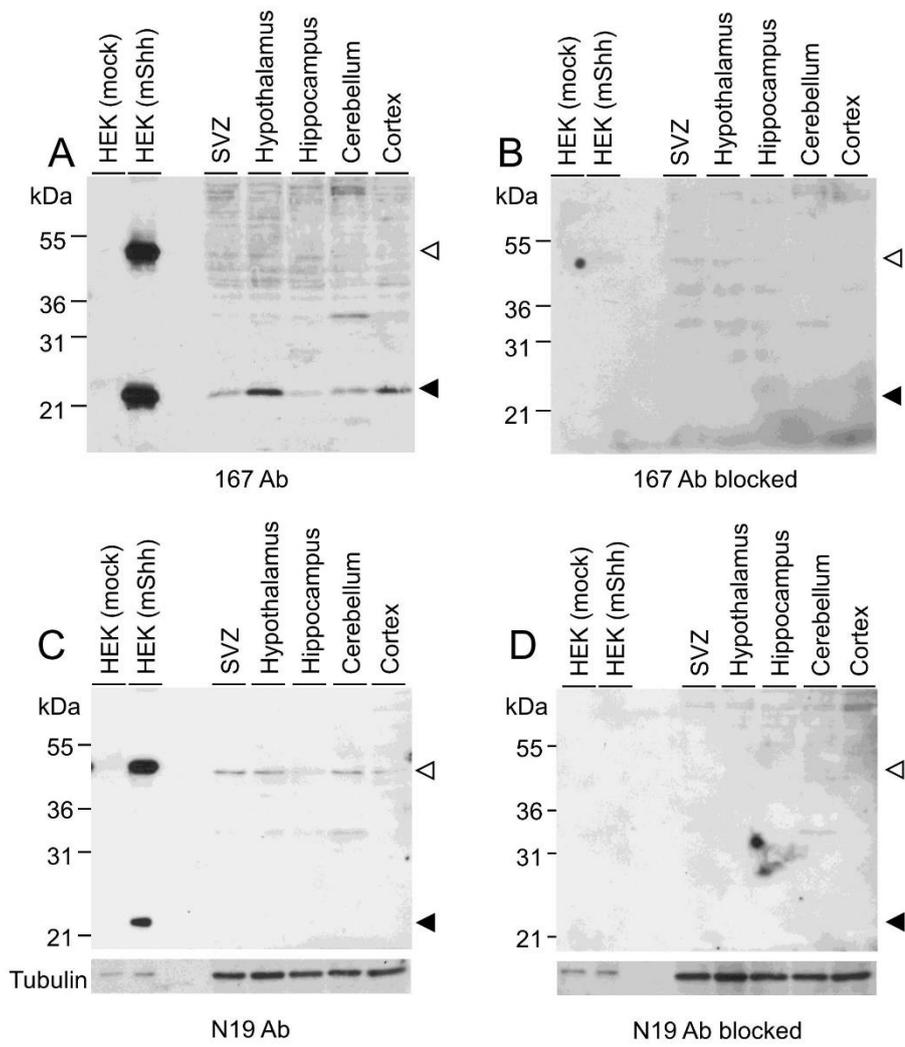


Figure 8.



**Figure Sup 1.**

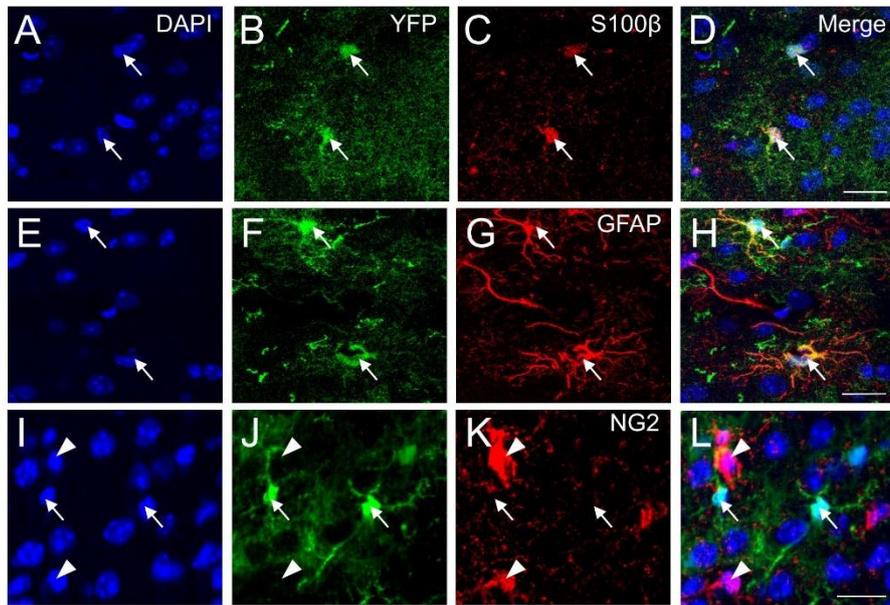


Figure Sup 2.

*Gli1* *Glast* *S100β* DAPI

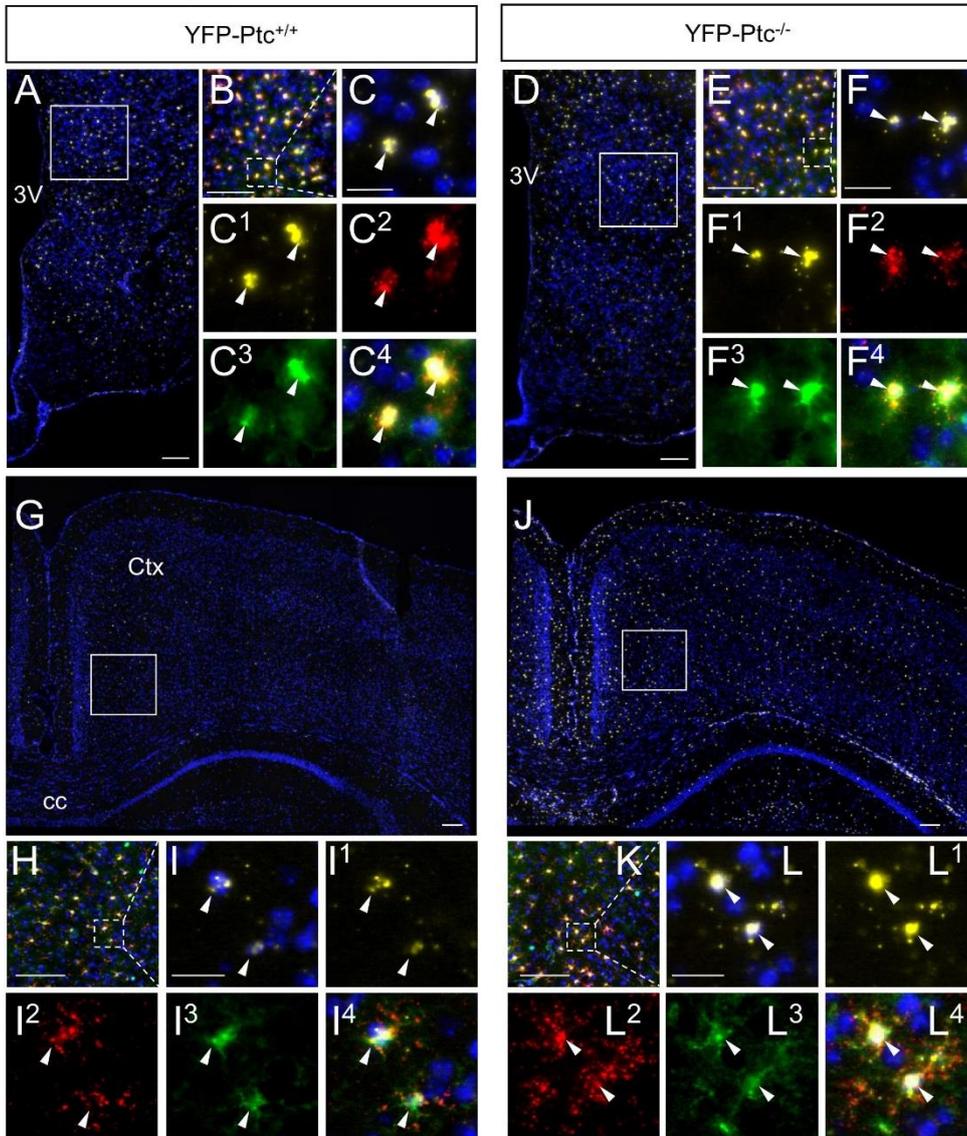
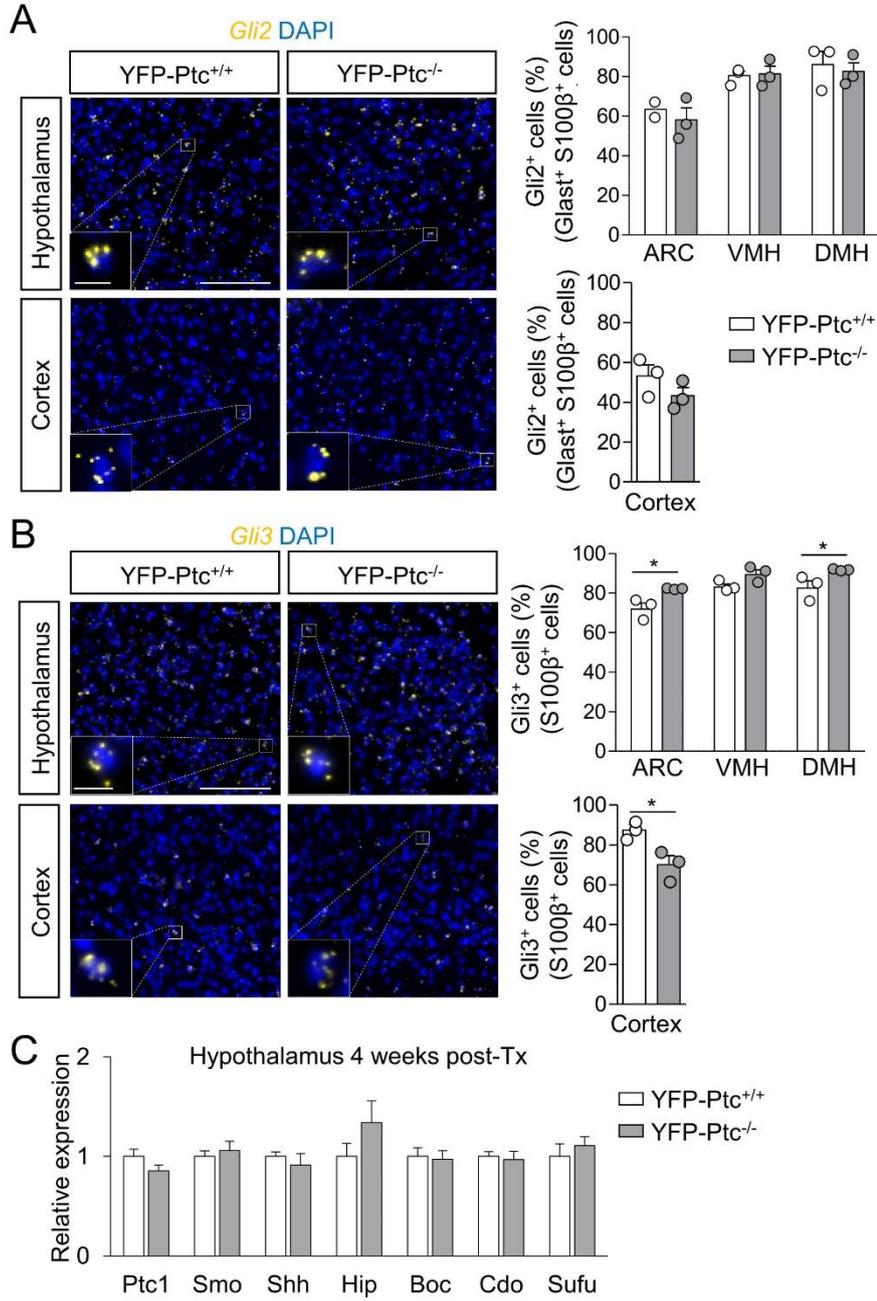


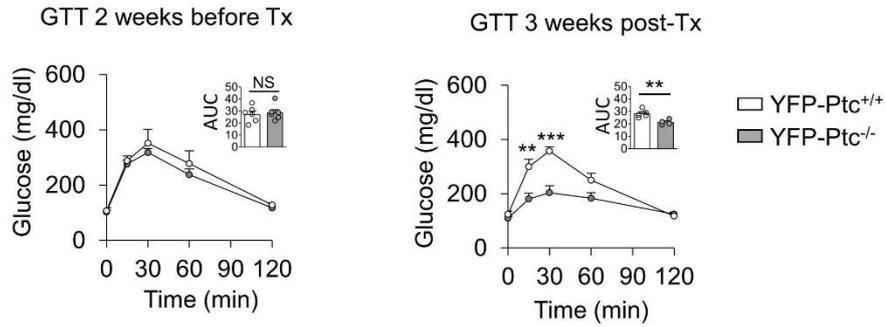
Figure Sup 3.



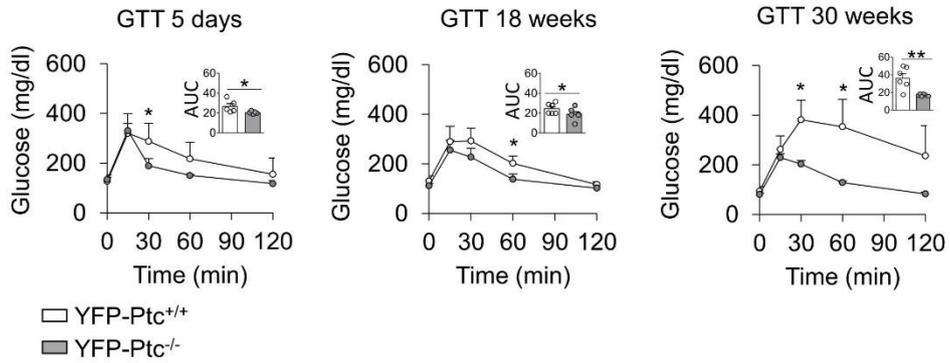
**Figure Sup 4.**

**A**

Male

**B**

Female

**Figure Sup 5.**

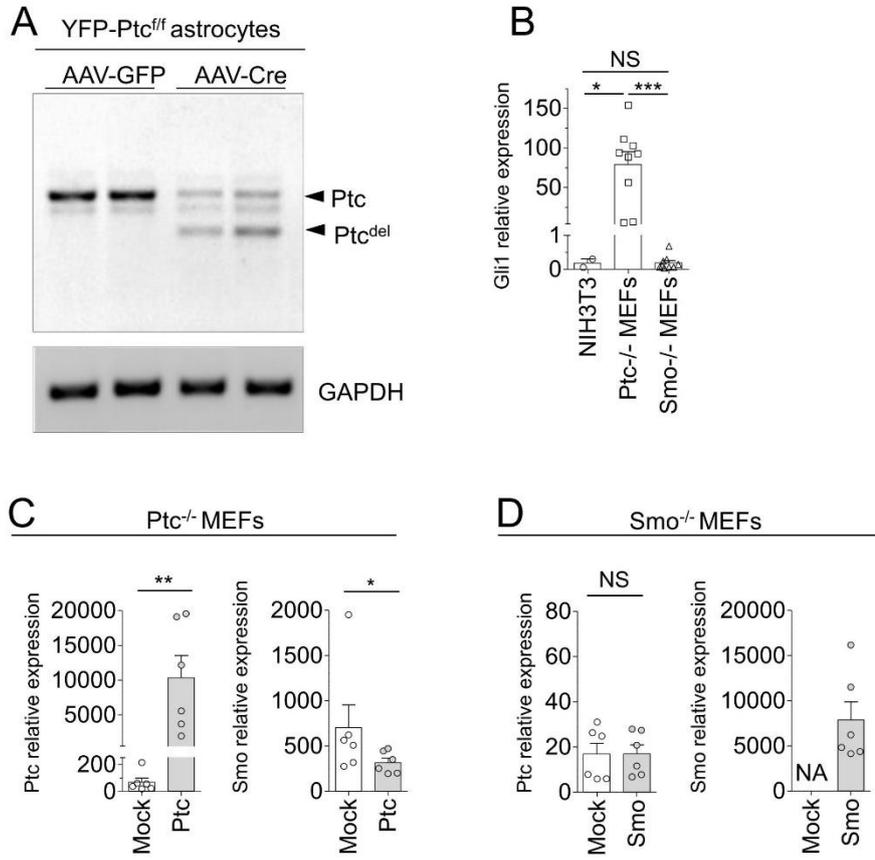


Figure Sup 6.

**Supplemental Table 1 : Primers used for qRT-PCR**

Gene	sense	sequence	Gene	sense	sequence
Gli1	F	TTGGGATGAAGAAGCAGTTG	LKB1	F	TGACTGCGGCCACCACACTCT
	R	GGAGACAGCATGGCTACTA		R	CGGAACCAGCTGTGCTGCCTA
Gli2	F	AAGCACCAGAACCGCACTCACTC	GLUT-1	F	CTACGGGGTCTTAAGTGCCT
	R	CTTGAGCAGTGGAGCACGGACAT		R	CTCCCACAGCCAACATGAGG
Gli3	F	TTCTGAGTCCCTCACAGAGCAAGC	GLUT-4	F	GCACCTCACTACGCTCT
	R	GGGTTGTTCTTCCGGCTG		R	CCCTTTTCTTCCCAACCAT
Ptc1	F	TGACGGGGTCTCGTTACAA	GLAST	F	ACTTTGACCTGAACTTTGGACA
	R	CTACCAGACGCTGTTTAGTCA		R	TCGGAGGCGGTCCAG
Smo	F	GAGCGTAGCTTCCGGGACTA	NPY	F	TTTCCAAGTTTCCACCCTCATC
	R	CTGGGCCGATTCTTGATCTCA		R	AGTGGTGGCATGCATTGGT
Shh	F	CCCCAATTACAACCCGACAT	POMC	F	GGCTTGAAACTCGACCTCT
	R	GGTCACTCGCAGCTTCACT		R	TGACCCATGACGTACTIONCCG
Hip	F	CCCAGACTCACAATGGAAAACCTC	TNF- $\alpha$	F	AAGTCAACCTCTCTGCC3
	R	GTGGGGGTGTAGTAGCCGTT		R	TCCAAAGTAGACCTGCCCG
Boc	F	CATTGCTGCCCTCAACAACC	CD11b	F	GGTGCTCTGGCTCTCATCA
	R	GCTGTGTTCCCTCGTCTAC		R	AGGTGGGGCGTCTTGG
Cdo	F	CAGGAAGGGGACTGTTGGTTT	Iba1	F	GAAAGGGGAAGTGTGAGA
	R	CGTGTGTGGAGTTGAGCATC		R	TGGCTCATGGCTCCTCAG
Sufu	F	GAGGATAGCCGGAGCATCTG	GFAP	F	GCTTCGTGCTTGGCTTGGC
	R	GTAAATCTCCAGTCCCGCC		R	AAGAGACAGAGGAGTGGTATCGG
IR	F	GCCGCTCTATGCTCTGGTATC	EMR1	F	ATACCCTCCAGCACATCCAG
	R	GAGTGATGGTGAGGTTGTGTTGC		R	CCATCTCCATCCTCCACAT
PTB1B	F	CTCTTCCAGCCACCAGT	IL-6	F	GCCTTC TTGGGACTGATGCTGGT
	R	CCACCATCCGTCTCCTAACT		R	TCCTCTGTGAAGTCTCCTCTCCG
SOCS3	F	CCAGCTCCAGCTTCTTTCAAGTG	IL-1 $\beta$	F	GCCTCGTGCTGTCCG
	R	GAGAGTCCGCTTGTCAAAGGTATTG		R	TGTCGTTGCTTGGTCTCTCT
Resistin	F	CCCAGAAGGCACAGCAG	B-Actin	F	TGAGAGGGAAATCGTGCGTGAC
	R	TCACGAATGTCCACGAG		R	GCTCGTTGCCAATAGTGATGACC
TLR4	F	CTGGGGAGGCACATCTTCTGG	GAPDH	F	GCCATCAACGACCCCTTCAT
	R	TGCCGTTTCTGTCTTCTCTCTGCT		R	ATGATGACCCTTTTGGCTCC
AMPK	F	ACGGCCGAGAAGCAGAAGCAC			
	R	TCGTGCTTGCCACCTTCAC			

## **DISCUSSION**

# DISCUSSION

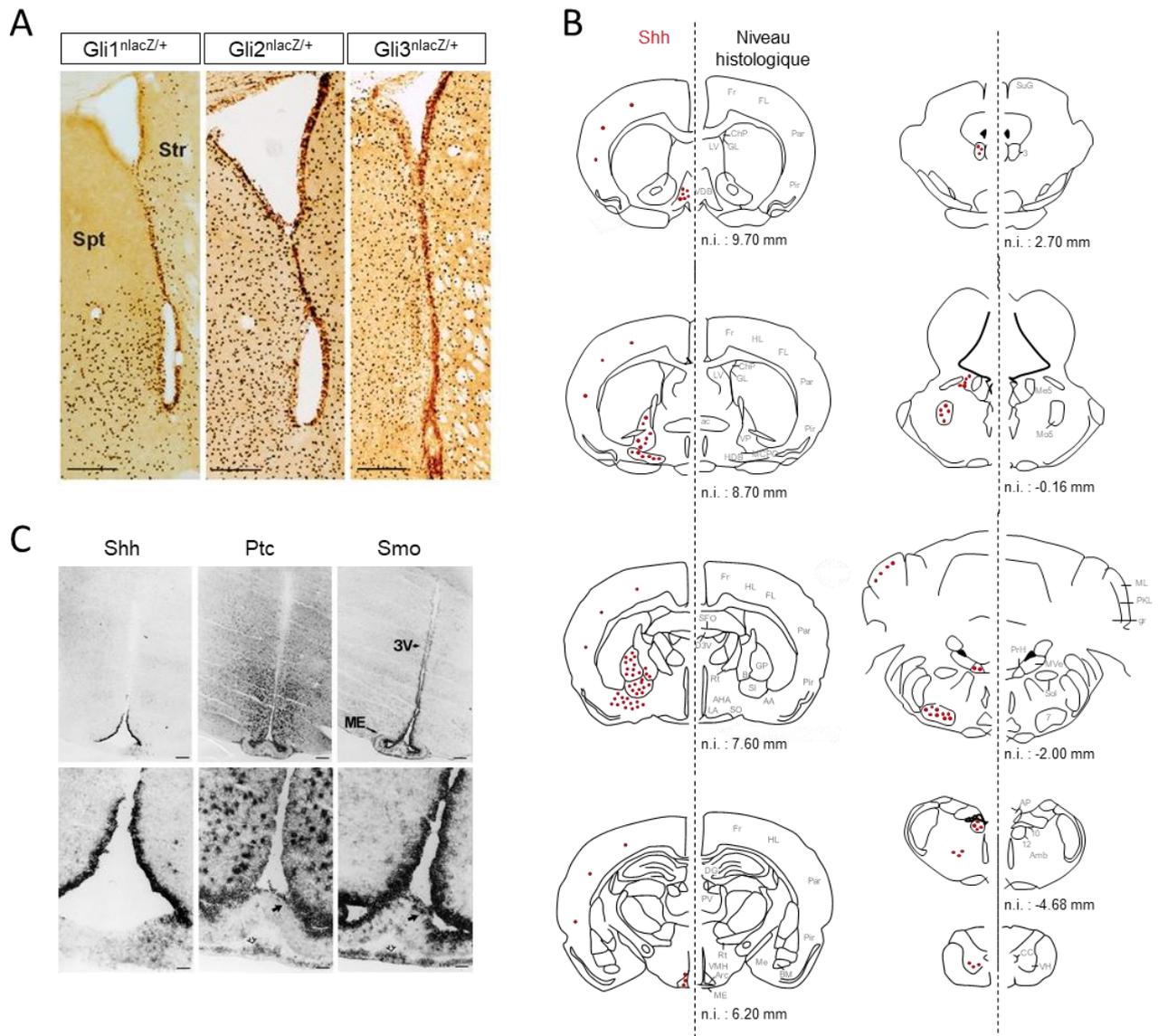
Les travaux menés au cours de cette thèse ont permis d'approfondir la compréhension du rôle de la voie Hh et de ses mécanismes d'action dans la régulation des astrocytes et des CSNs du cerveau de rongeur adulte. Ils ont permis de mettre en évidence la fonction clé de la voie Hh dans le contrôle de la quiescence et de l'activation des CSNs de la ZSV; d'identifier une sous-population d'OLs (OLs) matures comme nouvelle source potentielle de ligand Shh; et enfin, de découvrir l'implication de la voie Shh astrocytaire dans la régulation de l'homéostasie énergétique par l'hypothalamus. La discussion de ces travaux portera sur trois points englobant les résultats mis en évidence lors de ma thèse : 1) le potentiel thérapeutique de la modulation pharmacologique de la voie Shh dans la ZSV, 2) les fonctions possibles de la protéine Shh oligodendrocytaire, 3) le rôle de la voie Shh dans la régulation du métabolisme chez le rongeur adulte.

## **I. La voie Shh, composante de l'environnement des cellules souches neurales**

### **1. Actions de la voie Shh sur les différentes populations de la ZSV**

Comme décrit précédemment, la ZSV constitue une des principales zones de neurogénèse chez l'adulte. Elle a pour rôle d'assurer un environnement optimal pour le maintien des CSNs. Dans cette région, plusieurs populations cellulaires vont participer au processus de neurogénèse : les CSNs quiescentes, les CSNs activées, les TACs et les neuroblastes.

Les transcrits des composantes de la voie Shh ont été rapportés dans cette niche neurogénique. Les ARNm de Gli2 et Gli3 sont distribués uniformément le long de la ZSV. A l'inverse, l'expression de Gli1 est limitée à sa partie ventrale (**Figure 20A**). L'utilisation de marqueurs spécifiques, tels que la GFAP, a permis d'identifier les CSNs comme les principales cellules Gli1 positives dans cette niche neurogénique (Garcia et al., 2018). Ces cellules expriment également Smo et Ptc et sont donc équipées pour pouvoir répondre au signal Shh et présenter la signalisation Shh canonique (Ruat et al., 2015). Une faible proportion de TACs exprimerait également Gli1, une observation qui n'a cependant pas été rapportée dans les neuroblastes. De ce fait, les modèles d'étude de la voie Shh dans la ZSV ciblent les CSNs. Cette modification de la voie Shh dans les CSNs va affecter différemment chaque population de la ZSV.



**Figure 20 : Détails de la cartographie des composantes de la voie Shh chez le rongeur adulte**

(A) Coloration immunohistochimique de l'activité  $\beta$ -galactosidase (marron foncé) du gène rapporteur LacZ placé sous le contrôle du promoteur du gène Gli1, Gli2 ou Gli3. Le marquage révèle l'expression de Gli1-3 au niveau de la zone sous-ventriculaire des ventricules latéraux (ZSV) chez la souris adulte. L'expression de Gli1 est concentrée dans la portion ventrale de la ZSV. Echelle, 200  $\mu$ m. Spt, septum; Str, striatum, d'après (Petrova et al, J. Neurosci., 2013). (B) Schémas illustrant la distribution des transcrits de Sonic Hedgehog (Shh), indiqués par des points rouges, sur des coupes frontales de cerveau de rat adulte. Le niveau interaural (n.i.) de coupe est indiqué sous le schéma correspondant. Pour chaque coupe, le schéma de droite représente le niveau histologique et décrit les structures neuroanatomiques présentes (gris), d'après (Traiffort et al, Eur. J. Neurosci., 1999). (C) Hybridation *in situ* révélant la localisation des transcrits de Shh, Patched (Ptc) et Smoothened (Smo) sur des coupes frontales de rat adulte, au niveau de l'éminence médiane de l'hypothalamus. Echelle, 200  $\mu$ m (première ligne) et 50  $\mu$ m (deuxième ligne). 3V, third ventricle; ME, median eminence, d'après (Traiffort et al, Eur. J. Neurosci., 1999).

## 1.1 Régulation des CSNs

L'expression d'un récepteur Smo constitutivement actif (SmoM2) dans les CSNs entraîne l'activation de la voie Shh et modifie la descendance de ces cellules. Les CSNs mutés produisent alors principalement des OLs et des cellules granulaires de la couche profonde du bulbe olfactif (Ihrie et al., 2011). Par ailleurs, nos travaux démontrent que la délétion de Ptc, régulateur négatif de la voie Shh, dans les CSNs entraîne une diminution de la production de nouveaux interneurons par les cellules de la ZSV (Ferent et al., 2014). L'obtention de deux phénotypes opposés suite à l'activation de la voie Shh dans les CSNs peut être liée à l'utilisation de souris transgéniques différentes. En effet, la première étude se base sur une lignée ciblant les cellules GFAP<sup>+</sup> et la deuxième, les cellules GLAST<sup>+</sup>. Or l'analyse par García-Cáceres et al. de la souris GLAST<sup>CreERT</sup>:tdTomato/eGFP a permis de démontrer que seules 62% des cellules exprimant le rapporteur GFP sont marquées par un anticorps pour la GFAP. Cette quantification faite dans l'hypothalamus révèle ainsi que les populations cellulaires exprimant GLAST et GFAP se chevauchent mais ne sont pas identiques (García-Cáceres et al., 2016). Les effets obtenus avec chaque modèle pourraient donc refléter des rôles distincts de la voie Shh dans ces deux populations cellulaires.

Le deuxième élément pouvant expliquer la divergence des phénotypes est la méthode d'activation de la voie Shh : expression constitutive du modulateur positif Smo ou délétion du régulateur négatif Ptc. Ces deux mécanismes pourraient stimuler des signalisations Shh différentes. Dans les deux cas, une expression plus importante de Gli1 est rapportée, signe de l'activation de la voie Shh canonique. Cependant, en parallèle de la voie canonique, d'autres signalisations indépendantes de Gli1 pourraient être activées. De façon intéressante, Gomez et al. (Gomez et al., 2019) rapportent une augmentation de la prolifération des CSNs de la ZSV similaire à celle décrite lors de l'activation de la voie Shh canonique dans leur modèle de délétion de SuFu, régulateur négatif de la voie Shh, dans les CSNs (Daynac et al., 2016b; Ferent et al., 2014; Ihrie et al., 2011). Dans ce modèle, aucune modification de l'expression de Gli1 n'a été observée excluant une implication de la voie Shh canonique dans les effets (Gomez et al., 2019).

D'autres arguments en faveur de voies Shh non canoniques dans les CSNs de la ZSV sont apportés par l'ablation de Smo dans les CSNs Nestin<sup>+</sup> ou GFAP<sup>+</sup> qui conduit à une chute du nombre de CSNs et des TACs

de la ZSV aboutissant à une perte de neurogénèse dans cette région (Balordi and Fishell, 2007; R. Petrova et al., 2013). Il est à noter que le phénotype induit par la délétion de Smo dans les cellules GFAP<sup>+</sup> peut être secouru par l'ablation de Gli3, inhibiteur transcriptionnel de la voie Shh. Cet effet suggère la présence d'une voie médiée par Gli3 inhibant la prolifération des CSNs de la ZSV et qui serait bloquée par Smo (R. Petrova et al., 2013). Ces études mettent en avant l'implication possible de différentes voies Shh pour la régulation des CSNs de la ZSV.

## 1.2 Modulation des TACs et neuroblastes

Nos travaux démontrent qu'une délétion de Ptc dans les cellules Glast<sup>+</sup> entraîne, à court terme (15 jours après délétion), une amplification de la population de TACs. Or l'administration de ligand Shh à des cultures de TACs n'affecte pas le cycle cellulaire de ces cellules. Une modification du cycle cellulaire des TACs ne peut donc expliquer l'augmentation observée. Cet effet pourrait alors être expliqué par une augmentation de la prolifération des CSNs activées, qui en se différenciant, aboutiront à un nombre plus important de TACs. L'amplification de la population de TACs reflète donc l'effet de la voie Shh sur les CSNs activées. En accord avec nos résultats, l'inactivation de la voie Shh au sein des astrocytes GFAP<sup>+</sup> conduit à une diminution des TACs, (R. Petrova et al., 2013). Ces résultats mettent en avant le rôle de la voie Hh dans la régulation de la réserve de CSNs et dans leur capacité à produire des précurseurs.

La voie Shh a-t-elle un rôle dans les TACs ? Nous n'avons pas observé d'effet de la voie Shh sur le cycle cellulaire ni la prolifération de ces progéniteurs. De plus, aucune augmentation de Gli1 dans les TACs et neuroblastes n'a été retrouvée dans les souris YFP-Ptc<sup>-/-</sup>. Dans le modèle de délétion de SuFu au sein des CSNs GFAP<sup>+</sup> de la ZSV, une diminution de la population de TACs a été identifiée. Cependant, aucune modification de la capacité de prolifération ni de différenciation de ces cellules n'a été rapportée appuyant l'absence d'action directe de la voie Hh sur cette population de précurseurs (Gomez et al., 2019).

Concernant les neuroblastes, aucune modulation directe *in vivo* de ces cellules par la voie Shh n'a été rapportée. Cependant, le ligand Shh est capable d'exercer un effet chémoattracteur sur ces précurseurs (Angot et al., 2008).

## 2. Modulation pharmacologique des cellules de la ZSV

Les CSNs de la ZSV forment de nouveaux interneurons s'intégrant aux circuits du bulbe olfactif mais peuvent également fournir des OLs (Ruat et al., 2015). Une altération de la voie Shh est capable de modifier la nature de ces cellules nouvellement produites. Dans un modèle de démyélinisation induit par la cuprizone, Samanta et al. (Samanta et al., 2015) identifient ainsi l'inhibition de Gli1 comme un paramètre favorisant la production d'OLs par les CSNs de la ZSV qui sont recrutées afin de participer à la réparation de la lésion démyélinisante. Les auteurs démontrent également que l'administration de GANT61, un inhibiteur de Gli1, permet de promouvoir le processus de réparation en réduisant l'expression de Gli1 dans les CSNs. Dans nos travaux, nous avons également été capables de réduire la prolifération des CSNs quiescentes à l'aide d'un antagoniste synthétique de la voie Shh, le MRT83 *in vitro* mais également *in vivo*, par injection intraventriculaire.

Les CSNs de la ZSV présentent un intérêt dans le traitement des maladies neurodégénératives. Madhavan et al. (Madhavan et al., 2009) rapportent une augmentation de la prolifération au sein de la ZSV dans des modèles murins de Parkinson suite à une greffe de précurseurs neuronaux. Parmi les facteurs exprimés par ces précurseurs, a été décrit Shh qui a permis de favoriser la migration des CSNs de la ZSV vers le site de greffe. Cet effet pourrait être lié à l'activité chémoattractive décrite pour le ligand Shh (Angot et al., 2008; D. Charytoniuk et al., 2002). Cependant, ces cellules ne se différencient pas en neurones exprimant la tyrosine hydroxylase et auraient plus un rôle neuroprotecteur contre le phénotype parkinsonien. Comme décrit précédemment, la délétion de Shh dans les neurones dopaminergiques (lignée de souris Shh-nLZ<sup>C/C</sup>/Dat-Cre) conduit au développement d'un phénotype semblable à la maladie de Parkinson. L'injection de SAG chez ces souris est capable de diminuer l'expression de GDNF afin de permettre le maintien de la physiologie des neurones dopaminergiques par Shh (Gonzalez-Reyes et al., 2012).

Une augmentation de la prolifération des cellules de la ZSV a été rapportée chez des souris suivant un accident vasculaire cérébral (AVC). L'administration de SAG, agoniste de la voie Shh n'affecte pas cette prolifération mais favoriserait la survie des cellules nouvellement produites et leur migration aux sites de lésion.

La molécule conduit également à une activation de la voie Shh dans les CSNs de la ZSV reflétée par une expression plus importante de Gli1 (Jin et al., 2017). Les souris traitées présentent également une meilleure récupération des fonctions locomotrices et cognitives. Des propriétés neuroprotectrices ont également été décrites dans des modèles d'AVC ischémique pour un autre agoniste, la purmorphamine (Chechneva et al., 2014; Liu et al., 2020).

Ces études mettent en avant la possibilité de moduler pharmacologiquement la voie Shh au sein des CSNs de la ZSV afin de participer à la réparation de diverses lésions.

## **II. L'OL mature, une nouvelle source de protéine Shh chez l'adulte**

### **1. Les sources de protéine Shh dans le cerveau de rongeur adulte**

Dès 1998, notre équipe a mis en évidence la présence d'une voie Shh active et décrit la distribution des transcrits de Shh au sein de neurones GABAergiques dans diverses régions du cerveau de rongeur adulte (Coulombe et al., 2004; Traiffort et al., 2001, 1999, 1998) (**Figure 20B**). Plusieurs études ultérieures ont corroboré ces résultats notamment via l'utilisation de lignées reportrices (Shh<sup>CreER</sup>-R26YFP, Shh<sup>CreER</sup>-R26<sup>lacZ</sup>) (Álvarez-Buylla and Ihrie, 2014; Garcia et al., 2010; Ihrie et al., 2011; Traiffort et al., 2010). Dans le cadre de ma thèse, nous avons retrouvé l'expression de Shh dans le pallidum ventral, décrite dans la littérature, en utilisant une technique d'hybridation *in situ* novatrice et à la sensibilité importante (smFISH, single-molecule fluorescent *in situ* hybridization). L'identification de la forme protéique du ligand reste délicate, principalement en raison de la difficulté à assurer la spécificité du signal obtenu par les anticorps dirigés contre Shh. Comme décrit précédemment, l'utilisation de l'anticorps 5E1 a permis de mettre en évidence un signal dans la couche de cellules de Purkinje du cervelet (Dahmane and Ruiz i Altaba, 1999; Gritli-Linde et al., 2001), en accord avec la description des ARNm de Shh dans cette région (Traiffort et al., 1998). Cependant, cet anticorps n'a pas permis d'identifier d'autres localisations du ligand Shh dans le cerveau adulte. Un autre anticorps ciblant la protéine Shh et produit par Scales S.J. (Genentech, #AB\_2716569) marque également les cellules de la couche de Purkinje. Néanmoins, la présence de signal dans d'autres cellules du cervelet avec cet anticorps interroge sur sa spécificité. Pourtant, Ihrie et al (Ihrie et al., 2011) rapportent un signal dans la partie ventrale du ventricule

latéral avec cet anticorps, pouvant correspondre aux cellules Shh<sup>+</sup> décrites chez la souris reportrice Shh<sup>CreER</sup>-R26YFP. Ces différentes études par hybridation *in situ*, lignées reportrices et immunohistochimie définissent les neurones comme unique source de Shh dans le cerveau de rongeur adulte.

A l'aide de l'anticorps C9C5 dirigé contre la forme active de la protéine Shh, nous identifions une sous-population d'OLs matures comme source potentielle de protéine Shh en supplément des sources neuronales déjà décrites. La présence de transcrits de Shh identifiés par smFISH au sein d'OLs matures suggère que la protéine reconnue par l'anticorps C9C5 correspond bien à une forme du ligand Shh. Nous mettons ainsi en évidence une expression de Shh plus large que celle rapportée jusqu'à maintenant, démontrant l'importance de réévaluer la distribution de Shh dans le cerveau adulte avec cette nouvelle technique à la sensibilité élevée. Des travaux en cours (M. Russo, Tirou et al., résultats personnels) indiquent, en effet, une expression des transcrits de Shh dans diverses populations neuronales dans le cerveau adulte.

Les variations de marquage entre ces anticorps suggèrent la reconnaissance de formes différentes de la protéine Shh. Le ligand Shh est sujet à de nombreuses modifications post-traductionnelles telles que l'ajout de lipides (Resh, 2016). Des variations dans ces processus pourraient conduire à la synthèse de formes variées de Shh reconnues par différents anticorps. La protéine Shh identifiée par le C9C5 serait donc soumise à des modifications post-traductionnelles ne survenant que dans la sous-population d'OLs matures où elle est reconnue. Cette hypothèse est appuyée par le fait que l'anticorps C9C5 ne marque aucun autre type cellulaire. Par exemple, aucun signal immunogénique de l'anticorps C9C5 n'est observé dans la couche de cellules de Purkinje du cervelet. Ainsi, la découverte d'une forme du ligand exprimée spécifiquement dans une sous-population d'OLs matures suggère l'existence de différentes formes de la protéine Shh et de possibles fonctions spécifiques à cette forme oligodendrocytaire.

Il est à noter que la présence de protéine Shh dans une région où aucun transcrit n'a été décrit, pourrait indiquer le transport de la protéine depuis d'autres aires cérébrales. En effet, notre équipe a rapporté l'existence d'un transport axonal du ligand Shh de la rétine au collicule supérieur chez le hamster (Traiffort et al., 2001).

Dans nos travaux, nous démontrons la présence de contacts entre les prolongements des OLs C9C5-Shh<sup>+</sup> et des astrocytes et neurones exprimant Ptc. Le ligand Shh pourrait ainsi être sécrété au niveau de ces contacts et activer son récepteur Ptc localisé sur les astrocytes et neurones à proximité.

## **2. Fonctions potentielles de la protéine Shh oligodendrocytaire**

### 2.1 Régulation des fonctions oligodendrocytaires

La voie Shh participe à la formation d'OLs au cours du développement (Laouarem and Traiffort, 2018). De façon intéressante, nos travaux mettent en avant une apparition des cellules C9C5-Shh<sup>+</sup> aux stades postnataux P10 et P20, période où ont lieu des vagues postnatales d'oligodendrogénèse. De plus, nous rapportons la présence de contact entre les prolongements des OLs C9C5<sup>+</sup> et des fibres situées à proximité également marquées par l'anticorps et pouvant illustrer un enroulement des prolongements oligodendrocytaires des cellules C9C5<sup>+</sup> autour de ces fibres (Russo M., Tirou L. et al, résultats personnels). Ces cellules Shh positives pourraient donc intervenir dans la formation de nouveaux précurseurs oligodendrocytaires et OLs (**Figure 21C**). En accord avec cette hypothèse, une augmentation de cellules oligodendrocytaires a été rapportée suite à l'apport exogène de Shh (Loulier et al., 2006) révélant la capacité du ligand à promouvoir la production de ces cellules.

De façon similaire, lors de lésion démyélinisante induite par la lysolécithine dans le corps calleux, l'apport de Shh par adénovirus favorise le processus de réparation en augmentant la prolifération et différenciation des progéniteurs oligodendrocytaires (Ferent et al., 2013). Des travaux que nous poursuivons (M. Russo, L. Tirou et al) en collaboration avec le Dr E. Traiffort, portent sur l'analyse de la protéine Shh avec l'anticorps C9C5 dans le cadre de lésion démyélinisante. La protéine Shh oligodendrocytaire pourrait participer à l'activation d'une voie Shh favorisant la réparation dans le cadre de lésions démyélinisantes.

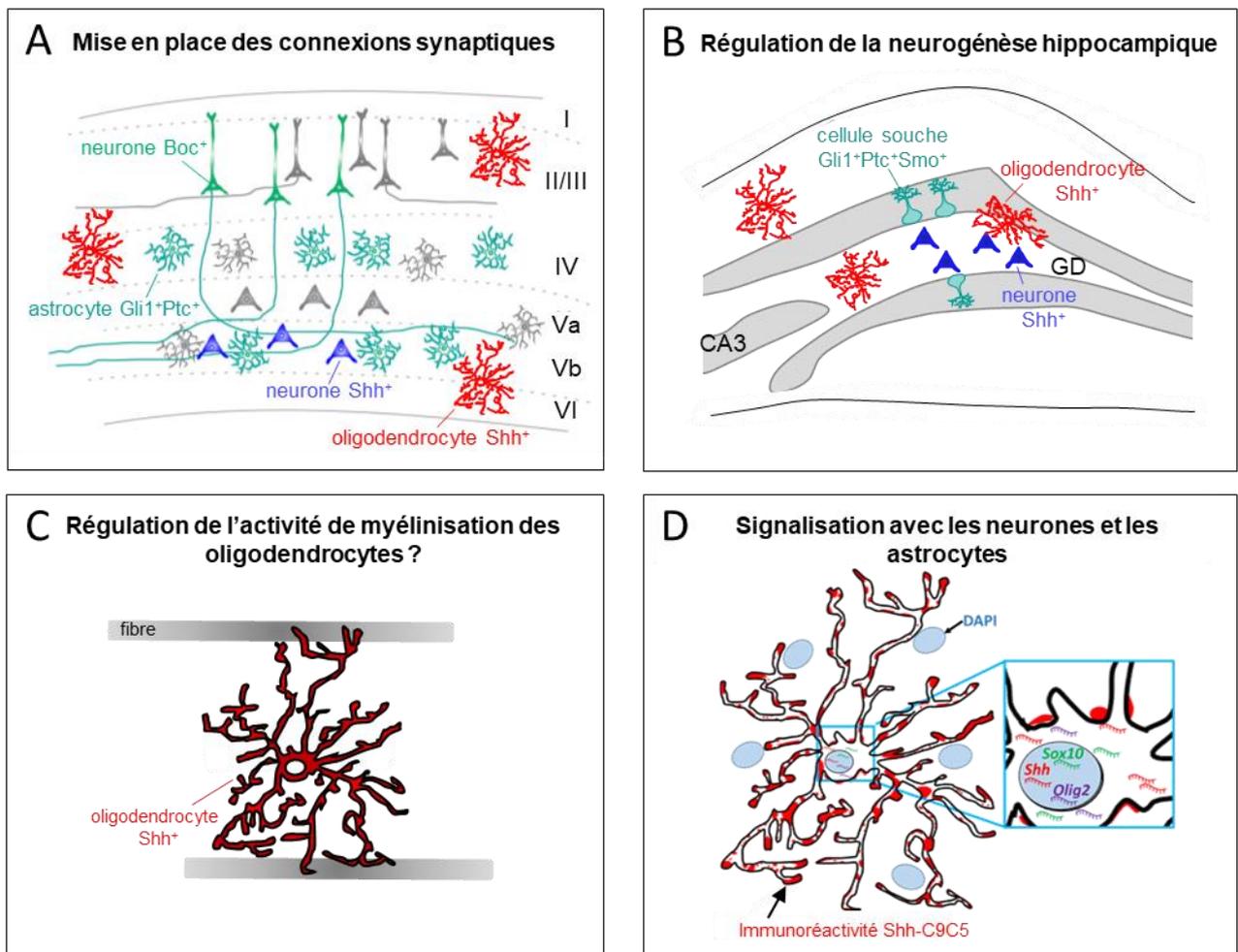
## 2.2 Régulation des niches de neurogénèse

Les OLs matures C9C5<sup>+</sup> sont largement distribués dans le cerveau postnatal, notamment à proximité des zones de neurogénèse adulte, la ZSV et la zone sous-granulaire du gyrus denté de l'hippocampe (ZSG) (**Figure 21B**). Ainsi, le ligand Shh potentiellement libéré par ces cellules pourrait intervenir dans la régulation de la voie Shh qui joue un rôle important dans le maintien de la réserve de CSNs au sein de ces régions. Dans la ZSG, ces OLs constitueraient une source supplémentaire de ligand Shh en complément des neurones exprimant Shh décrits dans cette région (Gonzalez-Reyes et al., 2012).

## 2.3 Modulation de l'activité astrocytaire

La protéine Shh oligodendrocytaire pourrait également intervenir sur les autres types cellulaires présents à proximité. De façon intéressante, la voie Shh régule la libération de gliotransmetteurs par les astrocytes du cervelet (Okuda et al., 2016). Or, ces cellules sont capables de moduler l'activité des OLs via la sécrétion de facteurs tels que le BDNF agissant sur la myélinisation (Miyamoto et al., 2015; Traiffort et al., 2020). De plus, comme décrit précédemment, la voie Shh astrocytaire intervient dans l'organisation des connexions synaptiques dans le cortex postnatal (**Figure 15A**). Ainsi, la protéine Shh que nous rapportons dans une sous-population d'OLs matures, pourrait permettre l'activation de la voie Shh astrocytaire impliquée dans ces processus (**Figure 21A**).

Les OLs C9C5<sup>+</sup> sont également présents dans l'hypothalamus, ainsi le ligand produit par ces cellules pourrait permettre l'activation de la voie Shh dans cette région et participer aux communications entre astrocytes et neurones cruciales dans la fonction de régulation du métabolisme énergétique assurée par cette région (**Figure 21D**).



**Figure 21 : Les fonctions potentielles de la protéine Sonic Hedgehog oligodendrocytaire dans le cerveau de rongeur postnatal et adulte**

(A) Le ligand Sonic Hedgehog (Shh) produit par la cellule oligodendrocytaire (OL) mature C9C5<sup>+</sup> pourrait participer à la formation des connexions synaptiques régulée par la voie Hh astrocytaire au sein du cortex postnatal (voir figure 15A). (B) Dans l'hippocampe adulte, la production de ligand Sonic Hedgehog (Shh) par les OLs C9C5<sup>+</sup> pourrait participer à la modulation de la neurogénèse en complément des neurones Shh<sup>+</sup> décrits dans cette région par des travaux antérieurs (voir figure 15B). (C) Les prolongements des OLs C9C5<sup>+</sup> positifs contactent des fibres à proximité suggérant une implication de la protéine Shh reconnue dans l'activité de myélinisation de ces OLs. (D) Les OLs C9C5<sup>+</sup>CC1<sup>+</sup> constituent des sources potentielles de ligand Shh pour les astrocytes et neurones Ptc<sup>+</sup> à proximité. Ces oligodendrocytes matures expriment les transcrits de Shh, Sox10 et Olig2. GD, gyrus denté. Modifié à partir de (Garcia et al, *J. Neurosci.*, 2018).

### III. Implication de la voie Shh dans le contrôle de l'homéostasie énergétique

#### 1. La voie Hedgehog dans l'hypothalamus adulte

La voie Shh assure un rôle crucial dans le développement de l'hypothalamus, région clé dans le maintien de l'homéostasie énergétique (Alvarez-Bolado et al., 2012; Blaess et al., 2014; Corman et al., 2018; Saper and Lowell, 2014). Chez le rongeur adulte, la distribution des transcrits de Ptc, Smo et Shh a été rapportée par notre équipe dans l'hypothalamus (Traiffort et al., 1999) (**Figure 20C**). Dans le cadre de ma thèse, nous avons mis en évidence la présence des ARNm de Gli1-3 et Ptc dans le corps cellulaire et les prolongements des astrocytes de l'hypothalamus. Les transcrits de Ptc sont également présents dans les neurones de divers noyaux hypothalamiques. L'expression astrocytaire de Gli1 au niveau hypothalamique a également été rapportée par Garcia et al. (Garcia et al., 2010) via l'utilisation de souris transgéniques (*Gli1<sup>nlacZ/+</sup>*; *Gli1<sup>CreER</sup>,R26<sup>lacZ</sup>*). Les astrocytes possèdent donc les différents composants de la voie Shh canonique.

A l'aide de notre modèle de délétion conditionnelle de Ptc dans les cellules *Glast*<sup>+</sup> (*YFP-Ptc<sup>-/-</sup>*), nous avons identifié une augmentation du niveau d'expression de Gli1 dans l'hypothalamus et le cortex des animaux délétés, suggérant une activation de la voie Shh canonique suite à la délétion de Ptc dans les astrocytes *Glast*<sup>+</sup>. Cependant, les niveaux d'expression de Gli2 et Gli3 ne sont pas affectés. Ces résultats sont en accord avec l'augmentation de Gli1 rapportée dans des cultures d'astrocytes suite à l'administration d'agonistes de la voie Shh (SAG ou purmorphamine) (Ugbode et al., 2017). Bien que le niveau d'expression de Gli1 soit augmenté, nous n'avons pas observé de modification du nombre d'astrocytes exprimant Gli1 chez les animaux *YFP-Ptc<sup>-/-</sup>*.

A l'inverse, nous rapportons un nombre plus important d'astrocytes Gli3<sup>+</sup> dans le noyau arqué et le noyau hypothalamique dorsomédial des souris *YFP-Ptc<sup>-/-</sup>*. Cette augmentation pourrait refléter l'induction d'une voie Shh médiée par Gli3 dans certains astrocytes suite à la délétion de Ptc. De façon intéressante, des effets de Gli3 sur la physiologie des astrocytes ont été décrits dans la littérature. En effet, l'expression de la forme répressive de Gli3 (Gli3R) serait responsable d'une hypertrophie et d'une augmentation du nombre d'astrocytes (R. Petrova et al., 2013). D'autre part, en postnatal, la production d'astrocytes à partir de cellules

radiales gliales nécessite la diminution du facteur Gli3R (Zhang et al., 2020). Les conséquences de l'expression de ce facteur Gli3 dans les astrocytes des souris YFP-Ptc<sup>-/-</sup> restent à déterminer.

La voie Shh est capable de modifier la morphologie et le profil d'expression des astrocytes. L'activation de la signalisation Shh permet également de réduire l'hypertrophie associée à l'état réactif des astrocytes suite à un AVC (Chechneva et al., 2014). De façon similaire, une astroglie partielle a été rapportée en situation physiologique suite à l'inactivation de la voie Shh, induite par délétion de Smo dans les astrocytes GFAP<sup>+</sup> (R. Petrova et al., 2013). A l'inverse, nous n'avons observé aucune modification de la morphologie des astrocytes ni des niveaux d'expression des gènes associés aux voies inflammatoires dans l'hypothalamus des animaux YFP-Ptc<sup>-/-</sup>. Nos données indiquent que la voie Shh activée suite à la délétion de Ptc dans ces cellules gliales n'intervient pas dans la morphologie des astrocytes et suggèrent la présence de diverses voies de signalisation Shh dans les astrocytes. D'autre part, notre analyse par smFISH des transcrits de Gli1 révèlent des niveaux d'activation de la voie Shh canonique qui diffèrent selon les astrocytes. En effet, l'intensité du signal smFISH de Gli1 dans les astrocytes de l'hypothalamus est plus importante que dans ceux du cortex chez des souris contrôles (YFP-Ptc<sup>+/+</sup>). Des différences de voie Shh sont également présentes au sein même de l'hypothalamus où la délétion de Ptc active des réponses distinctes dans les astrocytes des différents noyaux hypothalamiques mettant en avant l'hétérogénéité des astrocytes dans l'hypothalamus. La voie Shh participerait à la diversité des astrocytes du cerveau adulte, s'ajoutant aux variations morphologiques et différences fonctionnelles citées dans l'introduction (Farmer and Murai, 2017).

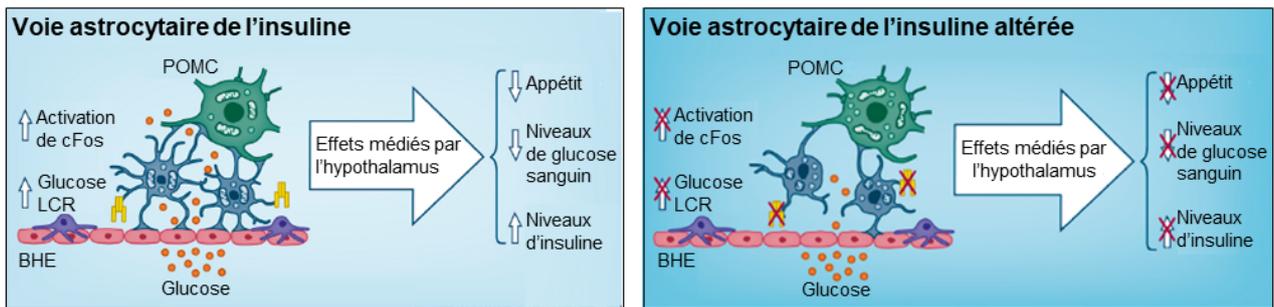
## **2. La voie Hedgehog, modulateur des fonctions métaboliques**

Des travaux antérieurs avaient mis en avant le rôle de la voie Shh dans la régulation du métabolisme énergétique à l'aide de modèles d'altération de la voie spécifiques à certains tissus périphériques ou touchant l'organisme entier. Ainsi la délétion de Smo dans le foie démontre une modification de la synthèse de lipides médiée par les facteurs Gli1 et Gli3 (Matz-Soja et al., 2016). Dans les adipocytes du tissu adipeux brun et le muscle, l'activation de Smo entraîne une entrée de glucose indépendante de l'insuline. Cet effet, qui peut être

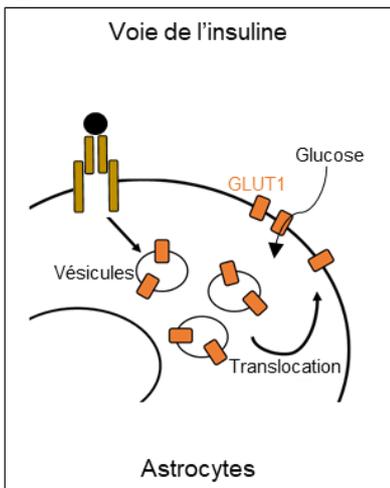
induit par des agonistes de Smo tels que certains oxystérols, passe par une voie Shh non canonique Smo-Ca<sup>2+</sup>-AMPK nécessitant le cil primaire et une modification rapide du métabolisme énergétique en réponse à une activation de la voie Shh (Teperino et al., 2012) **(Figure 22D)**. Ces divers modèles révèlent un lien entre la voie Shh et la régulation du métabolisme des cellules notamment dans la réponse au glucose et aux lipides. L'inactivation de la voie Shh via la délétion de Boc, chez la souris adulte, conduit à une augmentation du tissu adipeux et une prise de poids plus importante chez l'animal (Lee et al., 2015). Ces effets amènent à s'interroger sur l'existence d'une action similaire de la voie Shh dans d'autres cellules telles que les astrocytes où cette signalisation a été décrite (Garcia et al., 2010). Mes travaux de thèse mettent en avant la voie Shh cérébrale comme médiateur de la régulation du métabolisme énergétique.

Les astrocytes participent aux fonctions métaboliques de l'hypothalamus. Ainsi, l'altération de certaines voies de signalisation astrocytaires est associée à des dérèglements des paramètres métaboliques. Par exemple, l'activation de la voie IKK $\beta$ /NF- $\kappa$ B dans ces cellules gliales entraîne une réponse au glucose déficiente et conduit, à long terme, à une prise plus importante de poids chez la souris. Ces effets passent par une modification des prolongements astrocytaires affectant la régulation des niveaux extracellulaires de GABA (Zhang et al., 2017). D'autre part, l'ablation du récepteur à l'insuline (IR) dans les astrocytes conduit à une diminution de l'entrée de glucose dans le cerveau, altérant la réponse des neurones POMC et la réponse métabolique associée (García-Cáceres et al., 2016) **(Figure 22A)**. Dans notre modèle, l'augmentation de l'expression du IR chez les animaux YFP-Ptc<sup>-/-</sup> suggère également une implication de la voie de l'insuline dans la régulation astrocytaire du métabolisme. Cependant, contrairement au modèle de délétion astrocytaire de IR étudié par Garcia-Caceres et al. (García-Cáceres et al., 2016), nous n'avons observé aucune modification de l'entrée de glucose dans les astrocytes dans notre modèle. Ces résultats suggèrent un lien possible entre la voie Shh et celle de l'insuline qui serait impliqué dans un mécanisme autre que l'entrée de glucose, tel que la libération d'un facteur astrocytaire intervenant dans la modulation du métabolisme **(Figure 23)**.

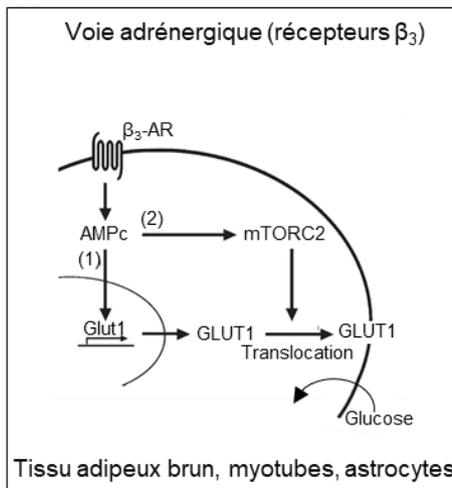
A



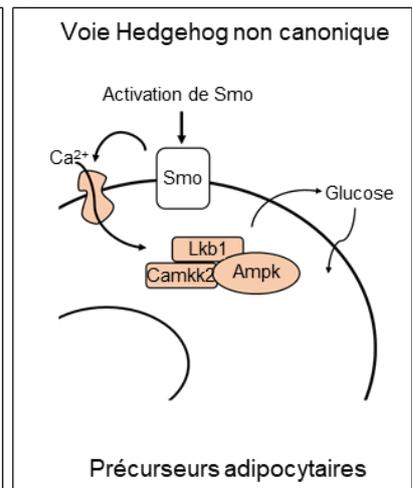
B



C



D



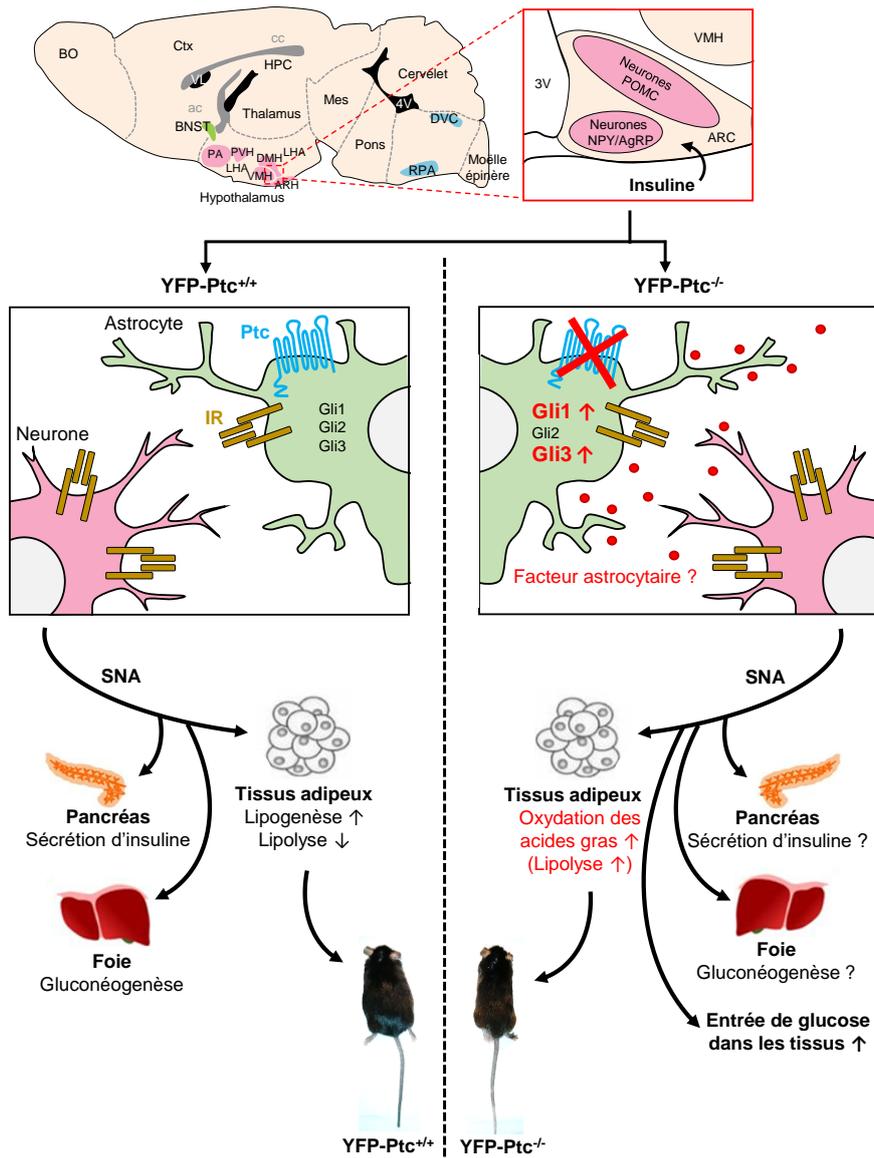
**Figure 22 : Voies de signalisation impliquées dans l'entrée de glucose dépendante et indépendante de l'insuline**

(A) La voie de l'insuline au sein des astrocytes hypothalamiques régule l'entrée de glucose dans le cerveau conduisant à la stimulation des neurones POMC, l'activation de cFos et l'augmentation du niveau de glucose dans le liquide céphalorachidien (LCR). Ces effets sont traduits en périphérie par une baisse de l'appétit et des niveaux de glucose sanguin. A l'inverse, les niveaux périphériques d'insuline sont augmentés. La délétion du récepteur à l'insuline (IR) dans les astrocytes entraîne une diminution de l'entrée de glucose dans le cerveau, altérant la réponse des neurones POMC et l'induction des effets associés. BHE, barrière hématoencéphalique; POMC, pro-opiomélanocortine, d'après (García-Cáceres et al, *Cell*, 2016). (B) La liaison de l'insuline à son récepteur sur les astrocytes stimule la voie de signalisation de l'insuline aboutissant à la translocation de transporteurs de glucose GLUT1 à la surface membranaire qui permettent une entrée plus importante de glucose dans ces cellules, d'après (García-Cáceres et al, *Nat. Neurosci.*, 2019). (C) Les récepteurs  $\beta_3$  adrénergiques ( $\beta_3$ -AR) induisent l'entrée de glucose dans les astrocytes, le tissu adipeux brun ou encore des myotubes via l'augmentation de la transcription et de la synthèse de novo de GLUT1, médiées par l'AMPc. Ils entraînent également la translocation de GLUT1 à la membrane plasmique par la stimulation du complexe mTORC2. L'entrée de glucose par l'axe récepteur  $\beta_3$ -mTORC2 est indépendante de la voie de l'insuline, d'après (Olsen et al, *J. Cell Biol.*, 2014). (D) Dans la lignée de précurseurs adipocytaires 3T3-L1 a été décrite, une voie Shh non canonique initiée par l'activation du récepteur Smoothened (Smo) qui augmente le calcium intracellulaire et conduit à l'activation d'un complexe composé des protéines Camkk2, Lkb1 et AMPK permettant de stimuler l'entrée de glucose dans ces cellules, d'après (Teperino et al, *Cell*, 2012).

Dans notre modèle, l'augmentation du niveau d'expression du IR a été mesurée dans l'hypothalamus n'indiquant pas dans quelles cellules elle intervient. Ainsi, une possibilité serait que la délétion de Ptc dans les cellules *Glast*<sup>+</sup> entraînerait une surexpression du IR dans les neurones hypothalamiques conduisant à une réponse plus forte à l'insuline sécrétée lors d'un repas et entraînant une entrée plus importante de glucose dans ces neurones de façon insulino-dépendante, comme celle décrite dans les astrocytes (**Figure 22B**). Il est à noter qu'un lien entre la voie Shh et une autre voie hormonale, celle de la leptine, hormone impliquée dans la satiété, a été rapportée. En effet, la leptine favoriserait la transformation du tissu adipeux blanc en brun (« browning ») via l'inhibition de la voie Shh traduite par une diminution de l'expression des facteurs Gli (Wang et al., 2019). Cette étude met en avant la possibilité de collaborations entre la signalisation Shh et des voies de réponse aux hormones métaboliques telles que la leptine et l'insuline.

Comme décrit précédemment, la régulation du métabolisme au niveau central a lieu principalement par l'hypothalamus. Dans cette structure, les neurones AgRP et POMC du noyau arqué assurent un rôle critique dans la réponse aux changements métaboliques en modulant les tissus périphériques. Les neurones AgRP interviennent dans la balance d'utilisation des substrats via leurs projections au PVN activant le SNS contrôlant l'activité de plusieurs organes périphériques dont la sécrétion d'insuline par le pancréas (Joly-Amado et al., 2012). L'altération de cette voie constitue un mécanisme possible pouvant expliquer le changement de profil d'utilisation des substrats et le niveau faible d'insuline que nous rapportons suite à la délétion de Ptc dans les astrocytes. Il serait donc intéressant d'examiner l'état de ces connexions parasympathiques et sympathiques et notamment le niveau d'activation de la voie  $\beta$ -adrénergique intervenant dans l'entrée de glucose au niveau du tissu adipeux brun et du muscle (**Figure 22C**) chez la souris *YFP-Ptc*<sup>-/-</sup>. De façon intéressante, la modification de la voie de l'insuline dans les astrocytes passe par une altération des neurones POMC avec lesquels ils sont en contacts (García-Cáceres et al., 2016). Ainsi, une action des astrocytes hypothalamiques est souvent décrite sur les neurones du noyau arqué. Cependant, ces cellules gliales interagissent également avec des neurones du VMH. Dans ce noyau hypothalamique, les astrocytes participent à l'oxydation d'acides gras qui pourrait servir comme source d'énergie aux neurones et permettre de diminuer la prise alimentaire (Le Foll and Levin,

2016). Les évènements neuronaux modifiés par la délétion astrocytaire de Ptc et aboutissant à un réarrangement des paramètres métaboliques, restent à déterminer. L'influence de cette délétion sur les tissus périphériques notamment les tissus adipeux suggèrent une implication du système autonome (**Figure 23**). Ces résultats mettent en évidence l'intérêt de la signalisation Shh comme piste thérapeutique dans le traitement de l'obésité et poussent à s'interroger sur l'effet de modulateurs pharmacologiques de la voie.



**Figure 23 : Modèle putatif du rôle de la voie de signalisation Hedgehog astrocytaire dans le contrôle du métabolisme du glucose et des lipides périphériques**

Dans l'hypothalamus, l'insuline va agir sur les astrocytes et neurones exprimant son récepteur (IR). Les neurones AgRP/NPY et POMC du noyau arqué (ARC) ont un accès privilégié aux hormones périphériques de par leur proximité avec l'éminence médiane. La stimulation des neurones qui s'ensuit, permet l'activation de voies du système nerveux autonome (SNA) modulant la sécrétion d'insuline par le pancréas, la gluconéogenèse au sein du foie et induisant l'augmentation de la lipogénèse et la réduction de la lipolyse dans les tissus adipeux (scénario de gauche, YFP-Ptc<sup>+/+</sup>). La délétion de Patched (Ptc) dans les astrocytes Glast<sup>+</sup> (scénario de droite, YFP-Ptc<sup>-/-</sup>) conduit à une augmentation de l'expression de Gli1 et du nombre d'astrocytes Gli3<sup>+</sup>. Cette modification pourrait altérer la libération d'un facteur astrocytaire responsable de la stimulation de voies du SNA impliquées dans la sécrétion d'insuline par le pancréas, la gluconéogenèse du foie et favorisant l'oxydation des acides gras. L'expansion des tissus adipeux et la prise de poids associée sont ainsi bloquées. Ces voies pourraient également permettre une augmentation de l'entrée de glucose dans les tissus expliquant la sensibilité plus importante des souris YFP-Ptc<sup>-/-</sup> au glucose. Vx, vaisseau sanguin; BHE, barrière hématoencéphalique; HPT, hypothalamus; TA, tissus adipeux; SNA, système nerveux autonome.

#### IV. Conclusions et perspectives

L'ensemble des résultats obtenus au cours de cette thèse ont permis la mise en évidence de nouvelles propriétés de la voie Shh ouvrant vers de nouvelles problématiques sur la compréhension de cette signalisation chez l'adulte.

L'étude du modèle  $\text{Glast-Cre}^{\text{ERT2}}\text{-YFP-Ptc}^{-/-}$  a révélé l'importance de la voie Shh dans la détermination de l'état quiescent ou activé des cellules souches neurales au sein de la ZSV, zone neurogénique adulte. L'activation de la voie Shh dans ces cellules conduit à des effets distincts à long et court terme notamment sur les cellules souches activées et TACs mettant en avant l'implication de l'âge sur l'impact de la signalisation Shh. Une diminution de la neurogénèse dans la ZSV, associée à une altération des capacités prolifératives des cellules souches neurales activées, a été rapportée (Daynac et al., 2016a). Cette étude amène à s'interroger sur la possibilité de stimuler la prolifération de ces cellules en manipulant pharmacologiquement la voie Shh, constituant un outil thérapeutique potentiel pour le traitement de maladies neurodégénératives ou de maladies de la myéline.

Ce travail a permis l'identification comme source potentielle de ligand Shh, d'une sous-population d'OLs matures marquée par l'anticorps monoclonal C9C5 dirigé contre Shh. Cette découverte est appuyée par la présence de transcrits de Shh dans des OLs matures mis en évidence par la technique smFISH et met en avant l'importance de réviser l'examen de la distribution de Shh dans le cerveau adulte avec cet outil à la sensibilité plus importante que les méthodes utilisées jusqu'à présent. Les contacts de ces cellules avec les astrocytes voisins suggèrent un rôle possible dans la régulation de l'activité et de la physiologie de ces cellules gliales mais cette hypothèse reste à tester afin d'identifier les fonctions potentielles de ces OLs C9C5-Shh<sup>+</sup>. Ce signal n'est pas retrouvé avec d'autres anticorps et n'est présent que dans des OLs suggérant une forme particulière de la protéine Shh présente dans ces cellules. Il serait donc intéressant de purifier le ligand C9C5-Shh afin d'identifier les modifications post-traductionnelles appliquées à cette protéine et pouvoir étudier ses propriétés biochimiques dans des tests *in vitro* standardisés tels que l'activation de la Gli-luciférase au sein de

fibroblastes ou la prolifération de précurseurs de cellules granulaires du cervelet (Hoch et al., 2015). Cette nouvelle forme de ligand Shh devrait constituer un outil supplémentaire pour comprendre le rôle de la voie Shh dans l'OL adulte.

Les travaux de cette thèse touchent un autre enjeu majeur de santé publique, les déficiences métaboliques, en particulier l'obésité liée à l'âge ou à un régime riche en gras. En effet, la caractérisation des altérations métaboliques présentes chez l'animal YFP-Ptc<sup>-/-</sup> révèle un rôle de la voie Shh cérébrale dans la régulation de l'homéostasie glucidique en périphérie. La délétion de Ptc dans les astrocytes s'accompagne d'une résistance aux déficiences métaboliques se développant avec l'âge (obésité, intolérance au glucose, augmentation des niveaux d'insuline). Les événements neuronaux induits par la délétion astrocytaire de Ptc restent à déterminer. L'influence de cette modification de la voie Shh sur les tissus périphériques, en particulier les tissus adipeux, indiquent une implication du système nerveux autonome. Ces résultats mettent en avant la voie Shh comme piste thérapeutique potentielle dans le traitement de l'obésité et amènent à s'interroger sur la possibilité de répliquer ces effets avec des modulateurs pharmacologiques de cette signalisation.

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

- Abbott, C.R., Monteiro, M., Small, C.J., Sajedi, A., Smith, K.L., Parkinson, J.R.C., Ghatei, M.A., Bloom, S.R., 2005. The inhibitory effects of peripheral administration of peptide YY(3-36) and glucagon-like peptide-1 on food intake are attenuated by ablation of the vagal-brainstem-hypothalamic pathway. *Brain Res.* 1044, 127–131. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2005.03.011>
- Abrams, C.K., Scherer, S.S., 2012. Gap junctions in inherited human disorders of the central nervous system. *Biochim. Biophys. Acta* 1818, 2030–2047. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2011.08.015>
- Abramyan, J., 2019. Hedgehog Signaling and Embryonic Craniofacial Disorders. *J. Dev. Biol.* 7. <https://doi.org/10.3390/jdb7020009>
- Adams, K.F., Schatzkin, A., Harris, T.B., Kipnis, V., Mouw, T., Ballard-Barbash, R., Hollenbeck, A., Leitzmann, M.F., 2006. Overweight, obesity, and mortality in a large prospective cohort of persons 50 to 71 years old. *N. Engl. J. Med.* 355, 763–778. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa055643>
- Adolphe, C., Nieuwenhuis, E., Villani, R., Li, Z.J., Kaur, P., Hui, C.-C., Wainwright, B.J., 2014. Patched 1 and patched 2 redundancy has a key role in regulating epidermal differentiation. *J. Invest. Dermatol.* 134, 1981–1990. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.63>
- Aggarwal, S., Snaidero, N., Pähler, G., Frey, S., Sánchez, P., Zweckstetter, M., Janshoff, A., Schneider, A., Weil, M.-T., Schaap, I.A.T., Görlich, D., Simons, M., 2013. Myelin membrane assembly is driven by a phase transition of myelin basic proteins into a cohesive protein meshwork. *PLoS Biol.* 11, e1001577. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001577>
- Aggarwal, S., Yurlova, L., Simons, M., 2011. Central nervous system myelin: structure, synthesis and assembly. *Trends Cell Biol.* 21, 585–593. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2011.06.004>
- Agulhon, C., Petracicz, J., McMullen, A.B., Sweger, E.J., Minton, S.K., Taves, S.R., Casper, K.B., Fiocco, T.A., McCarthy, K.D., 2008. What is the role of astrocyte calcium in neurophysiology? *Neuron* 59, 932–946. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.09.004>
- Ahn, S., Joyner, A.L., 2005. In vivo analysis of quiescent adult neural stem cells responding to Sonic hedgehog. *Nature* 437, 894–897. <https://doi.org/10.1038/nature03994>
- Al-Awar, A., Kupai, K., Veszélka, M., Szűcs, G., Attieh, Z., Murlasits, Z., Török, S., Pósa, A., Varga, C., 2016. Experimental Diabetes Mellitus in Different Animal Models. *J. Diabetes Res.* 2016, 9051426. <https://doi.org/10.1155/2016/9051426>
- Alberini, C.M., Cruz, E., Descalzi, G., Bessières, B., Gao, V., 2018. Astrocyte glycogen and lactate: new insights into learning and memory mechanisms. *Glia* 66, 1244–1262. <https://doi.org/10.1002/glia.23250>
- Albizu, L., Cottet, M., Kralikova, M., Stoev, S., Seyer, R., Brabet, I., Roux, T., Bazin, H., Bourrier, E., Lamarque, L., Breton, C., Rives, M.-L., Newman, A., Javitch, J., Trinquet, E., Manning, M., Pin, J.-P., Mouillac, B., Durroux, T., 2010. Time-resolved FRET between GPCR ligands reveals oligomers in native tissues. *Nat. Chem. Biol.* 6, 587–594. <https://doi.org/10.1038/nchembio.396>
- Alcantara Llaguno, S.R., Parada, L.F., 2016. Cell of origin of glioma: biological and clinical implications. *Br. J. Cancer* 115, 1445–1450. <https://doi.org/10.1038/bjc.2016.354>
- Alfaro, A.C., Roberts, B., Kwong, L., Bijlsma, M.F., Roelink, H., 2014. Ptch2 mediates the Shh response in Ptch1<sup>-/-</sup> cells. *Dev. Camb. Engl.* 141, 3331–3339. <https://doi.org/10.1242/dev.110056>
- Allahyari, R.V., Clark, K.L., Shepard, K.A., Garcia, A.D.R., 2019. Sonic hedgehog signaling is negatively regulated in reactive astrocytes after forebrain stab injury. *Sci. Rep.* 9, 565. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37555-x>
- Allard, C., Carneiro, L., Grall, S., Cline, B.H., Fioramonti, X., Chrétien, C., Baba-Aissa, F., Giaume, C., Pénicaud, L., Leloup, C., 2014. Hypothalamic astroglial connexins are required for brain glucose sensing-induced insulin secretion. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 34, 339–346. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2013.206>
- Allen, B.L., Song, J.Y., Izzì, 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, 775–787. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.04.018>
- Allen, B.L., Tenzen, T., McMahon, A.P., 2007. The Hedgehog-binding proteins Gas1 and Cdo cooperate to positively regulate Shh signaling during mouse development. *Genes Dev.* 21, 1244–1257. <https://doi.org/10.1101/gad.1543607>

- Allen, N.J., Eroglu, C., 2017. Cell Biology of Astrocyte-Synapse Interactions. *Neuron* 96, 697–708. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.09.056>
- Ally, M.S., Ransohoff, K., Sarin, K., Atwood, S.X., Rezaee, M., Bailey-Healy, I., Kim, J., Beachy, P.A., Chang, A.L.S., Oro, A., Tang, J.Y., Colevas, A.D., 2016. Effects of Combined Treatment With Arsenic Trioxide and Itraconazole in Patients With Refractory Metastatic Basal Cell Carcinoma. *JAMA Dermatol.* 152, 452–456. <https://doi.org/10.1001/jamadermatol.2015.5473>
- Alvarez, J.I., Dodelet-Devillers, A., Kebir, H., Ifergan, I., Fabre, P.J., Terouz, S., Sabbagh, M., Wosik, K., Bourbonnière, 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, 1727–1731. <https://doi.org/10.1126/science.1206936>
- Alvarez-Bolado, G., Paul, F.A., Blaess, S., 2012. Sonic hedgehog lineage in the mouse hypothalamus: from progenitor domains to hypothalamic regions. *Neural Develop.* 7, 4. <https://doi.org/10.1186/1749-8104-7-4>
- Álvarez-Buylla, A., Ihrie, R.A., 2014. Sonic hedgehog signaling in the postnatal brain. *Semin. Cell Dev. Biol.* 33, 105–111. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.05.008>
- Amankulor, N.M., Hambardzumyan, D., Pyonteck, S.M., Becher, O.J., Joyce, J.A., Holland, E.C., 2009. Sonic hedgehog pathway activation is induced by acute brain injury and regulated by injury-related inflammation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 10299–10308. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2500-09.2009>
- Amir-Levy, Y., Mausner-Fainberg, K., Karni, A., 2014. Treatment with Anti-EGF Ab Ameliorates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis via Induction of Neurogenesis and Oligodendrogenesis. *Mult. Scler. Int.* 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/926134>
- Andrews, Z.B., 2011. Central mechanisms involved in the orexigenic actions of ghrelin. *Peptides* 32, 2248–2255. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2011.05.014>
- Angot, E., Loulier, K., Nguyen-Ba-Charvet, K.T., Gadeau, A.-P., Ruat, M., Traiffort, E., 2008. Chemoattractive activity of sonic hedgehog in the adult subventricular zone modulates the number of neural precursors reaching the olfactory bulb. *Stem Cells Dayt. Ohio* 26, 2311–2320. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2008-0297>
- Arancibia-Cárcamo, I.L., Ford, M.C., Cossell, L., Ishida, K., Tohyama, K., Attwell, D., 2017. Node of Ranvier length as a potential regulator of myelinated axon conduction speed. *eLife* 6. <https://doi.org/10.7554/eLife.23329>
- Araque, A., Carmignoto, G., Haydon, P.G., Oliet, S.H.R., Robitaille, R., Volterra, A., 2014. Gliotransmitters travel in time and space. *Neuron* 81, 728–739. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.02.007>
- Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R.P., Haydon, P.G., 1999. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci.* 22, 208–215. [https://doi.org/10.1016/s0166-2236\(98\)01349-6](https://doi.org/10.1016/s0166-2236(98)01349-6)
- 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, 2454–2468. <https://doi.org/10.1172/JCI60842>
- Armstrong, R.C., Mierzwa, A.J., Sullivan, G.M., Sanchez, M.A., 2016. Myelin and oligodendrocyte lineage cells in white matter pathology and plasticity after traumatic brain injury. *Neuropharmacology* 110, 654–659. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.04.029>
- Asgari, M.M., Moffet, H.H., Ray, G.T., Quesenberry, C.P., 2015. Trends in Basal Cell Carcinoma Incidence and Identification of High-Risk Subgroups, 1998–2012. *JAMA Dermatol.* 151, 976–981. <https://doi.org/10.1001/jamadermatol.2015.1188>
- Assanah, M., Lochhead, R., Ogden, A., Bruce, J., Goldman, J., Canoll, P., 2006. Glial progenitors in adult white matter are driven to form malignant gliomas by platelet-derived growth factor-expressing retroviruses. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 26, 6781–6790. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0514-06.2006>
- Assinck, P., Duncan, G.J., Plemel, J.R., Lee, M.J., Stratton, J.A., Manesh, S.B., Liu, J., Ramer, L.M., Kang, S.H., Bergles, D.E., Biernaskie, J., Tetzlaff, W., 2017. Myelinogenic Plasticity of Oligodendrocyte Precursor

- Cells following Spinal Cord Contusion Injury. *J. Neurosci.* 37, 8635–8654.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2409-16.2017>
- Atasoy, D., Betley, J.N., Su, H.H., Sternson, S.M., 2012. Deconstruction of a neural circuit for hunger. *Nature* 488, 172–177. <https://doi.org/10.1038/nature11270>
- Attwell, D., Buchan, A.M., Charpak, S., Lauritzen, M., Macvicar, B.A., Newman, E.A., 2010. Glial and neuronal control of brain blood flow. *Nature* 468, 232–243. <https://doi.org/10.1038/nature09613>
- Attwell, D., Laughlin, S.B., 2001. An energy budget for signaling in the grey matter of the brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 21, 1133–1145.  
<https://doi.org/10.1097/00004647-200110000-00001>
- Atwood, S.X., Chang, A.L.S., Oro, A.E., 2012. Hedgehog pathway inhibition and the race against tumor evolution. *J. Cell Biol.* 199, 193–197. <https://doi.org/10.1083/jcb.201207140>
- Atwood, S.X., Sarin, K.Y., Whitson, R.J., Li, J.R., Kim, G., Rezaee, M., Ally, M.S., Kim, J., Yao, C., Chang, A.L.S., Oro, A.E., Tang, J.Y., 2015. Smoothed variants explain the majority of drug resistance in basal cell carcinoma. *Cancer Cell* 27, 342–353. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.02.002>
- Aza-Blanc, P., Ramírez-Weber, F.A., Laget, M.P., Schwartz, C., Kornberg, T.B., 1997. Proteolysis that is inhibited by hedgehog targets Cubitus interruptus protein to the nucleus and converts it to a repressor. *Cell* 89, 1043–1053. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80292-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80292-5)
- Badano, J.L., Mitsuma, N., Beales, P.L., Katsanis, N., 2006. The ciliopathies: an emerging class of human genetic disorders. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 7, 125–148. <https://doi.org/10.1146/annurev.genom.7.080505.115610>
- Bae, G.-U., Domené, 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, 231–240.  
<https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.07.001>
- Bailey, J.M., Mohr, A.M., Hollingsworth, M.A., 2009. Sonic hedgehog paracrine signaling regulates metastasis and lymphangiogenesis in pancreatic cancer. *Oncogene* 28, 3513–3525.  
<https://doi.org/10.1038/onc.2009.220>
- Bakhti, M., Snaidero, N., Schneider, D., Aggarwal, S., Möbius, W., Janshoff, A., Eckhardt, M., Nave, K.-A., Simons, M., 2013. Loss of electrostatic cell-surface repulsion mediates myelin membrane adhesion and compaction in the central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 3143–3148.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1220104110>
- Balland, E., Dam, J., Langlet, F., Caron, E., Steculorum, S., Messina, A., Rasika, S., Falluel-Morel, A., Anouar, Y., Dehouck, B., Trinquet, E., Jockers, R., Bouret, S.G., Prévot, V., 2014. Hypothalamic tanycytes are an ERK-gated conduit for leptin into the brain. *Cell Metab.* 19, 293–301.  
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.12.015>
- Balordi, F., Fishell, G., 2007. Hedgehog signaling in the subventricular zone is required for both the maintenance of stem cells and the migration of newborn neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27, 5936–5947. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1040-07.2007>
- Balthasar, N., Dalgaard, L.T., Lee, C.E., Yu, J., Funahashi, H., Williams, T., Ferreira, M., Tang, V., McGovern, R.A., Kenny, C.D., Christiansen, L.M., Edelstein, E., Choi, B., Boss, O., Aschkenasi, C., Zhang, C., Mountjoy, K., Kishi, T., Elmquist, J.K., Lowell, B.B., 2005. Divergence of melanocortin pathways in the control of food intake and energy expenditure. *Cell* 123, 493–505.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.08.035>
- 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, 1570–1580. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04317.x>
- Barca-Mayo, O., Lu, Q.R., 2012. Fine-Tuning Oligodendrocyte Development by microRNAs. *Front. Neurosci.* 6, 13. <https://doi.org/10.3389/fnins.2012.00013>
- Bardehle, S., Krüger, M., Buggenthin, F., Schwausch, J., Ninkovic, J., Clevers, H., Snippert, H.J., Theis, F.J., Meyer-Luehmann, M., Bechmann, I., Dimou, L., Götz, M., 2013. Live imaging of astrocyte responses

- to acute injury reveals selective juxtavascular proliferation. *Nat. Neurosci.* 16, 580–586. <https://doi.org/10.1038/nn.3371>
- Barnes, E.A., Kong, M., Ollendorff, V., Donoghue, D.J., 2001. Patched1 interacts with cyclin B1 to regulate cell cycle progression. *EMBO J.* 20, 2214–2223. <https://doi.org/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, 1760–1770. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.10.085>
- Baron, W., Ozgen, H., Klunder, B., de Jonge, J.C., Nomden, A., Plat, A., Trifilieff, E., de Vries, H., Hoekstra, D., 2015. The major myelin-resident protein PLP is transported to myelin membranes via a transcytotic mechanism: involvement of sulfatide. *Mol. Cell. Biol.* 35, 288–302. <https://doi.org/10.1128/MCB.00848-14>
- Bartzokis, G., 2011. Alzheimer’s disease as homeostatic responses to age-related myelin breakdown. *Neurobiol. Aging* 32, 1341–1371. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2009.08.007>
- Barzi, M., Kostrz, D., Menendez, A., Pons, S., 2011. Sonic Hedgehog-induced proliferation requires specific Gα inhibitory proteins. *J. Biol. Chem.* 286, 8067–8074. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.178772>
- Batterham, R.L., Cowley, M.A., Small, C.J., Herzog, H., Cohen, M.A., Dakin, C.L., Wren, A.M., Brynes, A.E., Low, M.J., Ghatei, M.A., Cone, R.D., Bloom, S.R., 2002. Gut hormone PYY(3-36) physiologically inhibits food intake. *Nature* 418, 650–654. <https://doi.org/10.1038/nature00887>
- Bayol, S.A., Farrington, S.J., Stickland, N.C., 2007. A maternal “junk food” diet in pregnancy and lactation promotes an exacerbated taste for “junk food” and a greater propensity for obesity in rat offspring. *Br. J. Nutr.* 98, 843–851. <https://doi.org/10.1017/S0007114507812037>
- Beard, R.S., Haines, R.J., Wu, K.Y., Reynolds, J.J., Davis, S.M., Elliott, J.E., Malinin, N.L., Chatterjee, V., Cha, B.J., Wu, M.H., Yuan, S.Y., 2014. Non-muscle Mlck is required for β-catenin- and FoxO1-dependent downregulation of Cldn5 in IL-1β-mediated barrier dysfunction in brain endothelial cells. *J. Cell Sci.* 127, 1840–1853. <https://doi.org/10.1242/jcs.144550>
- Beauchamp, E.M., Ringer, L., Bulut, G., Sajwan, K.P., Hall, M.D., Lee, Y.-C., Peaceman, D., Ozdemirli, M., Rodriguez, O., Macdonald, T.J., Albanese, C., Toretsky, J.A., Uren, A., 2011. Arsenic trioxide inhibits human cancer cell growth and tumor development in mice by blocking Hedgehog/GLI pathway. *J. Clin. Invest.* 121, 148–160. <https://doi.org/10.1172/JCI42874>
- Becher, O.J., Hambardzumyan, D., Fomchenko, E.I., Momota, H., Mainwaring, L., Bleau, A.-M., Katz, A.M., Edgar, M., Kenney, A.M., Cordon-Cardo, C., Blasberg, R.G., Holland, E.C., 2008. Gli activity correlates with tumor grade in platelet-derived growth factor-induced gliomas. *Cancer Res.* 68, 2241–2249. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-6350>
- Belfiore, A., Frasca, F., Pandini, G., Sciacca, L., Vigneri, R., 2009. Insulin receptor isoforms and insulin receptor/insulin-like growth factor receptor hybrids in physiology and disease. *Endocr. Rev.* 30, 586–623. <https://doi.org/10.1210/er.2008-0047>
- 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, 4482–4487. <https://doi.org/10.1073/pnas.1018217108>
- Belgardt, B.F., Brüning, J.C., 2010. CNS leptin and insulin action in the control of energy homeostasis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1212, 97–113. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05799.x>
- Bellaïche, Y., The, I., Perrimon, N., 1998. Tout-velu is a Drosophila homologue of the putative tumour suppressor EXT-1 and is needed for Hh diffusion. *Nature* 394, 85–88. <https://doi.org/10.1038/27932>
- Bellamy, T.C., 2007. Presynaptic modulation of parallel fibre signalling to Bergmann glia. *Neuropharmacology* 52, 368–375. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2006.08.009>
- Benamer, T., Soleti, R., Porro, C., Andriantsitohaina, R., Martínez, M.C., 2010. Microparticles carrying Sonic hedgehog favor neovascularization through the activation of nitric oxide pathway in mice. *PLoS One* 5, e12688. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012688>
- Benford, H., Bolborea, M., Pollatzek, E., Lossow, K., Hermans-Borgmeyer, I., Liu, B., Meyerhof, W., Kasparov, S., Dale, N., 2017. A sweet taste receptor-dependent mechanism of glucosensing in hypothalamic tanycytes. *Glia* 65, 773–789. <https://doi.org/10.1002/glia.23125>
- Bergles, D.E., Richardson, W.D., 2015. Oligodendrocyte Development and Plasticity. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 8, a020453. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020453>

- Berlin, J., Bendell, J.C., Hart, L.L., Firdaus, I., Gore, I., Hermann, R.C., Mulcahy, M.F., Zalupski, M.M., Mackey, H.M., Yauch, R.L., Graham, R.A., Bray, G.L., Low, J.A., 2013. A randomized phase II trial of vismodegib versus placebo with FOLFOX or FOLFIRI and bevacizumab in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 19, 258–267. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-1800>
- Berman, D.M., Karhadkar, S.S., Hallahan, A.R., Pritchard, J.I., Eberhart, C.G., Watkins, D.N., Chen, J.K., Cooper, M.K., Taipale, J., Olson, J.M., Beachy, P.A., 2002. Medulloblastoma growth inhibition by hedgehog pathway blockade. *Science* 297, 1559–1561. <https://doi.org/10.1126/science.1073733>
- Berman, D.M., Karhadkar, S.S., Maitra, A., Montes De Oca, R., Gerstenblith, M.R., Briggs, K., Parker, A.R., Shimada, Y., Eshleman, J.R., Watkins, D.N., Beachy, P.A., 2003. Widespread requirement for Hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumours. *Nature* 425, 846–851. <https://doi.org/10.1038/nature01972>
- Bernardinelli, Y., Randall, J., Janett, E., Nikonenko, I., König, S., Jones, E.V., Flores, C.E., Murai, K.K., Bochet, C.G., Holtmaat, A., Müller, D., 2014. Activity-dependent structural plasticity of perisynaptic astrocytic domains promotes excitatory synapse stability. *Curr. Biol. CB* 24, 1679–1688. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.06.025>
- Betley, J.N., Cao, Z.F.H., Ritola, K.D., Sternson, S.M., 2013. Parallel, redundant circuit organization for homeostatic control of feeding behavior. *Cell* 155, 1337–1350. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.11.002>
- Betley, J.N., Xu, S., Cao, Z.F.H., Gong, R., Magnus, C.J., Yu, Y., Sternson, S.M., 2015. Neurons for hunger and thirst transmit a negative-valence teaching signal. *Nature* 521, 180–185. <https://doi.org/10.1038/nature14416>
- Bettencourt-Dias, M., Hildebrandt, F., Pellman, D., Woods, G., Godinho, S.A., 2011. Centrosomes and cilia in human disease. *Trends Genet. TIG* 27, 307–315. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2011.05.004>
- Beyer, C., Distler, O., Distler, J.H.W., 2012. Innovative antifibrotic therapies in systemic sclerosis. *Curr. Opin. Rheumatol.* 24, 274–280. <https://doi.org/10.1097/BOR.0b013e3283524b9a>
- Bezard, E., Baufreton, J., Owens, G., Crossman, A.R., Dudek, H., Taupignon, A., Brotchie, J.M., 2003. Sonic hedgehog is a neuromodulator in the adult subthalamic nucleus. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 17, 2337–2338. <https://doi.org/10.1096/fj.03-0291fje>
- Bialas, A.R., Stevens, B., 2013. TGF- $\beta$  signaling regulates neuronal C1q expression and developmental synaptic refinement. *Nat. Neurosci.* 16, 1773–1782. <https://doi.org/10.1038/nn.3560>
- Bidet, M., Joubert, O., Lacombe, B., Ciantar, M., Nehmé, R., Mollat, P., Brétilon, L., Faure, H., Bittman, R., Ruat, M., Mus-Veteau, I., 2011. The hedgehog receptor patched is involved in cholesterol transport. *PloS One* 6, e23834. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023834>
- Bijlsma, M.F., Borensztajn, K.S., Roelink, H., Peppelenbosch, M.P., Spek, C.A., 2007. Sonic hedgehog induces transcription-independent cytoskeletal rearrangement and migration regulated by arachidonate metabolites. *Cell. Signal.* 19, 2596–2604. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2007.08.011>
- Bilioni, A., Sánchez-Hernández, D., Callejo, A., Gradilla, A.-C., Ibáñez, C., Mollica, E., Carmen Rodríguez-Navas, M., Simon, E., Guerrero, I., 2013. Balancing Hedgehog, a retention and release equilibrium given by Dally, Ihog, Boi and shifted/DmWif. *Dev. Biol.* 376, 198–212. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.12.013>
- Bischoff, M., Gradilla, A.-C., Seijo, I., Andrés, G., Rodríguez-Navas, C., González-Méndez, L., Guerrero, I., 2013. Cytonemes are required for the establishment of a normal Hedgehog morphogen gradient in *Drosophila* epithelia. *Nat. Cell Biol.* 15, 1269–1281. <https://doi.org/10.1038/ncb2856>
- Bishop, B., Aricescu, A.R., Harlos, K., O’Callaghan, C.A., Jones, E.Y., Siebold, C., 2009. Structural insights into hedgehog ligand sequestration by the human hedgehog-interacting protein HHIP. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 698–703. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1607>
- Blaess, S., Szabó, N., Haddad-Tóvolli, R., Zhou, X., Álvarez-Bolado, G., 2014. Sonic hedgehog signaling in the development of the mouse hypothalamus. *Front. Neuroanat.* 8, 156. <https://doi.org/10.3389/fnana.2014.00156>

- Blassberg, R., Macrae, J.I., Briscoe, J., Jacob, J., 2016. Reduced cholesterol levels impair Smoothed activation in Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 25, 693–705. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv507>
- Bolande, R.P., 1974. The neurocristopathies: A unifying concept of disease arising in neural crest maldevelopment. *Hum. Pathol.* 5, 409–429. [https://doi.org/10.1016/S0046-8177\(74\)80021-3](https://doi.org/10.1016/S0046-8177(74)80021-3)
- Bolborea, M., Dale, N., 2013. Hypothalamic tanycytes: potential roles in the control of feeding and energy balance. *Trends Neurosci.* 36, 91–100. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2012.12.008>
- Bonnefond, A., Raimondo, A., Stutzmann, F., Ghossaini, M., Ramachandrapa, S., Bersten, D.C., Durand, E., Vatin, V., Balkau, B., Lantieri, O., Raverdy, V., Pattou, F., Van Hul, W., Van Gaal, L., Peet, D.J., Weill, J., Miller, J.L., Horber, F., Goldstone, A.P., Driscoll, D.J., Bruning, J.B., Meyre, D., Whitelaw, M.L., Froguel, P., 2013. Loss-of-function mutations in SIM1 contribute to obesity and Prader-Willi-like features. *J. Clin. Invest.* 123, 3037–3041. <https://doi.org/10.1172/JCI68035>
- Booth, H.D.E., Hirst, W.D., Wade-Martins, R., 2017. The Role of Astrocyte Dysfunction in Parkinson's Disease Pathogenesis. *Trends Neurosci.* 40, 358–370. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2017.04.001>
- Bosanac, I., Maun, H.R., Scales, S.J., Wen, X., Lingel, A., Bazan, J.F., de Sauvage, F.J., Hymowitz, S.G., Lazarus, R.A., 2009. The structure of SHH in complex with HHIP reveals a recognition role for the Shh pseudo active site in signaling. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 691–697. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1632>
- Boucher, J., Kleinridders, A., Kahn, C.R., 2014. Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 6. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009191>
- Bouret, S., Levin, B.E., Ozanne, S.E., 2015. Gene-environment interactions controlling energy and glucose homeostasis and the developmental origins of obesity. *Physiol. Rev.* 95, 47–82. <https://doi.org/10.1152/physrev.00007.2014>
- Bourikas, D., Pekarik, V., Baeriswyl, T., Grunditz, A., Sadhu, R., Nardó, M., Stoeckli, E.T., 2005. Sonic hedgehog guides commissural axons along the longitudinal axis of the spinal cord. *Nat. Neurosci.* 8, 297–304. <https://doi.org/10.1038/nn1396>
- Breunig, J.J., Sarkisian, M.R., Arellano, J.I., Morozov, Y.M., Ayoub, A.E., Sojitra, S., Wang, B., Flavell, R.A., Rakic, P., Town, T., 2008. Primary cilia regulate hippocampal neurogenesis by mediating sonic hedgehog signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 13127–13132. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804558105>
- Briggs, D.I., Enriori, P.J., Lemus, M.B., Cowley, M.A., Andrews, Z.B., 2010. Diet-induced obesity causes ghrelin resistance in arcuate NPY/AgRP neurons. *Endocrinology* 151, 4745–4755. <https://doi.org/10.1210/en.2010-0556>
- Briscoe, J., Small, S., 2015. Morphogen rules: design principles of gradient-mediated embryo patterning. *Dev. Camb. Engl.* 142, 3996–4009. <https://doi.org/10.1242/dev.129452>
- Briscoe, J., Théron, P.P., 2013. The mechanisms of Hedgehog signalling and its roles in development and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14, 416–429. <https://doi.org/10.1038/nrm3598>
- Brousse, B., Magalon, K., Durbec, P., Cayre, M., 2015. Region and dynamic specificities of adult neural stem cells and oligodendrocyte precursors in myelin regeneration in the mouse brain. *Biol. Open* 4, 980–992. <https://doi.org/10.1242/bio.012773>
- Browd, S.R., Kenney, A.M., Gottfried, O.N., Yoon, J.W., Walterhouse, D., Pedone, C.A., Fults, D.W., 2006. N-myc can substitute for insulin-like growth factor signaling in a mouse model of sonic hedgehog-induced medulloblastoma. *Cancer Res.* 66, 2666–2672. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-2198>
- Brugmann, S.A., Allen, N.C., James, A.W., Mekonnen, Z., Madan, E., Helms, J.A., 2010. A primary cilia-dependent etiology for midline facial disorders. *Hum. Mol. Genet.* 19, 1577–1592. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq030>
- Bryden, M.M., Evans, H.E., Keeler, R.F., 1971. Cyclopia in sheep caused by plant teratogens. *J. Anat.* 110, 507.
- Buglino, J.A., Resh, M.D., 2008. Hhat is a palmitoylacyltransferase with specificity for N-palmitoylation of Sonic Hedgehog. *J. Biol. Chem.* 283, 22076–22088. <https://doi.org/10.1074/jbc.M803901200>
- Buonamici, S., Williams, J., Morrissey, M., Wang, A., Guo, R., Vattay, A., Hsiao, K., Yuan, J., Green, J., Ospina, B., Yu, Q., Ostrom, L., Fordjour, P., Anderson, D.L., Monahan, J.E., Kelleher, J.F., Peukert, S., Pan, S.,

- Wu, X., Maira, S.-M., García-Echeverría, C., Briggs, K.J., Watkins, D.N., Yao, Y., Lengauer, C., Warmuth, M., Sellers, W.R., Dorsch, M., 2010. Interfering with resistance to smoothed antagonists by inhibition of the PI3K pathway in medulloblastoma. *Sci. Transl. Med.* 2, 51ra70. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3001599>
- Buosi, A.S., Matias, I., Araujo, A.P.B., Batista, C., Gomes, F.C.A., 2018. Heterogeneity in Synaptogenic Profile of Astrocytes from Different Brain Regions. *Mol. Neurobiol.* 55, 751–762. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-0343-z>
- Burcelin, R., Gourdy, P., 2017. Harnessing glucagon-like peptide-1 receptor agonists for the pharmacological treatment of overweight and obesity. *Obes. Rev. Off. J. Int. Assoc. Study Obes.* 18, 86–98. <https://doi.org/10.1111/obr.12465>
- Burda, J.E., Sofroniew, M.V., 2014. Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage and disease. *Neuron* 81, 229–248. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.12.034>
- Burke, R., Nellen, D., Bellotto, M., Hafen, E., Senti, K.A., Dickson, B.J., Basler, K., 1999. Dispatched, a novel sterol-sensing domain protein dedicated to the release of cholesterol-modified hedgehog from signaling cells. *Cell* 99, 803–815. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81677-3](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81677-3)
- Burness, C.B., 2015. Sonidegib: First Global Approval. *Drugs* 75, 1559–1566. <https://doi.org/10.1007/s40265-015-0458-y>
- Buxton, P., Davey, M.G., Paton, I.R., Morrice, D.R., Francis-West, P.H., Burt, D.W., Tickle, C., 2004. Craniofacial development in the talpid3 chicken mutant. *Differ. Res. Biol. Divers.* 72, 348–362. <https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.2004.07207006.x>
- Byrne, E.F., Luchetti, G., Rohatgi, R., Siebold, C., 2018. Multiple ligand binding sites regulate the Hedgehog signal transducer Smoothed in vertebrates. *Curr. Opin. Cell Biol.* 51, 81–88. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2017.10.004>
- Byrne, E.F.X., 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.P., Newstead, S., Rohatgi, R., Siebold, C., 2016. Structural basis of Smoothed regulation by its extracellular domains. *Nature* 535, 517–522. <https://doi.org/10.1038/nature18934>
- Cabezas, R., Avila, M., Gonzalez, J., El-Bachá, R.S., Báez, E., García-Segura, L.M., Jurado Coronel, J.C., Capani, F., Cardona-Gomez, G.P., Barreto, G.E., 2014. Astrocytic modulation of blood brain barrier: perspectives on Parkinson's disease. *Front. Cell. Neurosci.* 8, 211. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00211>
- Cabral, A., Valdivia, S., Fernandez, G., Reynaldo, M., Perello, M., 2014. Divergent neuronal circuitries underlying acute orexigenic effects of peripheral or central ghrelin: critical role of brain accessibility. *J. Neuroendocrinol.* 26, 542–554. <https://doi.org/10.1111/jne.12168>
- Cabrera, J.R., Sanchez-Pulido, L., Rojas, A.M., Valencia, A., Mañes, S., Naranjo, J.R., Mellström, B., 2006. Gas1 is related to the glial cell-derived neurotrophic factor family receptors alpha and regulates Ret signaling. *J. Biol. Chem.* 281, 14330–14339. <https://doi.org/10.1074/jbc.M509572200>
- Cahoy, J.D., Emery, B., Kaushal, A., Foo, L.C., Zamanian, J.L., Christopherson, K.S., Xing, Y., Lubischer, J.L., Krieg, P.A., Krupenko, S.A., Thompson, W.J., Barres, B.A., 2008. A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 264–278. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4178-07.2008>
- Callejo, A., Biloni, A., Mollica, E., Gorfinkiel, N., Andrés, G., Ibáñez, C., Torroja, C., Doglio, L., Sierra, J., Guerrero, I., 2011. Dispatched mediates Hedgehog basolateral release to form the long-range morphogenetic gradient in the *Drosophila* wing disk epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 12591–12598. <https://doi.org/10.1073/pnas.1106881108>
- Calzolari, F., Michel, J., Baumgart, E.V., Theis, F., Götz, M., Ninkovic, J., 2015. Fast clonal expansion and limited neural stem cell self-renewal in the adult subependymal zone. *Nat. Neurosci.* 18, 490–492. <https://doi.org/10.1038/nn.3963>
- 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, 223–236. <https://doi.org/10.1002/dneu.20588>

- Cardozo, M.J., Sánchez-Arrones, L., Sandonis, A., Sánchez-Camacho, C., Gestri, G., Wilson, S.W., Guerrero, I., Bovolenta, P., 2014. Cdon acts as a Hedgehog decoy receptor during proximal-distal patterning of the optic vesicle. *Nat. Commun.* 5, 4272. <https://doi.org/10.1038/ncomms5272>
- Carpenter, D., Stone, D.M., Brush, J., Ryan, A., Armanini, M., Frantz, G., Rosenthal, A., de Sauvage, F.J., 1998. Characterization of two patched receptors for the vertebrate hedgehog protein family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 13630–13634. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.23.13630>
- Carstea, E.D., Morris, J.A., Coleman, K.G., Loftus, S.K., Zhang, D., Cummings, C., Gu, J., Rosenfeld, M.A., Pavan, W.J., Krizman, D.B., Nagle, J., Polymeropoulos, M.H., Sturley, S.L., Ioannou, Y.A., Higgins, M.E., Comly, M., Cooney, A., Brown, A., Kaneski, C.R., Blanchette-Mackie, E.J., Dwyer, N.K., Neufeld, E.B., Chang, T.Y., Liscum, L., Strauss, J.F., Ohno, K., Zeigler, M., Carmi, R., Sokol, J., Markie, D., O'Neill, R.R., van Diggelen, O.P., Elleder, M., Patterson, M.C., Brady, R.O., Vanier, M.T., Pentchev, P.G., Tagle, D.A., 1997. Niemann-Pick C1 disease gene: homology to mediators of cholesterol homeostasis. *Science* 277, 228–231. <https://doi.org/10.1126/science.277.5323.228>
- Cerny, R., Lwigale, P., Ericsson, R., Meulemans, D., Epperlein, H.-H., Bronner-Fraser, M., 2004. Developmental origins and evolution of jaws: new interpretation of “maxillary” and “mandibular.” *Dev. Biol.* 276, 225–236. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.08.046>
- Ceyzériat, K., Ben Haim, L., Denizot, A., Pommier, D., Matos, M., Guillemaud, O., Palomares, M.-A., Abjean, L., Petit, F., Gipchtein, P., Gaillard, M.-C., Guillemier, M., Bernier, S., Gaudin, M., Aurégan, G., Joséphine, C., Déchamps, N., Veran, J., Langlais, V., Cambon, K., Bemelmans, A.P., Baijer, J., Bonvento, G., Dhenain, M., Deleuze, J.-F., Oliet, S.H.R., Brouillet, E., Hantraye, P., Carrillo-de Sauvage, M.-A., Olaso, R., Panatier, A., Escartin, C., 2018. Modulation of astrocyte reactivity improves functional deficits in mouse models of Alzheimer’s disease. *Acta Neuropathol. Commun.* 6, 104. <https://doi.org/10.1186/s40478-018-0606-1>
- Chai, H., Diaz-Castro, B., Shigetomi, E., Monte, E., Oceau, J.C., Yu, X., Cohn, W., Rajendran, P.S., Vondriska, T.M., Whitelegge, J.P., Coppola, G., Khakh, B.S., 2017. Neural Circuit-Specialized Astrocytes: Transcriptomic, Proteomic, Morphological, and Functional Evidence. *Neuron* 95, 531-549.e9. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.06.029>
- Chaker, Z., Codega, P., Doetsch, F., 2016. A mosaic world: puzzles revealed by adult neural stem cell heterogeneity. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* 5, 640–658. <https://doi.org/10.1002/wdev.248>
- Chamberlain, C.E., Jeong, J., Guo, C., Allen, B.L., McMahon, A.P., 2008. Notochord-derived Shh concentrates in close association with the apically positioned basal body in neural target cells and forms a dynamic gradient during neural patterning. *Dev. Camb. Engl.* 135, 1097–1106. <https://doi.org/10.1242/dev.013086>
- Chamoun, Z., Mann, R.K., Nellen, D., Kessler, D.P. von, Bellotto, M., Beachy, P.A., Basler, K., 2001. Skinny Hedgehog, an Acyltransferase Required for Palmitoylation and Activity of the Hedgehog Signal. *Science* 293, 2080–2084. <https://doi.org/10.1126/science.1064437>
- Chang, A., Nishiyama, A., Peterson, J., Prineas, J., Trapp, B.D., 2000. NG2-positive oligodendrocyte progenitor cells in adult human brain and multiple sclerosis lesions. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 20, 6404–6412.
- Chang, A., Tourtellotte, W.W., Rudick, R., Trapp, B.D., 2002. Premyelinating oligodendrocytes in chronic lesions of multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 346, 165–173. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa010994>
- Chang, A.L.S., Oro, A.E., 2012. Initial assessment of tumor regrowth after vismodegib in advanced Basal cell carcinoma. *Arch. Dermatol.* 148, 1324–1325. <https://doi.org/10.1001/archdermatol.2012.2354>
- Chang, C.-F., Schock, E.N., O’Hare, E.A., Dodgson, J., Cheng, H.H., Muir, W.M., Edelman, R.E., Delany, M.E., Brugmann, S.A., 2014. The cellular and molecular etiology of the craniofacial defects in the avian ciliopathic mutant talpid2. *Dev. Camb. Engl.* 141, 3003–3012. <https://doi.org/10.1242/dev.105924>
- Chang, K.-J., Redmond, S.A., Chan, J.R., 2016. Remodeling myelination: implications for mechanisms of neural plasticity. *Nat. Neurosci.* 19, 190–197. <https://doi.org/10.1038/nn.4200>
- Chapman, T.W., Hill, R.A., 2020. Myelin plasticity in adulthood and aging. *Neurosci. Lett.* 715, 134645. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2019.134645>
- Chari, M., Yang, C.S., Lam, C.K.L., Lee, K., Mighiu, P., Kokorovic, A., Cheung, G.W.C., Lai, T.Y.Y., Wang, P.Y.T., Lam, T.K.T., 2011. Glucose Transporter-1 in the Hypothalamic Glial Cells Mediates Glucose Sensing

- to Regulate Glucose Production In Vivo. *Diabetes* 60, 1901–1906. <https://doi.org/10.2337/db11-0120>
- 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. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00199-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00199-5)
- Charytoniuk, Dorota, Porcel, B., Rodríguez Gomez, J., Faure, H., Ruat, M., Traiffort, E., 2002. Sonic Hedgehog signalling in the developing and adult brain. *J. Physiol. Paris* 96, 9–16. [https://doi.org/10.1016/s0928-4257\(01\)00075-4](https://doi.org/10.1016/s0928-4257(01)00075-4)
- 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, 2351–2357. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2002.02412.x>
- Chechneva, O.V., Mayrhofer, F., Daugherty, D.J., Krishnamurty, R.G., Bannerman, P., Pleasure, D.E., Deng, W., 2014. A Smoothened receptor agonist is neuroprotective and promotes regeneration after ischemic brain injury. *Cell Death Dis.* 5, e1481. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.446>
- Chen, J.K., Taipale, J., Cooper, M.K., Beachy, P.A., 2002a. Inhibition of Hedgehog signaling by direct binding of cyclopamine to Smoothened. *Genes Dev.* 16, 2743–2748. <https://doi.org/10.1101/gad.1025302>
- Chen, J.K., Taipale, J., Young, K.E., Maiti, T., Beachy, P.A., 2002b. Small molecule modulation of Smoothened activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 14071–14076. <https://doi.org/10.1073/pnas.182542899>
- 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, 641–659. <https://doi.org/10.1101/gad.1185804>
- Chen, X., Tukachinsky, H., Huang, C.-H., Jao, C., Chu, Y.-R., Tang, H.-Y., Mueller, B., Schulman, S., Rapoport, T.A., Salic, A., 2011. Processing and turnover of the Hedgehog protein in the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* 192, 825–838. <https://doi.org/10.1083/jcb.201008090>
- Chen, Y., Li, S., Tong, C., Zhao, Y., Wang, B., Liu, Y., Jia, J., Jiang, J., 2010. G protein-coupled receptor kinase 2 promotes high-level Hedgehog signaling by regulating the active state of Smo through kinase-dependent and kinase-independent mechanisms in *Drosophila*. *Genes Dev.* 24, 2054–2067. <https://doi.org/10.1101/gad.1948710>
- Chen, Y., Lin, Y.-C., Kuo, T.-W., Knight, Z.A., 2015. Sensory detection of food rapidly modulates arcuate feeding circuits. *Cell* 160, 829–841. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.033>
- 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 Georget. Tex* 9, 570–579. <https://doi.org/10.4161/cc.9.3.10591>
- Chinta, S.J., Woods, G., Demaria, M., Rane, A., Zou, Y., McQuade, A., Rajagopalan, S., Limbad, C., Madden, D.T., Campisi, J., Andersen, J.K., 2018. Cellular Senescence Is Induced by the Environmental Neurotoxin Paraquat and Contributes to Neuropathology Linked to Parkinson’s Disease. *Cell Rep.* 22, 930–940. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.12.092>
- Choe, Y., Huynh, T., Pleasure, S.J., 2015. Epithelial cells supply Sonic Hedgehog to the perinatal dentate gyrus via transport by platelets. *eLife* 4. <https://doi.org/10.7554/eLife.07834>
- Choi, Y.-H., Fujikawa, T., Lee, J., Reuter, A., Kim, K.W., 2013. Revisiting the Ventral Medial Nucleus of the Hypothalamus: The Roles of SF-1 Neurons in Energy Homeostasis. *Front. Neurosci.* 7, 71. <https://doi.org/10.3389/fnins.2013.00071>
- Chuang, P.T., McMahon, A.P., 1999. Vertebrate Hedgehog signalling modulated by induction of a Hedgehog-binding protein. *Nature* 397, 617–621. <https://doi.org/10.1038/17611>
- Chung, W.-S., Clarke, L.E., Wang, G.X., Stafford, B.K., Sher, A., Chakraborty, C., Joung, J., Foo, L.C., Thompson, A., Chen, C., Smith, S.J., Barres, B.A., 2013. Astrocytes mediate synapse elimination through MEGF10 and MERTK pathways. *Nature* 504, 394–400. <https://doi.org/10.1038/nature12776>
- Cintra, D.E., Ropelle, E.R., Moraes, J.C., Pauli, J.R., Morari, J., Souza, C.T. de, Grimaldi, R., Stahl, M., Carneiro, J.B., Saad, M.J., Velloso, L.A., 2012. Unsaturated fatty acids revert diet-induced hypothalamic inflammation in obesity. *PloS One* 7, e30571. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030571>

- Ciofi, P., Garret, M., Lapirot, O., Lafon, P., Loyens, A., Prévot, V., Levine, J.E., 2009. Brain-endocrine interactions: a microvascular route in the mediobasal hypothalamus. *Endocrinology* 150, 5509–5519. <https://doi.org/10.1210/en.2009-0584>
- Clasadonte, J., Prevot, V., 2018. The special relationship: glia-neuron interactions in the neuroendocrine hypothalamus. *Nat. Rev. Endocrinol.* 14, 25–44. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.124>
- Clasadonte, J., Scemes, E., Wang, Z., Boison, D., Haydon, P.G., 2017. Connexin 43-Mediated Astroglial Metabolic Networks Contribute to the Regulation of the Sleep-Wake Cycle. *Neuron* 95, 1365–1380.e5. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.08.022>
- Clegg, D.J., Gotoh, K., Kemp, C., Wortman, M.D., Benoit, S.C., Brown, L.M., D’Alessio, D., Tso, P., Seeley, R.J., Woods, S.C., 2011. Consumption of a high-fat diet induces central insulin resistance independent of adiposity. *Physiol. Behav.* 103, 10–16. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.01.010>
- Clement, V., Sanchez, P., de Tribolet, N., Radovanovic, I., Ruiz i Altaba, A., 2007. HEDGEHOG-GLI1 signaling regulates human glioma growth, cancer stem cell self-renewal, and tumorigenicity. *Curr. Biol. CB* 17, 165–172. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.11.033>
- Cole, F., Krauss, R.S., 2003. Microform holoprosencephaly in mice that lack the Ig superfamily member Cdon. *Curr. Biol. CB* 13, 411–415. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(03\)00088-5](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(03)00088-5)
- Cole, R.K., 1942. THE “TALPID LETHAL” IN THE DOMESTIC FOWL. *J. Hered.* 33, 83–86. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a105140>
- Collden, G., Balland, E., Parkash, J., Caron, E., Langlet, F., Prevot, V., Bouret, S.G., 2015. Neonatal overnutrition causes early alterations in the central response to peripheral ghrelin. *Mol. Metab.* 4, 15–24. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2014.10.003>
- Conti, F., Minelli, A., Melone, M., 2004. GABA transporters in the mammalian cerebral cortex: localization, development and pathological implications. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 45, 196–212. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2004.03.003>
- Cooper, M.K., Porter, J.A., Young, K.E., Beachy, P.A., 1998. Teratogen-mediated inhibition of target tissue response to Shh signaling. *Science* 280, 1603–1607. <https://doi.org/10.1126/science.280.5369.1603>
- Cooper, M.K., Wassif, C.A., Krakowiak, P.A., Taipale, J., Gong, R., Kelley, R.I., Porter, F.D., Beachy, P.A., 2003. A defective response to Hedgehog signaling in disorders of cholesterol biosynthesis. *Nat. Genet.* 33, 508–513. <https://doi.org/10.1038/ng1134>
- Corbit, K.C., Aanstad, P., Singla, V., Norman, A.R., Stainier, D.Y.R., Reiter, J.F., 2005. Vertebrate Smoothed functions at the primary cilium. *Nature* 437, 1018–1021. <https://doi.org/10.1038/nature04117>
- Corcoran, R.B., Scott, M.P., 2006. Oxysterols stimulate Sonic hedgehog signal transduction and proliferation of medulloblastoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 8408–8413. <https://doi.org/10.1073/pnas.0602852103>
- Corman, T.S., Bergendahl, S.E., Epstein, D.J., 2018. Distinct temporal requirements for Sonic hedgehog signaling in development of the tuberal hypothalamus. *Dev. Camb. Engl.* 145. <https://doi.org/10.1242/dev.167379>
- Cortes, J.E., Gutzmer, R., Kieran, M.W., Solomon, J.A., 2019. Hedgehog signaling inhibitors in solid and hematological cancers. *Cancer Treat. Rev.* 76, 41–50. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2019.04.005>
- 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, 323–333. <https://doi.org/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.M., 2016. Pre-Existing Mature Oligodendrocytes Do Not Contribute to Remyelination following Toxin-Induced Spinal Cord Demyelination. *Am. J. Pathol.* 186, 511–516. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.11.005>
- Creanga, A., Glenn, T.D., Mann, R.K., Saunders, A.M., Talbot, W.S., Beachy, P.A., 2012. Scube/You activity mediates release of dually lipid-modified Hedgehog signal in soluble form. *Genes Dev.* 26, 1312–1325. <https://doi.org/10.1101/gad.191866.112>
- Crowley, V.E.F., Yeo, G.S.H., O’Rahilly, S., 2002. Obesity therapy: altering the energy intake-and-expenditure balance sheet. *Nat. Rev. Drug Discov.* 1, 276–286. <https://doi.org/10.1038/nrd770>

- 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. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.05.013>
- Dafinger, C., Liebau, M.C., Elsayed, S.M., Hellenbroich, Y., Boltshauser, E., Korenke, G.C., Fabretti, F., Janecke, A.R., Ebermann, I., Nürnberg, G., Nürnberg, P., Zentgraf, H., Koerber, F., Addicks, K., El-sobky, E., Benzing, T., Schermer, B., Bolz, H.J., 2011. Mutations in KIF7 link Joubert syndrome with Sonic Hedgehog signaling and microtubule dynamics. *J. Clin. Invest.* 121, 2662–2667. <https://doi.org/10.1172/JCI43639>
- Dahmane, N., Ruiz i Altaba, A., 1999. Sonic hedgehog regulates the growth and patterning of the cerebellum. *Dev. Camb. Engl.* 126, 3089–3100.
- Dallérac, G., Zapata, J., Rouach, N., 2018. Versatile control of synaptic circuits by astrocytes: where, when and how? *Nat. Rev. Neurosci.* 19, 729–743. <https://doi.org/10.1038/s41583-018-0080-6>
- Dalvi, P.S., Chalmers, J.A., Luo, V., Han, D.-Y., Wellhauser, L., Liu, Y., Tran, D.Q., Castel, J., Luquet, S., Wheeler, M.B., Belsham, D.D., 2017. High fat induces acute and chronic inflammation in the hypothalamus: effect of high-fat diet, palmitate and TNF- $\alpha$  on appetite-regulating NPY neurons. *Int. J. Obes.* 2005 41, 149–158. <https://doi.org/10.1038/ijo.2016.183>
- D'Amico, D., Antonucci, L., Di Magno, L., Coni, S., Sdruscia, G., Macone, A., Miele, E., Infante, P., Di Marcotullio, L., De Smaele, E., Ferretti, E., Ciapponi, L., Giangaspero, F., Yates, J.R., Agostinelli, E., Cardinali, B., Screpanti, I., Gulino, A., Canettieri, G., 2015. Non-canonical Hedgehog/AMPK-Mediated Control of Polyamine Metabolism Supports Neuronal and Medulloblastoma Cell Growth. *Dev. Cell* 35, 21–35. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.09.008>
- D'Angelo, G., Matusek, T., Pizette, S., Thérond, P.P., 2015. Endocytosis of Hedgehog through dispatched regulates long-range signaling. *Dev. Cell* 32, 290–303. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.12.004>
- 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. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3005983>
- Dass, B., Iravani, M.M., Jackson, M.J., Engber, T.M., Galdes, A., Jenner, P., 2002. Behavioural and immunohistochemical changes following supranigral administration of sonic hedgehog in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated common marmosets. *Neuroscience* 114, 99–109. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(02\)00214-2](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(02)00214-2)
- Davey, M.G., James, J., Paton, I.R., Burt, D.W., Tickle, C., 2007. Analysis of talpid3 and wild-type chicken embryos reveals roles for Hedgehog signalling in development of the limb bud vasculature. *Dev. Biol.* 301, 155–165. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.08.017>
- Davey, M.G., Paton, I.R., Yin, Y., Schmidt, M., Bangs, F.K., Morrice, D.R., Smith, T.G., Buxton, P., Stamatakis, D., Tanaka, M., Münsterberg, A.E., Briscoe, J., Tickle, C., Burt, D.W., 2006. The chicken talpid3 gene encodes a novel protein essential for Hedgehog signaling. *Genes Dev.* 20, 1365–1377. <https://doi.org/10.1101/gad.369106>
- Davies, J.P., Ioannou, Y.A., 2000. Topological analysis of Niemann-Pick C1 protein reveals that the membrane orientation of the putative sterol-sensing domain is identical to those of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase and sterol regulatory element binding protein cleavage-activating protein. *J. Biol. Chem.* 275, 24367–24374. <https://doi.org/10.1074/jbc.M002184200>
- Dawson, M.R., Levine, J.M., Reynolds, R., 2000. NG2-expressing cells in the central nervous system: are they oligodendroglial progenitors? *J. Neurosci. Res.* 61, 471–479. [https://doi.org/10.1002/1097-4547\(20000901\)61:5<471::AID-JNR1>3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/1097-4547(20000901)61:5<471::AID-JNR1>3.0.CO;2-N)
- Dawson, M.R.L., 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, 476–488. [https://doi.org/10.1016/s1044-7431\(03\)00210-0](https://doi.org/10.1016/s1044-7431(03)00210-0)
- Daynac, M., Chicheportiche, A., Pineda, J.R., Gauthier, L.R., Boussin, F.D., Mouthon, M.-A., 2013. Quiescent neural stem cells exit dormancy upon alteration of GABAAR signaling following radiation damage. *Stem Cell Res.* 11, 516–528. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2013.02.008>

- Daynac, M., Morizur, L., Chicheportiche, A., Mouthon, M.-A., Boussin, F.D., 2016a. Age-related neurogenesis decline in the subventricular zone is associated with specific cell cycle regulation changes in activated neural stem cells. *Sci. Rep.* 6, 21505. <https://doi.org/10.1038/srep21505>
- Daynac, M., Tirou, L., Faure, H., Mouthon, M.-A., Gauthier, L.R., Hahn, H., Boussin, F.D., Ruat, M., 2016b. Hedgehog Controls Quiescence and Activation of Neural Stem Cells in the Adult Ventricular-Subventricular Zone. *Stem Cell Rep.* 7, 735–748. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2016.08.016>
- Dean, D.C., Hurley, S.A., Kecskemeti, S.R., O'Grady, J.P., Canda, C., Davenport-Sis, N.J., Carlsson, C.M., Zetterberg, H., Blennow, K., Asthana, S., Sager, M.A., Johnson, S.C., Alexander, A.L., Bendlin, B.B., 2017. Association of Amyloid Pathology With Myelin Alteration in Preclinical Alzheimer Disease. *JAMA Neurol.* 74, 41–49. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2016.3232>
- DeCamp, D.L., Thompson, T.M., de Sauvage, F.J., Lerner, M.R., 2000. Smoothed activates Galphai-mediated signaling in frog melanophores. *J. Biol. Chem.* 275, 26322–26327. <https://doi.org/10.1074/jbc.M004055200>
- Derouiche, A., Pannicke, T., Haseleu, J., Blaess, S., Grosche, J., Reichenbach, A., 2012. Beyond polarity: functional membrane domains in astrocytes and Müller cells. *Neurochem. Res.* 37, 2513–2523. <https://doi.org/10.1007/s11064-012-0824-z>
- Deshmukh, V.A., Tardif, V., Lyssiotis, C.A., Green, C.C., Kerman, B., Kim, H.J., Padmanabhan, K., Swoboda, J.G., Ahmad, I., Kondo, T., Gage, F.H., Theofilopoulos, A.N., Lawson, B.R., Schultz, P.G., Lairson, L.L., 2013. A regenerative approach to the treatment of multiple sclerosis. *Nature* 502, 327–332. <https://doi.org/10.1038/nature12647>
- Deshpande, I., Liang, J., Hedeem, D., Roberts, K.J., Zhang, Y., Ha, B., Latorraca, N.R., Faust, B., Dror, R.O., Beachy, P.A., Myers, B.R., Manglik, A., 2019. Smoothed stimulation by membrane sterols drives Hedgehog pathway activity. *Nature* 571, 284–288. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1355-4>
- Dessaud, E., McMahon, A.P., Briscoe, J., 2008. Pattern formation in the vertebrate neural tube: a sonic hedgehog morphogen-regulated transcriptional network. *Dev. Camb. Engl.* 135, 2489–2503. <https://doi.org/10.1242/dev.009324>
- 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, 717–720. <https://doi.org/10.1038/nature06347>
- Diano, S., Liu, Z.-W., Jeong, J.K., Dietrich, M.O., Ruan, H.-B., Kim, E., Suyama, S., Kelly, K., Gyengesi, E., Arbisser, J.L., Belsham, D.D., Sarruf, D.A., Schwartz, M.W., Bennett, A.M., Shanabrough, M., Mobbs, C.V., Yang, X., Gao, X.-B., Horvath, T.L., 2011. Peroxisome proliferation-associated control of reactive oxygen species sets melanocortin tone and feeding in diet-induced obesity. *Nat. Med.* 17, 1121–1127. <https://doi.org/10.1038/nm.2421>
- Dijkgraaf, G.J.P., Alicke, B., Weinmann, L., Januario, T., West, K., Modrusan, Z., Burdick, D., Goldsmith, R., Robarge, K., Sutherland, D., Scales, S.J., Gould, S.E., Yauch, R.L., de Sauvage, F.J., 2011. Small molecule inhibition of GDC-0449 refractory smoothed mutants and downstream mechanisms of drug resistance. *Cancer Res.* 71, 435–444. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-2876>
- Dimou, L., Simon, C., Kirchoff, F., Takebayashi, H., Götz, M., 2008. Progeny of Olig2-Expressing Progenitors in the Gray and White Matter of the Adult Mouse Cerebral Cortex. *J. Neurosci.* 28, 10434–10442. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2831-08.2008>
- Diniz, L.P., Tortelli, V., Matias, I., Morgado, J., Bérnago Araujo, A.P., Melo, H.M., Seixas da Silva, G.S., Alves-Leon, S.V., de Souza, J.M., Ferreira, S.T., De Felice, F.G., Gomes, F.C.A., 2017. Astrocyte Transforming Growth Factor Beta 1 Protects Synapses against A $\beta$  Oligomers in Alzheimer's Disease Model. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 37, 6797–6809. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3351-16.2017>
- Djukic, B., Casper, K.B., Philpot, B.D., Chin, L.-S., McCarthy, K.D., 2007. Conditional knock-out of Kir4.1 leads to glial membrane depolarization, inhibition of potassium and glutamate uptake, and enhanced short-term synaptic potentiation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27, 11354–11365. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0723-07.2007>
- Dlugosz, A., Agrawal, S., Kirkpatrick, P., 2012. Vismodegib. *Nat. Rev. Drug Discov.* 11, 437–438. <https://doi.org/10.1038/nrd3753>

- Dodd, G.T., Decherf, S., Loh, K., Simonds, S.E., Wiede, F., Balland, E., Merry, T.L., Münzberg, H., Zhang, Z.-Y., Kahn, B.B., Neel, B.G., Bence, K.K., Andrews, Z.B., Cowley, M.A., Tiganis, T., 2015. Leptin and insulin act on POMC neurons to promote the browning of white fat. *Cell* 160, 88–104. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.12.022>
- Dodd, G.T., Tiganis, T., 2017. Insulin action in the brain: Roles in energy and glucose homeostasis. *J. Neuroendocrinol.* 29. <https://doi.org/10.1111/jne.12513>
- Doetsch, F., Caillé, I., Lim, D.A., García-Verdugo, J.M., Alvarez-Buylla, A., 1999. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 97, 703–716. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80783-7](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80783-7)
- Domingues, H.S., Cruz, A., Chan, J.R., Relvas, J.B., Rubinstein, B., Pinto, I.M., 2018. Mechanical plasticity during oligodendrocyte differentiation and myelination. *Glia* 66, 5–14. <https://doi.org/10.1002/glia.23206>
- Dorfman, M.D., Thaler, J.P., 2015. Hypothalamic inflammation and gliosis in obesity. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* 22, 325–330. <https://doi.org/10.1097/MED.0000000000000182>
- Dossi, E., Vasile, F., Rouach, N., 2018. Human astrocytes in the diseased brain. *Brain Res. Bull.* 136, 139–156. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2017.02.001>
- Duncan, G.J., Plemel, J.R., Assinck, P., Manesh, S.B., Muir, F.G.W., Hirata, R., Berson, M., Liu, J., Wegner, M., Emery, B., Moore, G.R.W., Tetzlaff, W., 2017. Myelin regulatory factor drives remyelination in multiple sclerosis. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 134, 403–422. <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1741-7>
- Duncan, I.D., Brower, A., Kondo, Y., Curlee, J.F., Schultz, R.D., 2009. Extensive remyelination of the CNS leads to functional recovery. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 6832–6836. <https://doi.org/10.1073/pnas.0812500106>
- Duncan, I.D., Radcliff, A.B., 2016. Inherited and acquired disorders of myelin: The underlying myelin pathology. *Exp. Neurol.* 283, 452–475. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2016.04.002>
- Duncan, I.D., Radcliff, A.B., Heidari, M., Kidd, G., August, B.K., Wierenga, L.A., 2018. The adult oligodendrocyte can participate in remyelination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115, E11807–E11816. <https://doi.org/10.1073/pnas.1808064115>
- Durkee, C.A., Araque, A., 2019. DIVERSITY AND SPECIFICITY OF ASTROCYTE-NEURON COMMUNICATION. *Neuroscience* 396, 73–78. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.11.010>
- Dwyer, J.R., Sever, N., Carlson, M., Nelson, S.F., Beachy, P.A., Parhami, F., 2007. Oxysterols are novel activators of the hedgehog signaling pathway in pluripotent mesenchymal cells. *J. Biol. Chem.* 282, 8959–8968. <https://doi.org/10.1074/jbc.M611741200>
- Eaton, S., 2008. Multiple roles for lipids in the Hedgehog signalling pathway. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 437–445. <https://doi.org/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, 1417–1430. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90627-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90627-3)
- Eggenschwiler, J.T., Anderson, K.V., 2007. Cilia and developmental signaling. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 23, 345–373. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.23.090506.123249>
- Elkins, C.A., Mullis, L.B., 2006. Mammalian steroid hormones are substrates for the major RND- and MFS-type tripartite multidrug efflux pumps of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 188, 1191–1195. <https://doi.org/10.1128/JB.188.3.1191-1195.2006>
- Ellis, T., Smyth, I., Riley, E., Graham, S., Elliot, K., Narang, M., Kay, G.F., Wicking, C., Wainwright, B., 2003. Patched 1 conditional null allele in mice. *Genes. N. Y. N* 2000 36, 158–161. <https://doi.org/10.1002/gene.10208>
- El-Mir, M.Y., Nogueira, V., Fontaine, E., Avéret, N., Rigoulet, M., Leverve, X., 2000. Dimethylbiguanide inhibits cell respiration via an indirect effect targeted on the respiratory chain complex I. *J. Biol. Chem.* 275, 223–228. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.1.223>
- 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, 172–185. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.04.031>

- Emery, B., Lu, Q.R., 2015. Transcriptional and Epigenetic Regulation of Oligodendrocyte Development and Myelination in the Central Nervous System. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 7, a020461. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020461>
- Encinas, J.M., Michurina, T.V., Peunova, N., Park, J.-H., Tordo, J., Peterson, D.A., Fishell, G., Koulakov, A., Enikolopov, G., 2011. Division-Coupled Astrocytic Differentiation and Age-Related Depletion of Neural Stem Cells in the Adult Hippocampus. *Cell Stem Cell* 8, 566–579. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.03.010>
- Endoh-Yamagami, S., Evangelista, M., Wilson, D., Wen, X., Theunissen, J.-W., Phamluong, K., Davis, M., Scales, S.J., Solloway, M.J., de Sauvage, F.J., Peterson, A.S., 2009. The mammalian *Cos2* homolog *Kif7* plays an essential role in modulating Hh signal transduction during development. *Curr. Biol. CB* 19, 1320–1326. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.06.046>
- Enriori, P.J., Sinnayah, P., Simonds, S.E., Garcia Rudaz, C., Cowley, M.A., 2011. Leptin action in the dorsomedial hypothalamus increases sympathetic tone to brown adipose tissue in spite of systemic leptin resistance. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 31, 12189–12197. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2336-11.2011>
- Ericson, J., Morton, S., Kawakami, A., Roelink, H., Jessell, T.M., 1996. Two critical periods of Sonic Hedgehog signaling required for the specification of motor neuron identity. *Cell* 87, 661–673. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81386-0](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81386-0)
- Ernst, M.B., Wunderlich, C.M., Hess, S., Paehler, M., Mesaros, A., Koralov, S.B., Kleinridders, A., Husch, A., Münzberg, H., Hampel, B., Alber, J., Kloppenburg, P., Brüning, J.C., Wunderlich, F.T., 2009. Enhanced Stat3 activation in POMC neurons provokes negative feedback inhibition of leptin and insulin signaling in obesity. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 11582–11593. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5712-08.2009>
- Escartin, C., Guillemaud, O., Sauvage, M.-A.C., 2019. Questions and (some) answers on reactive astrocytes. *Glia* 67, 2221–2247. <https://doi.org/10.1002/glia.23687>
- Etxeberria, A., Hokanson, K.C., Dao, D.Q., Mayoral, S.R., Mei, F., Redmond, S.A., Ullian, E.M., Chan, J.R., 2016. Dynamic Modulation of Myelination in Response to Visual Stimuli Alters Optic Nerve Conduction Velocity. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 36, 6937–6948. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0908-16.2016>
- Fabre, P.J., Shimogori, T., Charron, F., 2010. Segregation of ipsilateral retinal ganglion cell axons at the optic chiasm requires the Shh receptor *Boc*. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 30, 266–275. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3778-09.2010>
- Falcão, A.M., van Bruggen, D., Marques, S., Meijer, M., Jäkel, S., Agirre, E., Samudiyata, null, Floriddia, E.M., Vanichkina, D.P., Ffrench-Constant, C., Williams, A., Guerreiro-Cacais, A.O., Castelo-Branco, G., 2018. Disease-specific oligodendrocyte lineage cells arise in multiple sclerosis. *Nat. Med.* 24, 1837–1844. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0236-y>
- Fancy, S.P.J., Harrington, E.P., Yuen, T.J., Silbereis, J.C., Zhao, C., Baranzini, S.E., Bruce, C.C., Otero, J.J., Huang, E.J., Nusse, R., Franklin, R.J.M., Rowitch, D.H., 2011. *Axin2* as regulatory and therapeutic target in newborn brain injury and remyelination. *Nat. Neurosci.* 14, 1009–1016. <https://doi.org/10.1038/nn.2855>
- Farmer, W.T., Abrahamsson, T., Chierzi, S., Lui, C., Zaelzer, C., Jones, E.V., Bally, B.P., Chen, G.G., Thérout, 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, 849–854. <https://doi.org/10.1126/science.aab3103>
- Farmer, W.T., Murai, K., 2017. Resolving Astrocyte Heterogeneity in the CNS. *Front. Cell. Neurosci.* 11, 300. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00300>
- Feng, S., Ma, S., Jia, C., Su, Y., Yang, S., Zhou, K., Liu, Y., Cheng, J., Lu, D., Fan, L., Wang, Y., 2016. Sonic hedgehog is a regulator of extracellular glutamate levels and epilepsy. *EMBO Rep.* 17, 682–694. <https://doi.org/10.15252/embr.201541569>

- Fenselau, H., Campbell, J.N., Verstegen, A.M.J., Madara, J.C., Xu, J., Shah, B.P., Resch, J.M., Yang, Z., Mandelblat-Cerf, Y., Livneh, Y., Lowell, B.B., 2017. A rapidly acting glutamatergic ARC→PVH satiety circuit postsynaptically regulated by  $\alpha$ -MSH. *Nat. Neurosci.* 20, 42–51. <https://doi.org/10.1038/nn.4442>
- 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 Rep.* 3, 312–323. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2014.05.016>
- Ferent, J., Zimmer, C., Durbec, P., Ruat, M., Traiffort, E., 2013. Sonic Hedgehog signaling is a positive oligodendrocyte regulator during demyelination. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 33, 1759–1772. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3334-12.2013>
- Fiacco, T.A., McCarthy, K.D., 2018. Multiple Lines of Evidence Indicate That Gliotransmission Does Not Occur under Physiological Conditions. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 38, 3–13. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0016-17.2017>
- Fields, R.D., 2008. White matter in learning, cognition and psychiatric disorders. *Trends Neurosci.* 31, 361–370. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2008.04.001>
- Fleet, A., Lee, J.P.Y., Tamachi, A., Javeed, I., Hamel, P.A., 2016. Activities of the Cytoplasmic Domains of Patched-1 Modulate but Are Not Essential for the Regulation of Canonical Hedgehog Signaling. *J. Biol. Chem.* 291, 17557–17568. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.731745>
- Fleury, A., Hoch, L., Martinez, M.C., Faure, H., Taddei, M., Petricci, E., Manetti, F., Girard, N., Mann, A., Jacques, C., Larghero, J., Ruat, M., Andriantsitohaina, R., Le Lay, S., 2016. Hedgehog associated to microparticles inhibits adipocyte differentiation via a non-canonical pathway. *Sci. Rep.* 6, 23479. <https://doi.org/10.1038/srep23479>
- Foerster, S., Hill, M.F.E., Franklin, R.J.M., 2019. Diversity in the oligodendrocyte lineage: Plasticity or heterogeneity? *Glia* 67, 1797–1805. <https://doi.org/10.1002/glia.23607>
- Forbes, T.A., Gallo, V., 2017. All Wrapped Up: Environmental Effects on Myelination. *Trends Neurosci.* 40, 572–587. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2017.06.009>
- Fox, I.J., Daley, G.Q., Goldman, S.A., Huard, J., Kamp, T.J., Trucco, M., 2014. Stem cell therapy. Use of differentiated pluripotent stem cells as replacement therapy for treating disease. *Science* 345, 1247391. <https://doi.org/10.1126/science.1247391>
- Franklin, R.J.M., Ffrench-Constant, C., 2017. Regenerating CNS myelin - from mechanisms to experimental medicines. *Nat. Rev. Neurosci.* 18, 753–769. <https://doi.org/10.1038/nrn.2017.136>
- Franklin, R.J.M., Goldman, S.A., 2015. Glia Disease and Repair—Remyelination. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 7, a020594. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020594>
- Frayling, C., Britton, R., Dale, N., 2011. ATP-mediated glucosensing by hypothalamic tanycytes. *J. Physiol.* 589, 2275–2286. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.202051>
- Friedland-Little, J.M., Hoffmann, A.D., Ocbina, P.J.R., Peterson, M.A., Bosman, J.D., Chen, Y., Cheng, S.Y., Anderson, K.V., Moskowitz, I.P., 2011. A novel murine allele of Intraflagellar Transport Protein 172 causes a syndrome including VACTERL-like features with hydrocephalus. *Hum. Mol. Genet.* 20, 3725–3737. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr241>
- Frühbeis, C., Fröhlich, D., Kuo, W.P., Amphornrat, J., Thilemann, S., Saab, A.S., Kirchhoff, F., Möbius, W., Goebbels, S., Nave, K.-A., Schneider, A., Simons, M., Klugmann, M., Trotter, J., Krämer-Albers, E.-M., 2013. Neurotransmitter-triggered transfer of exosomes mediates oligodendrocyte-neuron communication. *PLoS Biol.* 11, e1001604. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001604>
- Fuente-Martín, E., García-Cáceres, C., Argente-Arizón, P., Díaz, F., Granado, M., Freire-Regatillo, A., Castro-González, D., Ceballos, M.L., Frago, L.M., Dickson, S.L., Argente, J., Chowen, J.A., 2016. Ghrelin Regulates Glucose and Glutamate Transporters in Hypothalamic Astrocytes. *Sci. Rep.* 6, 23673. <https://doi.org/10.1038/srep23673>
- Fünfschilling, U., Supplie, L.M., Mahad, D., Boretius, S., Saab, A.S., Edgar, J., Brinkmann, B.G., Kassmann, C.M., Tzvetanova, I.D., Möbius, W., Diaz, F., Meijer, D., Suter, U., Hamprecht, B., Sereda, M.W., Moraes, C.T., Frahm, J., Goebbels, S., Nave, K.-A., 2012. Glycolytic oligodendrocytes maintain myelin and long-term axonal integrity. *Nature* 485, 517–521. <https://doi.org/10.1038/nature11007>

- Furusho, M., Kaga, Y., Ishii, A., Hébert, J.M., Bansal, R., 2011. Fibroblast growth factor signaling is required for the generation of oligodendrocyte progenitors from the embryonic forebrain. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 31, 5055–5066. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4800-10.2011>
- Gallet, A., Rodriguez, R., Ruel, L., Therond, P.P., 2003. Cholesterol modification of hedgehog is required for trafficking and movement, revealing an asymmetric cellular response to hedgehog. *Dev. Cell* 4, 191–204. [https://doi.org/10.1016/s1534-5807\(03\)00031-5](https://doi.org/10.1016/s1534-5807(03)00031-5)
- Gallet, A., Ruel, L., Staccini-Lavenant, L., Théron, P.P., 2006. Cholesterol modification is necessary for controlled planar long-range activity of Hedgehog in *Drosophila* epithelia. *Dev. Camb. Engl.* 133, 407–418. <https://doi.org/10.1242/dev.02212>
- Galvin, K.E., Ye, H., Erstad, D.J., Feddersen, R., Wetmore, C., 2008. Gli1 Induces G2/M Arrest and Apoptosis in Hippocampal but Not Tumor-Derived Neural Stem Cells. *STEM CELLS* 26, 1027–1036. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0879>
- Gao, P., Postiglione, M.P., Krieger, T.G., Hernandez, L., Wang, C., Han, Z., Streicher, C., Pampusheva, E., Insolera, R., Chugh, K., Kodish, O., Huang, K., Simons, B.D., Luo, L., Hippenmeyer, S., Shi, S.-H., 2014. Deterministic progenitor behavior and unitary production of neurons in the neocortex. *Cell* 159, 775–788. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.10.027>
- Gao, Y., Bielohuby, M., Fleming, T., Grabner, G.F., Foppen, E., Bernhard, W., Guzmán-Ruiz, M., Layritz, C., Legutko, B., Zinser, E., García-Cáceres, C., Buijs, R.M., Woods, S.C., Kalsbeek, A., Seeley, R.J., Nawroth, P.P., Bidlingmaier, M., Tschöp, M.H., Yi, C.-X., 2017. Dietary sugars, not lipids, drive hypothalamic inflammation. *Mol. Metab.* 6, 897–908. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2017.06.008>
- Garcia, A.D.R., Han, Y.-G., Triplett, J.W., Farmer, W.T., Harwell, C.C., Ihrie, R.A., 2018. The Elegance of Sonic Hedgehog: Emerging Novel Functions for a Classic Morphogen. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 38, 9338–9345. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1662-18.2018>
- Garcia, A.D.R., Petrova, R., Eng, L., Joyner, A.L., 2010. Sonic hedgehog regulates discrete populations of astrocytes in the adult mouse forebrain. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 30, 13597–13608. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0830-10.2010>
- García-Cáceres, C., Bolland, E., Prevot, V., Luquet, S., Woods, S.C., Koch, M., Horvath, T.L., Yi, C.-X., Chowen, J.A., Verkhatsky, A., Araque, A., Bechmann, I., Tschöp, M.H., 2019. Role of astrocytes, microglia, and tanycytes in brain control of systemic metabolism. *Nat. Neurosci.* 22, 7–14. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0286-y>
- García-Cáceres, C., Quarta, C., Varela, L., Gao, Y., Gruber, T., Legutko, B., Jastroch, M., Johansson, P., Ninkovic, J., Yi, C.-X., Le Thuc, O., Szigeti-Buck, K., Cai, W., Meyer, C.W., Pfluger, P.T., Fernandez, A.M., Luquet, S., Woods, S.C., Torres-Alemán, I., Kahn, C.R., Götz, M., Horvath, T.L., Tschöp, M.H., 2016. Astrocytic Insulin Signaling Couples Brain Glucose Uptake with Nutrient Availability. *Cell* 166, 867–880. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.07.028>
- Garfield, A.S., Li, C., Madara, J.C., Shah, B.P., Webber, E., Steger, J.S., Campbell, J.N., Gavrilova, O., Lee, C.E., Olson, D.P., Elmquist, J.K., Tannous, B.A., Krashes, M.J., Lowell, B.B., 2015. A neural basis for melanocortin-4 receptor-regulated appetite. *Nat. Neurosci.* 18, 863–871. <https://doi.org/10.1038/nn.4011>
- Gazerani, P., 2019. Probiotics for Parkinson’s Disease. *Int. J. Mol. Sci.* 20. <https://doi.org/10.3390/ijms20174121>
- Genoud, C., Quairiaux, C., Steiner, P., Hirling, H., Welker, E., Knott, G.W., 2006. Plasticity of astrocytic coverage and glutamate transporter expression in adult mouse cortex. *PLoS Biol.* 4, e343. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040343>
- Gerdes, J.M., Davis, E.E., Katsanis, N., 2009. The vertebrate primary cilium in development, homeostasis, and disease. *Cell* 137, 32–45. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.03.023>
- 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. <https://doi.org/10.1126/science.1252304>

- Godfrey, K.M., Reynolds, R.M., Prescott, S.L., Nyirenda, M., Jaddoe, V.W.V., Eriksson, J.G., Broekman, B.F.P., 2017. Influence of maternal obesity on the long-term health of offspring. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 5, 53–64. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(16\)30107-3](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(16)30107-3)
- Goebbels, S., Wieser, G.L., Pieper, A., Spitzer, S., Weege, B., Yan, K., Edgar, J.M., Yagensky, O., Wichert, S.P., Agarwal, A., Karram, K., Renier, N., Tessier-Lavigne, M., Rossner, M.J., Káradóttir, R.T., Nave, K.-A., 2017. A neuronal PI(3,4,5)P3-dependent program of oligodendrocyte precursor recruitment and myelination. *Nat. Neurosci.* 20, 10–15. <https://doi.org/10.1038/nn.4425>
- Goetz, J.A., Singh, S., Suber, L.M., Kull, F.J., Robbins, D.J., 2006. A highly conserved amino-terminal region of sonic hedgehog is required for the formation of its freely diffusible multimeric form. *J. Biol. Chem.* 281, 4087–4093. <https://doi.org/10.1074/jbc.M511427200>
- Goldman, S.A., Kuypers, N.J., 2015. How to make an oligodendrocyte. *Dev. Camb. Engl.* 142, 3983–3995. <https://doi.org/10.1242/dev.126409>
- Goldman, S.A., Nedergaard, M., Windrem, M.S., 2012. Glial progenitor cell-based treatment and modeling of neurological disease. *Science* 338, 491–495. <https://doi.org/10.1126/science.1218071>
- Gomez, H.G., Noguchi, H., Castillo, J.G., Aguilar, D., Pleasure, S.J., Yabut, O.R., 2019. Suppressor of Fused regulates the proliferation of postnatal neural stem and precursor cells via a Gli3-dependent mechanism. *Biol. Open* 8. <https://doi.org/10.1242/bio.039248>
- Gong, X., Qian, H., Cao, P., Zhao, X., Zhou, Q., Lei, J., Yan, N., 2018. Structural basis for the recognition of Sonic Hedgehog by human Patched1. *Science* 361. <https://doi.org/10.1126/science.aas8935>
- Gonzalez-Perez, O., Alvarez-Buylla, A., 2011. Oligodendrogenesis in the subventricular zone and the role of epidermal growth factor. *Brain Res. Rev.* 67, 147–156. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2011.01.001>
- Gonzalez-Reyes, L.E., Chiang, C.-C., Zhang, M., Johnson, J., Arrillaga-Tamez, M., Couturier, N.H., Reddy, N., Starikov, L., Capadona, J.R., Kottmann, A.H., Durand, D.M., 2019. Sonic Hedgehog is expressed by hilar mossy cells and regulates cellular survival and neurogenesis in the adult hippocampus. *Sci. Rep.* 9, 17402. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53192-4>
- Gonzalez-Reyes, L.E., Verbitsky, M., Blesa, J., Jackson-Lewis, V., Paredes, D., Tillack, K., Phani, S., Kramer, E.R., Przedborski, S., Kottmann, A.H., 2012. Sonic hedgehog maintains cellular and neurochemical homeostasis in the adult nigrostriatal circuit. *Neuron* 75, 306–319. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.05.018>
- Goodrich, L.V., Milenković, L., Higgins, K.M., Scott, M.P., 1997. Altered neural cell fates and medulloblastoma in mouse patched mutants. *Science* 277, 1109–1113. <https://doi.org/10.1126/science.277.5329.1109>
- Gordon, G.R.J., Baimoukhametova, D.V., Hewitt, S.A., Rajapaksha, W.R.A.K.J.S., Fisher, T.E., Bains, J.S., 2005. Norepinephrine triggers release of glial ATP to increase postsynaptic efficacy. *Nat. Neurosci.* 8, 1078–1086. <https://doi.org/10.1038/nn1498>
- Gordon, G.R.J., Iremonger, K.J., Kantevari, S., Ellis-Davies, G.C.R., MacVicar, B.A., Bains, J.S., 2009. Astrocyte-mediated distributed plasticity at hypothalamic glutamate synapses. *Neuron* 64, 391–403. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.10.021>
- Gorina, R., Font-Nieves, M., Márquez-Kisinousky, L., Santalucia, T., Planas, A.M., 2011. Astrocyte TLR4 activation induces a proinflammatory environment through the interplay between MyD88-dependent NFκB signaling, MAPK, and Jak1/Stat1 pathways. *Glia* 59, 242–255. <https://doi.org/10.1002/glia.21094>
- Goritz, C., Mauch, D.H., Pfrieger, F.W., 2005. Multiple mechanisms mediate cholesterol-induced synaptogenesis in a CNS neuron. *Mol. Cell. Neurosci.* 29, 190–201. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2005.02.006>
- Gorojankina, T., Hoch, L., Faure, H., Roudaut, H., Traiffort, E., Schoenfelder, A., Girard, N., Mann, A., Manetti, F., Solinas, A., Petricci, E., Taddei, M., Ruat, M., 2013. Discovery, molecular and pharmacological characterization of GSA-10, a novel small-molecule positive modulator of Smoothed. *Mol. Pharmacol.* 83, 1020–1029. <https://doi.org/10.1124/mol.112.084590>
- Gradilla, A.-C., González, E., Seijo, I., Andrés, G., Bischoff, M., González-Mendez, L., Sánchez, V., Callejo, A., Ibáñez, C., Guerra, M., Ortigão-Farias, J.R., Sutherland, J.D., González, M., Barrio, R., Falcón-Pérez,

- J.M., Guerrero, I., 2014. Exosomes as Hedgehog carriers in cytoneme-mediated transport and secretion. *Nat. Commun.* 5, 5649. <https://doi.org/10.1038/ncomms6649>
- Grayson, B.E., Levasseur, P.R., Williams, S.M., Smith, M.S., Marks, D.L., Grove, K.L., 2010. Changes in melatonin expression and inflammatory pathways in fetal offspring of nonhuman primates fed a high-fat diet. *Endocrinology* 151, 1622–1632. <https://doi.org/10.1210/en.2009-1019>
- Grelat, A., Benoit, L., Wagner, S., Moigneu, C., Lledo, P.-M., Alonso, M., 2018. Adult-born neurons boost odor-reward association. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115, 2514–2519. <https://doi.org/10.1073/pnas.1716400115>
- Gritli-Linde, A., Lewis, P., McMahon, A.P., Linde, A., 2001. The whereabouts of a morphogen: direct evidence for short- and graded long-range activity of hedgehog signaling peptides. *Dev. Biol.* 236, 364–386. <https://doi.org/10.1006/dbio.2001.0336>
- Gulino, A., Arcella, A., Giangaspero, F., 2008. Pathological and molecular heterogeneity of medulloblastoma. *Curr. Opin. Oncol.* 20, 668–675. <https://doi.org/10.1097/CCO.0b013e32831369f4>
- Gulino, A., Ferretti, E., De Smaele, E., 2009. Hedgehog signalling in colon cancer and stem cells. *EMBO Mol. Med.* 1, 300–302. <https://doi.org/10.1002/emmm.200900042>
- Haan, N., Goodman, T., Najdi-Samiei, A., Stratford, C.M., Rice, R., El Agha, E., Bellusci, S., Hajihosseini, M.K., 2013. Fgf10-expressing tanycytes add new neurons to the appetite/energy-balance regulating centers of the postnatal and adult hypothalamus. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 33, 6170–6180. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2437-12.2013>
- Häcker, U., Lin, X., Perrimon, N., 1997. The *Drosophila* sugarless gene modulates Wingless signaling and encodes an enzyme involved in polysaccharide biosynthesis. *Dev. Camb. Engl.* 124, 3565–3573.
- Haidet-Phillips, A.M., Maragakis, N.J., 2015. Neural and glial progenitor transplantation as a neuroprotective strategy for Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS). *Brain Res.* 1628, 343–350. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.06.035>
- Halawi, H., Khemani, D., Eckert, D., O'Neill, J., Kadouh, H., Grothe, K., Clark, M.M., Burton, D.D., Vella, A., Acosta, A., Zinsmeister, A.R., Camilleri, M., 2017. Effects of liraglutide on weight, satiation, and gastric functions in obesity: a randomised, placebo-controlled pilot trial. *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* 2, 890–899. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(17\)30285-6](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(17)30285-6)
- Hamilton, N.B., Attwell, D., 2010. Do astrocytes really exocytose neurotransmitters? *Nat. Rev. Neurosci.* 11, 227–238. <https://doi.org/10.1038/nrn2803>
- Hammond, R., Blaess, S., Abeliovich, A., 2009. Sonic hedgehog is a chemoattractant for midbrain dopaminergic axons. *PLoS One* 4, e7007. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007007>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.11.015>
- Han, C., Belenkaya, T.Y., Wang, B., Lin, X., 2004. *Drosophila* glypicans control the cell-to-cell movement of Hedgehog by a dynamin-independent process. *Dev. Camb. Engl.* 131, 601–611. <https://doi.org/10.1242/dev.00958>
- Han, J.C., Liu, Q.-R., Jones, M., Levinn, R.L., Menzie, C.M., Jefferson-George, K.S., Adler-Wailes, D.C., Sanford, E.L., Lacbawan, F.L., Uhl, G.R., Rennert, O.M., Yanovski, J.A., 2008. Brain-derived neurotrophic factor and obesity in the WAGR syndrome. *N. Engl. J. Med.* 359, 918–927. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0801119>
- Han, Y.-G., Kim, H.J., Dlugosz, A.A., Ellison, D.W., Gilbertson, R.J., Alvarez-Buylla, A., 2009. Dual and opposing roles of primary cilia in medulloblastoma development. *Nat. Med.* 15, 1062–1065. <https://doi.org/10.1038/nm.2020>
- 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, 277–284. <https://doi.org/10.1038/nn2059>
- Harris, J.J., Jolivet, R., Attwell, D., 2012. Synaptic energy use and supply. *Neuron* 75, 762–777. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.08.019>

- Harwell, C.C., Parker, P.R.L., 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, 1116–1126. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.02.009>
- Hasanovic, A., Mus-Veteau, I., 2018. Targeting the Multidrug Transporter Ptch1 Potentiates Chemotherapy Efficiency. *Cells* 7. <https://doi.org/10.3390/cells7080107>
- Hasel, P., Dando, O., Jiwaji, Z., Baxter, P., Todd, A.C., Heron, S., Márkus, N.M., McQueen, J., Hampton, D.W., Torvell, M., Tiwari, S.S., McKay, S., Eraso-Pichot, A., Zorzano, A., Masgrau, R., Galea, E., Chandran, S., Wyllie, D.J.A., Simpson, T.I., Hardingham, G.E., 2017. Neurons and neuronal activity control gene expression in astrocytes to regulate their development and metabolism. *Nat. Commun.* 8, 15132. <https://doi.org/10.1038/ncomms15132>
- Haycraft, C.J., Banizs, B., Aydin-Son, Y., Zhang, Q., Michaud, E.J., Yoder, B.K., 2005. Gli2 and Gli3 localize to cilia and require the intraflagellar transport protein polaris for processing and function. *PLoS Genet.* 1, e53. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0010053>
- He, M., Subramanian, R., Bangs, F., Omelchenko, T., Liem, K.F., Kapoor, T.M., Anderson, K.V., 2014. The Kinesin-4 Protein KIF7 Regulates Mammalian Hedgehog Signaling by Organizing the Cilia Tip Compartment. *Nat. Cell Biol.* 16, 663–672. <https://doi.org/10.1038/ncb2988>
- Heal, W.P., Jovanovic, B., Bessin, S., Wright, M.H., Magee, A.I., Tate, E.W., 2011. Bioorthogonal chemical tagging of protein cholesterylation in living cells. *Chem. Commun. Camb. Engl.* 47, 4081–4083. <https://doi.org/10.1039/c0cc04710d>
- Hedger, G., Koldsø, H., Chavent, M., Siebold, C., Rohatgi, R., Sansom, M.S.P., 2019. Cholesterol Interaction Sites on the Transmembrane Domain of the Hedgehog Signal Transducer and Class F G Protein-Coupled Receptor Smoothened. *Struct. Lond. Engl.* 1993 27, 549-559.e2. <https://doi.org/10.1016/j.str.2018.11.003>
- Helman, G., Van Haren, K., Bonkowsky, J.L., Bernard, G., Pizzino, A., Braverman, N., Suhr, D., Patterson, M.C., Ali Fatemi, S., Leonard, J., van der Knaap, M.S., Back, S.A., Damiani, S., Goldman, S.A., Takano-hashii, A., Petryniak, M., Rowitch, D., Messing, A., Wrabetz, L., Schiffmann, R., Eichler, F., Escolar, M.L., Vanderver, A., GLIA Consortium, 2015. Disease specific therapies in leukodystrophies and leukoencephalopathies. *Mol. Genet. Metab.* 114, 527–536. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2015.01.014>
- Helms, J.A., Cordero, D., Tapadia, M.D., 2005. New insights into craniofacial morphogenesis. *Dev. Camb. Engl.* 132, 851–861. <https://doi.org/10.1242/dev.01705>
- Hess, M.E., Brüning, J.C., 2014. The fat mass and obesity-associated (FTO) gene: Obesity and beyond? *Biochim. Biophys. Acta* 1842, 2039–2047. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.01.017>
- Hill, R.A., Li, A.M., Grutzendler, J., 2018. Lifelong cortical myelin plasticity and age-related degeneration in the live mammalian brain. *Nat. Neurosci.* 21, 683–695. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0120-6>
- Hill, S.A., Blaeser, A.S., Coley, A.A., Xie, Y., Shepard, K.A., Harwell, C.C., Gao, W.-J., Garcia, A.D.R., 2019. Sonic hedgehog signaling in astrocytes mediates cell type-specific synaptic organization. *eLife* 8. <https://doi.org/10.7554/eLife.45545>
- Hirschberg, P.R., Sarkar, P., Teegala, S.B., Routh, V.H., 2020. Ventromedial hypothalamus glucose-inhibited neurones: A role in glucose and energy homeostasis? *J. Neuroendocrinol.* 32, e12773. <https://doi.org/10.1111/jne.12773>
- Hoch, L., Faure, H., Roudaut, H., Schoenfelder, A., Mann, A., Girard, N., Bihannic, L., Ayrault, O., Petricci, E., Taddei, M., Rognan, D., Ruat, M., 2015. MRT-92 inhibits Hedgehog signaling by blocking overlapping binding sites in the transmembrane domain of the Smoothened receptor. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 29, 1817–1829. <https://doi.org/10.1096/fj.14-267849>
- Hollenberg, A.N., 2008. The role of the thyrotropin-releasing hormone (TRH) neuron as a metabolic sensor. *Thyroid Off. J. Am. Thyroid Assoc.* 18, 131–139. <https://doi.org/10.1089/thy.2007.0251>
- Holtz, A.M., Griffiths, S.C., Davis, S.J., Bishop, B., Siebold, C., Allen, B.L., 2015. Secreted HHIP1 interacts with heparan sulfate and regulates Hedgehog ligand localization and function. *J. Cell Biol.* 209, 739–757. <https://doi.org/10.1083/jcb.201411024>
- Holtz, A.M., Peterson, K.A., Nishi, Y., Morin, S., Song, J.Y., Charron, F., McMahon, A.P., Allen, B.L., 2013. Essential role for ligand-dependent feedback antagonism of vertebrate hedgehog signaling by PTCH1,

- PTCH2 and HHIP1 during neural patterning. *Dev. Camb. Engl.* 140, 3423–3434. <https://doi.org/10.1242/dev.095083>
- Hormoz, S., 2013. Stem cell population asymmetry can reduce rate of replicative aging. *J. Theor. Biol.* 331, 19–27. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2013.04.018>
- Horvath, T.L., Sarman, B., García-Cáceres, C., Enriori, P.J., Sotonyi, P., Shanabrough, M., Borok, E., Argente, J., Chowen, J.A., Perez-Tilve, D., Pfluger, P.T., Brönneke, H.S., Levin, B.E., Diano, S., Cowley, M.A., Tschöp, M.H., 2010. Synaptic input organization of the melanocortin system predicts diet-induced hypothalamic reactive gliosis and obesity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 14875–14880. <https://doi.org/10.1073/pnas.1004282107>
- Hosoya, T., Arai, M.A., Koyano, T., Kowithayakorn, T., Ishibashi, M., 2008. Naturally occurring small-molecule inhibitors of hedgehog/GLI-mediated transcription. *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.* 9, 1082–1092. <https://doi.org/10.1002/cbic.200700511>
- Hsuchou, H., Pan, W., Barnes, M.J., Kastin, A.J., 2009. Leptin receptor mRNA in rat brain astrocytes. *Peptides* 30, 2275–2280. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2009.08.023>
- Hu, A., Song, B.-L., 2019. The interplay of Patched, Smoothed and cholesterol in Hedgehog signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* 61, 31–38. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2019.06.008>
- Hu, D., Helms, J.A., 1999. The role of sonic hedgehog in normal and abnormal craniofacial morphogenesis. *Dev. Camb. Engl.* 126, 4873–4884.
- Huang, N., Niu, J., Feng, Y., Xiao, L., 2015. Oligodendroglial Development: New Roles for Chromatin Accessibility. *Neurosci. Rev. J. Bringing Neurobiol. Neurol. Psychiatry* 21, 579–588. <https://doi.org/10.1177/1073858414565467>
- Huang, P., Nedelcu, D., Watanabe, M., Jao, C., Kim, Y., Liu, J., Salic, A., 2016. Cellular Cholesterol Directly Activates Smoothed in Hedgehog Signaling. *Cell* 166, 1176–1187.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.003>
- Huang, P., Zheng, S., Wierbowski, B.M., Kim, Y., Nedelcu, D., Aravena, L., Liu, J., Kruse, A.C., Salic, A., 2018. Structural Basis of Smoothed Activation in Hedgehog Signaling. *Cell* 175, 295–297. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.09.003>
- Huangfu, D., Anderson, K.V., 2006. Signaling from Smo to Ci/Gli: conservation and divergence of Hedgehog pathways from Drosophila to vertebrates. *Dev. Camb. Engl.* 133, 3–14. <https://doi.org/10.1242/dev.02169>
- Huangfu, D., Liu, A., Rakeman, A.S., Murcia, N.S., Niswander, L., Anderson, K.V., 2003. Hedgehog signalling in the mouse requires intraflagellar transport proteins. *Nature* 426, 83–87. <https://doi.org/10.1038/nature02061>
- 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, 668–676. <https://doi.org/10.1038/nn.3390>
- Hughes, E.G., Orthmann-Murphy, J.L., Langseth, A.J., Bergles, D.E., 2018. Myelin remodeling through experience-dependent oligodendrogenesis in the adult somatosensory cortex. *Nat. Neurosci.* 21, 696–706. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0121-5>
- Hui, C.-C., Angers, S., 2011. Gli proteins in development and disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 27, 513–537. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154048>
- Humke, E.W., Dorn, K.V., Milenkovic, L., Scott, M.P., Rohatgi, R., 2010. The output of Hedgehog signaling is controlled by the dynamic association between Suppressor of Fused and the Gli proteins. *Genes Dev.* 24, 670–682. <https://doi.org/10.1101/gad.1902910>
- Iglesias-Rozas, J.R., Garrosa, M., 2012. The discovery of oligodendroglia cells by Rio-Hortega: his original articles. 1921. *Clin. Neuropathol.* 31, 437–439.
- 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, 250–262. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.05.018>
- Incardona, J.P., Roelink, H., 2000. The role of cholesterol in Shh signaling and teratogen-induced holoprosencephaly. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 57, 1709–1719. <https://doi.org/10.1007/PL00000653>

- Infante, P., Mori, M., Alfonsi, R., Ghirga, F., Aiello, F., Toscano, S., Ingallina, C., Siler, M., Cucchi, D., Po, A., Miele, E., D'Amico, D., Canettieri, G., De Smaele, E., Ferretti, E., Screpanti, I., Uccello Barretta, G., Botta, M., Botta, B., Gulino, A., Di Marcotullio, L., 2015. Gli1/DNA interaction is a druggable target for Hedgehog-dependent tumors. *EMBO J.* 34, 200–217. <https://doi.org/10.15252/embj.201489213>
- Ingham, P.W., Nakano, Y., Seger, C., 2011. Mechanisms and functions of Hedgehog signalling across the metazoa. *Nat. Rev. Genet.* 12, 393–406. <https://doi.org/10.1038/nrg2984>
- Izzi, L., Lévesque, 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. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.04.017>
- Jablonska, A., Kozłowska, H., Markiewicz, I., Domanska-Janik, K., Lukomska, B., 2010. Transplantation of neural stem cells derived from human cord blood to the brain of adult and neonatal rats. *Acta Neurol. Exp. (Warsz.)* 70, 337–350.
- Jackman, N., Ishii, A., Bansal, R., 2009. Oligodendrocyte development and myelin biogenesis: parsing out the roles of glycosphingolipids. *Physiol. Bethesda Md* 24, 290–297. <https://doi.org/10.1152/physiol.00016.2009>
- Jais, A., Brüning, J.C., 2017. Hypothalamic inflammation in obesity and metabolic disease. *J. Clin. Invest.* 127, 24–32. <https://doi.org/10.1172/JCI88878>
- Jakobs, P., Exner, S., Schürmann, S., Pickhinke, U., Bandari, S., Ortmann, 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, 1726–1737. <https://doi.org/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. <https://doi.org/10.3389/neuro.05.005.2009>
- Jensen, S.K., Yong, V.W., 2016. Activity-Dependent and Experience-Driven Myelination Provide New Directions for the Management of Multiple Sclerosis. *Trends Neurosci.* 39, 356–365. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2016.04.003>
- 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. *Dev. Camb. Engl.* 132, 143–154. <https://doi.org/10.1242/dev.01566>
- Jeong, J.K., Kim, J.G., Lee, B.J., 2014. Participation of the central melanocortin system in metabolic regulation and energy homeostasis. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 71, 3799–3809. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1650-z>
- Jia, J., Kolterud, A., Zeng, H., Hoover, A., Teglund, S., Toftgård, R., Liu, A., 2009. Suppressor of Fused inhibits mammalian Hedgehog signaling in the absence of cilia. *Dev. Biol.* 330, 452–460. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.04.009>
- Jiang, J., Hui, C.-C., 2008. Hedgehog signaling in development and cancer. *Dev. Cell* 15, 801–812. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.11.010>
- Jiang, R., Hausteiner, M.D., Sofroniew, M.V., Khakh, B.S., 2014. Imaging Intracellular Ca<sup>2+</sup> Signals in Striatal Astrocytes from Adult Mice Using Genetically-encoded Calcium Indicators. *J. Vis. Exp. JoVE.* <https://doi.org/10.3791/51972>
- Jin, Y., Barnett, A., Zhang, Y., Yu, X., Luo, Y., 2017. Poststroke Sonic Hedgehog Agonist Treatment Improves Functional Recovery by Enhancing Neurogenesis and Angiogenesis. *Stroke* 48, 1636–1645. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.117.016650>
- Jin, Y., Raviv, N., Barnett, A., Bambakidis, N.C., Filichia, E., Luo, Y., 2015. The shh signaling pathway is upregulated in multiple cell types in cortical ischemia and influences the outcome of stroke in an animal model. *PLoS One* 10, e0124657. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124657>
- John Lin, C.-C., Yu, K., Hatcher, A., Huang, T.-W., Lee, H.K., Carlson, J., Weston, M.C., Chen, F., Zhang, Y., Zhu, W., Mohila, C.A., Ahmed, N., Patel, A.J., Arenkiel, B.R., Noebels, J.L., Creighton, C.J., Deneen, B., 2017. Identification of diverse astrocyte populations and their malignant analogs. *Nat. Neurosci.* 20, 396–405. <https://doi.org/10.1038/nn.4493>

- Johnson, R.L., Milenkovic, L., Scott, M.P., 2000. In vivo functions of the patched protein: requirement of the C terminus for target gene inactivation but not Hedgehog sequestration. *Mol. Cell* 6, 467–478. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)00045-9](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)00045-9)
- Joly-Amado, A., Denis, R.G.P., Castel, J., Lacombe, A., Cansell, C., Rouch, C., Kassis, N., Dairou, J., Cani, P.D., Ventura-Clapier, R., Prola, A., Flamment, M., Fouflle, F., Magnan, C., Luquet, S., 2012. Hypothalamic AgRP-neurons control peripheral substrate utilization and nutrient partitioning. *EMBO J.* 31, 4276–4288. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.250>
- Kacem, K., Lacombe, P., Seylaz, J., Bonvento, G., 1998. Structural organization of the perivascular astrocyte endfeet and their relationship with the endothelial glucose transporter: a confocal microscopy study. *Glia* 23, 1–10.
- Kaiser, M., Maletzki, I., Hülsmann, S., Holtmann, B., Schulz-Schaeffer, W., Kirchhoff, F., Bähr, M., Neusch, C., 2006. Progressive loss of a glial potassium channel (KCNJ10) in the spinal cord of the SOD1 (G93A) transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurochem.* 99, 900–912. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04131.x>
- Kalia, L.V., Lang, A.E., 2015. Parkinson's disease. *Lancet Lond. Engl.* 386, 896–912. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61393-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61393-3)
- Kanda, S., Mochizuki, Y., Suematsu, T., Miyata, Y., Nomata, K., Kanetake, H., 2003. Sonic hedgehog induces capillary morphogenesis by endothelial cells through phosphoinositide 3-kinase. *J. Biol. Chem.* 278, 8244–8249. <https://doi.org/10.1074/jbc.M210635200>
- 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, 203–213. <https://doi.org/10.1083/jcb.138.1.203>
- 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, 114–124. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.1.114>
- Kang, W., Balordi, F., Su, N., Chen, L., Fishell, G., Hébert, J.M., 2014. Astrocyte activation is suppressed in both normal and injured brain by FGF signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, E2987–2995. <https://doi.org/10.1073/pnas.1320401111>
- Karhadkar, S.S., Bova, G.S., Abdallah, N., Dhara, S., Gardner, D., Maitra, A., Isaacs, J.T., Berman, D.M., Beachy, P.A., 2004. Hedgehog signalling in prostate regeneration, neoplasia and metastasis. *Nature* 431, 707–712. <https://doi.org/10.1038/nature02962>
- Kawakami, T., Kawcak, T., Li, Y.-J., Zhang, W., Hu, Y., Chuang, P.-T., 2002. Mouse dispatched mutants fail to distribute hedgehog proteins and are defective in hedgehog signaling. *Dev. Camb. Engl.* 129, 5753–5765. <https://doi.org/10.1242/dev.00178>
- Kaye, S.B., Fehrenbacher, L., Holloway, R., Amit, A., Karlan, B., Slomovitz, B., Sabbatini, P., Fu, L., Yauch, R.L., Chang, I., Reddy, J.C., 2012. A phase II, randomized, placebo-controlled study of vismodegib as maintenance therapy in patients with ovarian cancer in second or third complete remission. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 18, 6509–6518. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-1796>
- Kelley, R.L., Roessler, E., Hennekam, R.C., Feldman, G.L., Kosaki, K., Jones, M.C., Palumbos, J.C., Muenke, M., 1996. Holoprosencephaly in RSH/Smith-Lemli-Opitz syndrome: does abnormal cholesterol metabolism affect the function of Sonic Hedgehog? *Am. J. Med. Genet.* 66, 478–484. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-8628\(19961230\)66:4<478::AID-AJMG22>3.0.CO;2-Q](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-8628(19961230)66:4<478::AID-AJMG22>3.0.CO;2-Q)
- Kenakin, T., Christopoulos, A., 2013. Signalling bias in new drug discovery: detection, quantification and therapeutic impact. *Nat. Rev. Drug Discov.* 12, 205–216. <https://doi.org/10.1038/nrd3954>
- Kessarlis, 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, 173–179. <https://doi.org/10.1038/nn1620>
- Kessarlis, N., Jamen, F., Rubin, L.L., Richardson, W.D., 2004. Cooperation between sonic hedgehog and fibroblast growth factor/MAPK signalling pathways in neocortical precursors. *Dev. Camb. Engl.* 131, 1289–1298. <https://doi.org/10.1242/dev.01027>

- Khakh, B.S., Sofroniew, M.V., 2015. Diversity of astrocyte functions and phenotypes in neural circuits. *Nat. Neurosci.* 18, 942–952. <https://doi.org/10.1038/nn.4043>
- Kietzman, H.W., Everson, J.L., Sulik, K.K., Lipinski, R.J., 2014. The teratogenic effects of prenatal ethanol exposure are exacerbated by Sonic Hedgehog or GLI2 haploinsufficiency in the mouse. *PLoS One* 9, e89448. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089448>
- Kim, D.J., Kim, J., Spaulhurst, K., Montoya, J., Khodosh, R., Chandra, K., Fu, T., Gilliam, A., Molgo, M., Beachy, P.A., Tang, J.Y., 2014. Open-label, exploratory phase II trial of oral itraconazole for the treatment of basal cell carcinoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 32, 745–751. <https://doi.org/10.1200/JCO.2013.49.9525>
- Kim, James, Aftab, B.T., Tang, J.Y., Kim, D., Lee, A.H., Rezaee, M., Kim, Jynho, Chen, B., King, E.M., Borodovsky, A., Riggins, G.J., Epstein, E.H., Beachy, P.A., Rudin, C.M., 2013. Itraconazole and arsenic trioxide inhibit Hedgehog pathway activation and tumor growth associated with acquired resistance to smoothened antagonists. *Cancer Cell* 23, 23–34. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.11.017>
- Kim, James, Tang, J.Y., Gong, R., Kim, Jynho, Lee, J.J., Clemons, K.V., Chong, C.R., Chang, K.S., Fereshteh, M., Gardner, D., Reya, T., Liu, J.O., Epstein, E.H., Stevens, D.A., Beachy, P.A., 2010. Itraconazole, a commonly used antifungal that inhibits Hedgehog pathway activity and cancer growth. *Cancer Cell* 17, 388–399. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.02.027>
- Kim, J.G., Suyama, S., Koch, M., Jin, S., Argente-Arizon, P., Argente, J., Liu, Z.-W., Zimmer, M.R., Jeong, J.K., Szigeti-Buck, K., Gao, Y., Garcia-Caceres, C., Yi, C.-X., Salmasso, N., Vaccarino, F.M., Chowen, J., Diano, S., Dietrich, M.O., Tschöp, M.H., Horvath, T.L., 2014. Leptin signaling in astrocytes regulates hypothalamic neuronal circuits and feeding. *Nat. Neurosci.* 17, 908–910. <https://doi.org/10.1038/nn.3725>
- Kim, Jynho, Lee, J.J., Kim, James, Gardner, D., Beachy, P.A., 2010. Arsenic antagonizes the Hedgehog pathway by preventing ciliary accumulation and reducing stability of the Gli2 transcriptional effector. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 13432–13437. <https://doi.org/10.1073/pnas.1006822107>
- Kim, K.-S., Seeley, R.J., Sandoval, D.A., 2018. Signalling from the periphery to the brain that regulates energy homeostasis. *Nat. Rev. Neurosci.* 19, 185–196. <https://doi.org/10.1038/nrn.2018.8>
- Kim, K.W., Zhao, L., Donato, J., Kohno, D., Xu, Y., Elias, C.F., Lee, C., Parker, K.L., Elmquist, J.K., 2011. Steroidogenic factor 1 directs programs regulating diet-induced thermogenesis and leptin action in the ventral medial hypothalamic nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 10673–10678. <https://doi.org/10.1073/pnas.1102364108>
- Kim, S.H., Després, J.-P., Koh, K.K., 2016. Obesity and cardiovascular disease: friend or foe? *Eur. Heart J.* 37, 3560–3568. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehv509>
- King, B.M., 2006. The rise, fall, and resurrection of the ventromedial hypothalamus in the regulation of feeding behavior and body weight. *Physiol. Behav.* 87, 221–244. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2005.10.007>
- Klämbt, C., 2009. Modes and regulation of glial migration in vertebrates and invertebrates. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 769–779. <https://doi.org/10.1038/nrn2720>
- Klein, C., Zwick, A., Kissel, S., Forster, C.U., Pfeifer, D., Follo, M., Illert, A.L., Decker, S., Benkler, T., Pahl, H., Oostendorp, R.A.J., Aumann, K., Duyster, J., Dierks, C., 2016. Ptch2 loss drives myeloproliferation and myeloproliferative neoplasm progression. *J. Exp. Med.* 213, 273–290. <https://doi.org/10.1084/jem.20150556>
- Ko, A.H., LoConte, N., Tempero, M.A., Walker, E.J., Kate Kelley, R., Lewis, S., Chang, W.-C., Kantoff, E., Vannier, M.W., Catenacci, D.V., Venook, A.P., Kindler, H.L., 2016. A Phase I Study of FOLFIRINOX Plus IPI-926, a Hedgehog Pathway Inhibitor, for Advanced Pancreatic Adenocarcinoma. *Pancreas* 45, 370–375. <https://doi.org/10.1097/MPA.0000000000000458>
- Koch, L., Wunderlich, F.T., Seibler, J., Könnner, A.C., Hampel, B., Irlenbusch, S., Brabant, G., Kahn, C.R., Schwenk, F., Brüning, J.C., 2008. Central insulin action regulates peripheral glucose and fat metabolism in mice. *J. Clin. Invest.* 118, 2132–2147. <https://doi.org/10.1172/JCI31073>
- Koch, M., Varela, L., Kim, J.G., Kim, J.D., Hernández-Nuño, F., Simonds, S.E., Castorena, C.M., Vianna, C.R., Elmquist, J.K., Morozov, Y.M., Rakic, P., Bechmann, I., Cowley, M.A., Szigeti-Buck, K., Dietrich, M.O.,

- Gao, X.-B., Diano, S., Horvath, T.L., 2015. Hypothalamic POMC neurons promote cannabinoid-induced feeding. *Nature* 519, 45–50. <https://doi.org/10.1038/nature14260>
- Kogerman, P., Grimm, T., Kogerman, L., Krause, D., Undén, A.B., Sandstedt, B., Toftgård, R., Zaphiropoulos, P.G., 1999. Mammalian suppressor-of-fused modulates nuclear-cytoplasmic shuttling of Gli-1. *Nat. Cell Biol.* 1, 312–319. <https://doi.org/10.1038/13031>
- Komitova, M., Serwanski, D.R., Lu, Q.R., Nishiyama, A., 2011. NG2 cells are not a major source of reactive astrocytes after neocortical stab wound injury. *Glia* 59, 800–809. <https://doi.org/10.1002/glia.21152>
- Kong, D., Tong, Q., Ye, C., Koda, S., Fuller, P.M., Krashes, M.J., Vong, L., Ray, R.S., Olson, D.P., Lowell, B.B., 2012. GABAergic RIP-Cre neurons in the arcuate nucleus selectively regulate energy expenditure. *Cell* 151, 645–657. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.09.020>
- Kong, J.H., Siebold, C., Rohatgi, R., 2019. Biochemical mechanisms of vertebrate hedgehog signaling. *Dev. Camb. Engl.* 146. <https://doi.org/10.1242/dev.166892>
- Könner, A.C., Janoschek, R., Plum, L., Jordan, S.D., Rother, E., Ma, X., Xu, C., Enriori, P., Hampel, B., Barsh, G.S., Kahn, C.R., Cowley, M.A., Ashcroft, F.M., Brüning, J.C., 2007. Insulin action in AgRP-expressing neurons is required for suppression of hepatic glucose production. *Cell Metab.* 5, 438–449. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.05.004>
- Könner, A.C., Klöckener, T., Brüning, J.C., 2009. Control of energy homeostasis by insulin and leptin: targeting the arcuate nucleus and beyond. *Physiol. Behav.* 97, 632–638. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2009.03.027>
- 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 smoothened to the primary cilium. *Science* 320, 1777–1781. <https://doi.org/10.1126/science.1157983>
- Kowatsch, C., Woolley, R.E., Kinnebrew, M., Rohatgi, R., Siebold, C., 2019. Structures of vertebrate Patched and Smoothened reveal intimate links between cholesterol and Hedgehog signalling. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 57, 204–214. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2019.05.015>
- 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, 1431–1444. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90628-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90628-4)
- Kristiansen, K., 2004. Molecular mechanisms of ligand binding, signaling, and regulation within the superfamily of G-protein-coupled receptors: molecular modeling and mutagenesis approaches to receptor structure and function. *Pharmacol. Ther.* 103, 21–80. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2004.05.002>
- Kubo, M., Nakamura, M., Tasaki, A., Yamanaka, N., Nakashima, H., Nomura, M., Kuroki, S., Katano, M., 2004. Hedgehog signaling pathway is a new therapeutic target for patients with breast cancer. *Cancer Res.* 64, 6071–6074. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0416>
- Kuhlmann, T., Miron, V., Cui, Q., Cuo, Q., Wegner, C., Antel, J., Brück, W., 2008. Differentiation block of oligodendroglial progenitor cells as a cause for remyelination failure in chronic multiple sclerosis. *Brain J. Neurol.* 131, 1749–1758. <https://doi.org/10.1093/brain/awn096>
- Kuhn, S., Gritti, L., Crooks, D., Dombrowski, Y., 2019. Oligodendrocytes in Development, Myelin Generation and Beyond. *Cells* 8. <https://doi.org/10.3390/cells8111424>
- Lai, K., Kaspar, B.K., Gage, F.H., Schaffer, D.V., 2003. Sonic hedgehog regulates adult neural progenitor proliferation in vitro and in vivo. *Nat. Neurosci.* 6, 21–27. <https://doi.org/10.1038/nn983>
- Lane, C.A., Hardy, J., Schott, J.M., 2018. Alzheimer's disease. *Eur. J. Neurol.* 25, 59–70. <https://doi.org/10.1111/ene.13439>
- Langlet, F., 2014. Tanycytes: a gateway to the metabolic hypothalamus. *J. Neuroendocrinol.* 26, 753–760. <https://doi.org/10.1111/jne.12191>
- Langlet, F., Levin, B.E., Luquet, S., Mazzone, M., Messina, A., Dunn-Meynell, A.A., Bolland, E., Lacombe, A., Mazur, D., Carmeliet, P., Bouret, S.G., Prevot, V., Dehouck, B., 2013. Tanycytic VEGF-A boosts blood-hypothalamus barrier plasticity and access of metabolic signals to the arcuate nucleus in response to fasting. *Cell Metab.* 17, 607–617. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.03.004>

- Laouarem, Y., Traiffort, E., 2018. Developmental and Repairing Production of Myelin: The Role of Hedgehog Signaling. *Front. Cell. Neurosci.* 12. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00305>
- Lasiene, J., Matsui, A., Sawa, Y., Wong, F., Horner, P.J., 2009. Age-related myelin dynamics revealed by increased oligodendrogenesis and short internodes. *Aging Cell* 8, 201–213. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2009.00462.x>
- Laug, D., Glasgow, S.M., Deneen, B., 2018. A glial blueprint for gliomagenesis. *Nat. Rev. Neurosci.* 19, 393–403. <https://doi.org/10.1038/s41583-018-0014-3>
- Le Foll, C., Levin, B.E., 2016. Fatty acid-induced astrocyte ketone production and the control of food intake. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 310, R1186–1192. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00113.2016>
- Lee, C.S., Fan, C.M., 2001. Embryonic expression patterns of the mouse and chick *Gas1* genes. *Mech. Dev.* 101, 293–297. [https://doi.org/10.1016/s0925-4773\(01\)00283-0](https://doi.org/10.1016/s0925-4773(01)00283-0)
- Lee, D.A., Bedont, J.L., Pak, T., Wang, H., Song, J., Miranda-Angulo, A., Takiar, V., Charubhumi, V., Balordi, F., Takebayashi, H., Aja, S., Ford, E., Fishell, G., Blackshaw, S., 2012. Tanycytes of the hypothalamic median eminence form a diet-responsive neurogenic niche. *Nat. Neurosci.* 15, 700–702. <https://doi.org/10.1038/nn.3079>
- 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, 2092–2103. <https://doi.org/10.2337/db14-1017>
- Lee, J.J., Ekker, S.C., von Kessler, D.P., Porter, J.A., Sun, B.I., Beachy, P.A., 1994. Autoproteolysis in hedgehog protein biogenesis. *Science* 266, 1528–1537. <https://doi.org/10.1126/science.7985023>
- Lee, R.T.H., Zhao, Z., Ingham, P.W., 2016. Hedgehog signalling. *Development* 143, 367–372. <https://doi.org/10.1242/dev.120154>
- Lee, Y., Miller, H.L., Russell, H.R., Boyd, K., Curran, T., McKinnon, P.J., 2006. Patched2 modulates tumorigenesis in patched1 heterozygous mice. *Cancer Res.* 66, 6964–6971. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-0505>
- Lee, Y., Morrison, B.M., Li, Y., Lengacher, S., Farah, M.H., Hoffman, P.N., Liu, Y., Tsingalia, A., Jin, L., Zhang, P.-W., Pellerin, L., Magistretti, P.J., Rothstein, J.D., 2012. Oligodendroglia metabolically support axons and contribute to neurodegeneration. *Nature* 487, 443–448. <https://doi.org/10.1038/nature11314>
- Lepousez, G., Valley, M.T., Lledo, P.-M., 2013. The impact of adult neurogenesis on olfactory bulb circuits and computations. *Annu. Rev. Physiol.* 75, 339–363. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-030212-183731>
- Levine, J.M., Reynolds, R., Fawcett, J.W., 2001. The oligodendrocyte precursor cell in health and disease. *Trends Neurosci.* 24, 39–47. [https://doi.org/10.1016/s0166-2236\(00\)01691-x](https://doi.org/10.1016/s0166-2236(00)01691-x)
- Lewis, P.M., Dunn, M.P., McMahan, J.A., Logan, M., Martin, J.F., St-Jacques, B., McMahan, A.P., 2001. Cholesterol modification of sonic hedgehog is required for long-range signaling activity and effective modulation of signaling by Ptc1. *Cell* 105, 599–612. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00369-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00369-5)
- Li, G., Fang, L., Fernández, G., Pleasure, S.J., 2013. The ventral hippocampus is the embryonic origin for adult neural stem cells in the dentate gyrus. *Neuron* 78, 658–672. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.03.019>
- Li, H., Lu, Y., Smith, H.K., Richardson, W.D., 2007. Olig1 and Sox10 interact synergistically to drive myelin basic protein transcription in oligodendrocytes. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27, 14375–14382. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4456-07.2007>
- Li, W.L., Chu, M.W., Wu, A., Suzuki, Y., Imayoshi, I., Komiyama, T., 2018. Adult-born neurons facilitate olfactory bulb pattern separation during task engagement. *eLife* 7. <https://doi.org/10.7554/eLife.33006>
- Liddel, S.A., Guttenplan, K.A., Clarke, L.E., Bennett, F.C., Bohlen, C.J., Schirmer, L., Bennett, M.L., Münch, A.E., Chung, W.-S., Peterson, T.C., Wilton, D.K., Frouin, A., Napier, B.A., Panicker, N., Kumar, M., Buckwalter, M.S., Rowitch, D.H., Dawson, V.L., Dawson, T.M., Stevens, B., Barres, B.A., 2017. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature* 541, 481–487. <https://doi.org/10.1038/nature21029>

- Liem, K.F., He, M., Ocbina, P.J.R., Anderson, K.V., 2009. Mouse Kif7/Costal2 is a cilia-associated protein that regulates Sonic hedgehog signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 13377–13382. <https://doi.org/10.1073/pnas.0906944106>
- Lin, G., Goldman, J.E., 2009. An FGF-responsive astrocyte precursor isolated from the neonatal forebrain. *Glia* 57, 592–603. <https://doi.org/10.1002/glia.20788>
- Lin, X., 2004. Functions of heparan sulfate proteoglycans in cell signaling during development. *Dev. Camb. Engl.* 131, 6009–6021. <https://doi.org/10.1242/dev.01522>
- Lin, X., Wei, G., Shi, Z., Dryer, L., Esko, J.D., Wells, D.E., Matzuk, M.M., 2000. Disruption of gastrulation and heparan sulfate biosynthesis in EXT1-deficient mice. *Dev. Biol.* 224, 299–311. <https://doi.org/10.1006/dbio.2000.9798>
- Lindberg, N., Kastemar, M., Olofsson, T., Smits, A., Uhrbom, L., 2009. Oligodendrocyte progenitor cells can act as cell of origin for experimental glioma. *Oncogene* 28, 2266–2275. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.76>
- Lippman, J.J., Lordkipanidze, T., Buell, M.E., Yoon, S.O., Dunaevsky, A., 2008. Morphogenesis and regulation of Bergmann glial processes during Purkinje cell dendritic spine ensheathment and synaptogenesis. *Glia* 56, 1463–1477. <https://doi.org/10.1002/glia.20712>
- Liu, A., Wang, B., Niswander, L.A., 2005. Mouse intraflagellar transport proteins regulate both the activator and repressor functions of Gli transcription factors. *Dev. Camb. Engl.* 132, 3103–3111. <https://doi.org/10.1242/dev.01894>
- Liu, C., Bookout, A.L., Lee, S., Sun, K., Jia, L., Lee, C., Udit, S., Deng, Y., Scherer, P.E., Mangelsdorf, D.J., Gauthron, L., Elmquist, J.K., 2014. PPAR $\gamma$  in vagal neurons regulates high-fat diet induced thermogenesis. *Cell Metab.* 19, 722–730. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.01.021>
- Liu, D., Bai, X., Ma, W., Xin, D., Chu, X., Yuan, H., Qiu, J., Ke, H., Yin, S., Chen, W., Wang, Z., 2020. Purmorphamine Attenuates Neuro-Inflammation and Synaptic Impairments After Hypoxic-Ischemic Injury in Neonatal Mice via Shh Signaling. *Front. Pharmacol.* 11, 204. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00204>
- Lledo, P.-M., Saghatelian, A., 2005. Integrating new neurons into the adult olfactory bulb: joining the network, life-death decisions, and the effects of sensory experience. *Trends Neurosci.* 28, 248–254. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2005.03.005>
- Loftus, S.K., Morris, J.A., Carstea, E.D., Gu, J.Z., Cummings, C., Brown, A., Ellison, J., Ohno, K., Rosenfeld, M.A., Tagle, D.A., Pentchev, P.G., Pavan, W.J., 1997. Murine model of Niemann-Pick C disease: mutation in a cholesterol homeostasis gene. *Science* 277, 232–235. <https://doi.org/10.1126/science.277.5323.232>
- Logan, C.Y., Nusse, R., 2004. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20, 781–810. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.20.010403.113126>
- Lopez Juarez, A., He, D., Richard Lu, Q., 2016. Oligodendrocyte progenitor programming and reprogramming: Toward myelin regeneration. *Brain Res., NG2-glia: the fourth glial cell type?* 1638, 209–220. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.10.051>
- 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, 530–542. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03896.x>
- Louvi, A., Grove, E.A., 2011. Cilia in the CNS: the quiet organelle claims center stage. *Neuron* 69, 1046–1060. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.03.002>
- Lu, X., Liu, S., Kornberg, T.B., 2006. The C-terminal tail of the Hedgehog receptor Patched regulates both localization and turnover. *Genes Dev.* 20, 2539–2551. <https://doi.org/10.1101/gad.1461306>
- Luchetti, G., Sircar, R., Kong, J.H., Nachtergaele, S., Sagner, A., Byrne, E.F., Covey, D.F., Siebold, C., Rohatgi, R., 2016. Cholesterol activates the G-protein coupled receptor Smoothed to promote Hedgehog signaling. *eLife* 5. <https://doi.org/10.7554/eLife.20304>
- Lugert, S., Basak, O., Knuckles, P., Haussler, U., Fabel, K., Götz, M., Haas, C.A., Kempermann, G., Taylor, V., Giachino, C., 2010. Quiescent and active hippocampal neural stem cells with distinct morphologies respond selectively to physiological and pathological stimuli and aging. *Cell Stem Cell* 6, 445–456. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.03.017>

- Ma, Y., Erkner, A., Gong, R., Yao, S., Taipale, J., Basler, K., Beachy, P.A., 2002. Hedgehog-mediated patterning of the mammalian embryo requires transporter-like function of Dispatched. *Cell* 111, 63–75. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)00977-7](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00977-7)
- 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, 937–950. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(03\)00561-0](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(03)00561-0)
- Madhavan, L., Daley, B.F., Paumier, K.L., Collier, T.J., 2009. Transplantation of subventricular zone neural precursors induces an endogenous precursor cell response in a rat model of Parkinson’s disease. *J. Comp. Neurol.* 515, 102–115. <https://doi.org/10.1002/cne.22033>
- Magnusson, J.P., Göritz, C., Tatarishvili, J., Dias, D.O., Smith, E.M.K., Lindvall, O., Kokaia, Z., Frisén, J., 2014. A latent neurogenic program in astrocytes regulated by Notch signaling in the mouse. *Science* 346, 237–241. <https://doi.org/10.1126/science.346.6206.237>
- Malik, N., Wang, X., Shah, S., Efthymiou, A.G., Yan, B., Heman-Ackah, S., Zhan, M., Rao, M., 2014. Comparison of the gene expression profiles of human fetal cortical astrocytes with pluripotent stem cell derived neural stem cells identifies human astrocyte markers and signaling pathways and transcription factors active in human astrocytes. *PLoS One* 9, e96139. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096139>
- Manikowski, D., Kastl, P., Grobe, K., 2018. Taking the Occam’s Razor Approach to Hedgehog Lipidation and Its Role in Development. *J. Dev. Biol.* 6. <https://doi.org/10.3390/jdb6010003>
- Mann, R.K., Beachy, P.A., 2000. Cholesterol modification of proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1529, 188–202. [https://doi.org/10.1016/s1388-1981\(00\)00148-7](https://doi.org/10.1016/s1388-1981(00)00148-7)
- Mansuy-Aubert, V., Gautron, L., Lee, S., Bookout, A.L., Kusminski, C., Sun, K., Zhang, Y., Scherer, P.E., Mangelsdorf, D.J., Elmquist, J.K., 2015. Loss of the liver X receptor LXR $\alpha/\beta$  in peripheral sensory neurons modifies energy expenditure. *eLife* 4. <https://doi.org/10.7554/eLife.06667>
- Marston, O.J., Garfield, A.S., Heisler, L.K., 2011. Role of central serotonin and melanocortin systems in the control of energy balance. *Eur. J. Pharmacol.* 660, 70–79. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.12.024>
- Martín, V., Carrillo, G., Torroja, C., Guerrero, I., 2001. The sterol-sensing domain of Patched protein seems to control Smoothened activity through Patched vesicular trafficking. *Curr. Biol. CB* 11, 601–607. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(01\)00178-6](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(01)00178-6)
- Martinelli, D.C., Fan, C.-M., 2007. Gas1 extends the range of Hedgehog action by facilitating its signaling. *Genes Dev.* 21, 1231–1243. <https://doi.org/10.1101/gad.1546307>
- Martínez, M.C., Larbret, F., Zobairi, F., Coulombe, J., Debili, N., Vainchenker, W., Ruat, M., Freyssinet, J.-M., 2006. Transfer of differentiation signal by membrane microvesicles harboring hedgehog morphogens. *Blood* 108, 3012–3020. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-04-019109>
- Martin-Fernandez, M., Jamison, S., Robin, L.M., Zhao, Z., Martin, E.D., Aguilar, J., Benneyworth, M.A., Marsicano, G., Araque, A., 2017. Synapse-specific astrocyte gating of amygdala-related behavior. *Nat. Neurosci.* 20, 1540–1548. <https://doi.org/10.1038/nn.4649>
- Masdeu, C., Bernard, V., Faure, H., Traiffort, E., Ruat, M., 2007. Distribution of Smoothened at hippocampal mossy fiber synapses. *Neuroreport* 18, 395–399. <https://doi.org/10.1097/WNR.0b013e32801421ce>
- Masdeu, C., Faure, H., Coulombe, J., Schoenfelder, A., Mann, A., Brabet, I., Pin, J.-P., Traiffort, E., Ruat, M., 2006. Identification and characterization of Hedgehog modulator properties after functional coupling of Smoothened to G15. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 349, 471–479. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.07.216>
- Masters, C.L., Bateman, R., Blennow, K., Rowe, C.C., Sperling, R.A., Cummings, J.L., 2015. Alzheimer’s disease. *Nat. Rev. Dis. Primer* 1, 15056. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.56>
- Matias, I., Morgado, J., Gomes, F.C.A., 2019. Astrocyte Heterogeneity: Impact to Brain Aging and Disease. *Front. Aging Neurosci.* 11, 59. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2019.00059>
- Matusek, T., Wendler, F., Polès, S., Pizette, S., D’Angelo, G., Fürthauer, M., Théron, P.P., 2014. The ESCRT machinery regulates the secretion and long-range activity of Hedgehog. *Nature* 516, 99–103. <https://doi.org/10.1038/nature13847>

- Matz-Soja, M., Rennert, C., Schönefeld, K., Aleithe, S., Boettger, J., Schmidt-Heck, W., Weiss, T.S., Hovhannisyanyan, A., Zellmer, S., Klötting, N., Schulz, A., Kratzsch, J., Guthke, R., Gebhardt, R., 2016. Hedgehog signaling is a potent regulator of liver lipid metabolism and reveals a GLI-code associated with steatosis. *eLife* 5. <https://doi.org/10.7554/eLife.13308>
- Mauch, D.H., Nägler, K., Schumacher, S., Göritz, C., Müller, E.-C., Otto, A., Pfrieder, F.W., 2001. CNS Synaptogenesis Promoted by Glia-Derived Cholesterol. *Science* 294, 1354–1357. <https://doi.org/10.1126/science.294.5545.1354>
- Maun, H.R., Wen, X., Lingel, A., de Sauvage, F.J., Lazarus, R.A., Scales, S.J., Hymowitz, S.G., 2010. Hedgehog pathway antagonist 5E1 binds hedgehog at the pseudo-active site. *J. Biol. Chem.* 285, 26570–26580. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.112284>
- Mayer, C.M., Belsham, D.D., 2009. Insulin directly regulates NPY and AgRP gene expression via the MAPK MEK/ERK signal transduction pathway in mHypoE-46 hypothalamic neurons. *Mol. Cell. Endocrinol.* 307, 99–108. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2009.02.031>
- 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, 318–322. <https://doi.org/10.1126/science.1254960>
- McLellan, J.S., Yao, S., Zheng, X., Geisbrecht, B.V., Ghirlando, R., Beachy, P.A., Leahy, D.J., 2006. Structure of a heparin-dependent complex of Hedgehog and Ihog. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 17208–17213. <https://doi.org/10.1073/pnas.0606738103>
- 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, 979–983. <https://doi.org/10.1038/nature07358>
- McMahon, A.P., Ingham, P.W., Tabin, C.J., 2003. Developmental roles and clinical significance of hedgehog signaling. *Curr. Top. Dev. Biol.* 53, 1–114. [https://doi.org/10.1016/s0070-2153\(03\)53002-2](https://doi.org/10.1016/s0070-2153(03)53002-2)
- McNay, D.E.G., Briançon, N., Kokoeva, M.V., Maratos-Flier, E., Flier, J.S., 2012. Remodeling of the arcuate nucleus energy-balance circuit is inhibited in obese mice. *J. Clin. Invest.* 122, 142–152. <https://doi.org/10.1172/JCI43134>
- Merchant, M., Evangelista, M., Luoh, S.-M., Frantz, G.D., Chalasani, S., Carano, R.A.D., van Hoy, M., Ramirez, J., Ogasawara, A.K., McFarland, L.M., Filvaroff, E.H., French, D.M., de Sauvage, F.J., 2005. Loss of the serine/threonine kinase fused results in postnatal growth defects and lethality due to progressive hydrocephalus. *Mol. Cell. Biol.* 25, 7054–7068. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.16.7054-7068.2005>
- Mergenthaler, P., Lindauer, U., Dienel, G.A., Meisel, A., 2013. Sugar for the brain: the role of glucose in physiological and pathological brain function. *Trends Neurosci.* 36, 587–597. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2013.07.001>
- Merkle, F.T., Fuentealba, L.C., Sanders, T.A., Magno, L., Kessaris, N., Alvarez-Buylla, A., 2014. Adult neural stem cells in distinct microdomains generate previously unknown interneuron types. *Nat. Neurosci.* 17, 207–214. <https://doi.org/10.1038/nn.3610>
- Méthot, N., Basler, K., 1999. Hedgehog controls limb development by regulating the activities of distinct transcriptional activator and repressor forms of Cubitus interruptus. *Cell* 96, 819–831. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80592-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80592-9)
- Milanski, M., Degasperi, G., Coope, A., Morari, J., Denis, R., Cintra, D.E., Tsukumo, D.M.L., Anhe, G., Amaral, M.E., Takahashi, H.K., Curi, R., Oliveira, H.C., Carvalheira, J.B.C., Bordin, S., Saad, M.J., Velloso, L.A., 2009. Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 359–370. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2760-08.2009>
- 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, 739–746. <https://doi.org/10.1038/ncb1880>
- Miller, S.J., 2018. Astrocyte Heterogeneity in the Adult Central Nervous System. *Front. Cell. Neurosci.* 12, 401. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00401>
- Ming, G., Song, H., 2011. Adult Neurogenesis in the Mammalian Brain: Significant Answers and Significant Questions. *Neuron* 70, 687–702. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.05.001>

- Mirzadeh, Z., Kusne, Y., Duran-Moreno, M., Cabrales, E., Gil-Perotin, S., Ortiz, C., Chen, B., Garcia-Verdugo, J.M., Sanai, N., Alvarez-Buylla, A., 2017. Bi- and unciliated ependymal cells define continuous floor-plate-derived tanycytic territories. *Nat. Commun.* 8, 13759. <https://doi.org/10.1038/ncomms13759>
- Mitew, S., Gobijs, I., Fenlon, L.R., McDougall, S.J., Hawkes, D., Xing, Y.L., Bujalka, H., Gundlach, A.L., Richards, L.J., Kilpatrick, T.J., Merson, T.D., Emery, B., 2018. Pharmacogenetic stimulation of neuronal activity increases myelination in an axon-specific manner. *Nat. Commun.* 9, 306. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02719-2>
- Miyamoto, N., Maki, T., Shindo, A., Liang, A.C., Maeda, M., Egawa, N., Itoh, K., Lo, E.K., Lok, J., Ihara, M., Arai, K., 2015. Astrocytes Promote Oligodendrogenesis after White Matter Damage via Brain-Derived Neurotrophic Factor. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 35, 14002–14008. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1592-15.2015>
- Mo, Z., Zecevic, N., 2009. Human fetal radial glia cells generate oligodendrocytes in vitro. *Glia* 57, 490–498. <https://doi.org/10.1002/glia.20775>
- Molofsky, A.V., Krenick, R., Krenick, R., Ullian, E.M., Ullian, E., Tsai, H., Deneen, B., Richardson, W.D., Barres, B.A., Rowitch, D.H., 2012. Astrocytes and disease: a neurodevelopmental perspective. *Genes Dev.* 26, 891–907. <https://doi.org/10.1101/gad.188326.112>
- Monje, M., 2018. Myelin Plasticity and Nervous System Function. *Annu. Rev. Neurosci.* 41, 61–76. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-080317-061853>
- Moraes, J.C., Coope, A., Morari, J., Cintra, D.E., Roman, E.A., Pauli, J.R., Romanatto, T., Carnevali, J.B., Oliveira, A.L.R., Saad, M.J., Velloso, L.A., 2009. High-fat diet induces apoptosis of hypothalamic neurons. *PLoS One* 4, e5045. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005045>
- Morel, L., Chiang, M.S.R., Higashimori, H., Shoneye, T., Iyer, L.K., Yelick, J., Tai, A., Yang, Y., 2017. Molecular and Functional Properties of Regional Astrocytes in the Adult Brain. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 37, 8706–8717. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3956-16.2017>
- Moroni, R.F., Inverardi, F., Regondi, M.C., Pennacchio, P., Frassoni, C., 2015. Developmental expression of Kir4.1 in astrocytes and oligodendrocytes of rat somatosensory cortex and hippocampus. *Int. J. Dev. Neurosci. Off. J. Int. Soc. Dev. Neurosci.* 47, 198–205. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2015.09.004>
- Morrison, B.M., Lee, Y., Rothstein, J.D., 2013. Oligodendroglia: metabolic supporters of axons. *Trends Cell Biol.* 23, 644–651. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2013.07.007>
- Motoyama, J., Heng, H., Crackower, M.A., Takabatake, T., Takeshima, K., Tsui, L.C., Hui, C., 1998a. Overlapping and non-overlapping Ptch2 expression with Shh during mouse embryogenesis. *Mech. Dev.* 78, 81–84. [https://doi.org/10.1016/s0925-4773\(98\)00149-x](https://doi.org/10.1016/s0925-4773(98)00149-x)
- Motoyama, J., Takabatake, T., Takeshima, K., Hui, C., 1998b. Ptch2, a second mouse Patched gene is co-expressed with Sonic hedgehog. *Nat. Genet.* 18, 104–106. <https://doi.org/10.1038/ng0298-104>
- Mountjoy, K.G., 2015. Pro-Opiomelanocortin (POMC) Neurons, POMC-Derived Peptides, Melanocortin Receptors and Obesity: How Understanding of this System has Changed Over the Last Decade. *J. Neuroendocrinol.* 27, 406–418. <https://doi.org/10.1111/jne.12285>
- Muenke, M., Beachy, P.A., 2000. Genetics of ventral forebrain development and holoprosencephaly. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 10, 262–269. [https://doi.org/10.1016/s0959-437x\(00\)00084-8](https://doi.org/10.1016/s0959-437x(00)00084-8)
- 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, 210–223. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.12.026>
- Mullier, A., Bouret, S.G., Prevot, V., Dehouck, B., 2010. Differential distribution of tight junction proteins suggests a role for tanycytes in blood-hypothalamus barrier regulation in the adult mouse brain. *J. Comp. Neurol.* 518, 943–962. <https://doi.org/10.1002/cne.22273>
- Murphy-Royal, C., Dupuis, J., Groc, L., Oliet, S.H.R., 2017. Astroglial glutamate transporters in the brain: Regulating neurotransmitter homeostasis and synaptic transmission. *J. Neurosci. Res.* 95, 2140–2151. <https://doi.org/10.1002/jnr.24029>
- Myers, B.R., Sever, N., Chong, Y.C., Kim, J., Belani, J.D., Rychnovsky, S., Bazan, J.F., Beachy, P.A., 2013. Hedgehog pathway modulation by multiple lipid binding sites on the smoothed effector of signal response. *Dev. Cell* 26, 346–357. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.07.015>

- Myers, M.G., Olson, D.P., 2014. SnapShot: neural pathways that control feeding. *Cell Metab.* 19, 732–732.e1. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.03.015>
- Myers, M.G., Olson, D.P., 2012. Central nervous system control of metabolism. *Nature* 491, 357–363. <https://doi.org/10.1038/nature11705>
- Nachtergaele, S., Mydock, L.K., Krishnan, K., Rammohan, J., Schlesinger, P.H., Covey, D.F., Rohatgi, R., 2012. Oxysterols are allosteric activators of the oncoprotein Smoothed. *Nat. Chem. Biol.* 8, 211–220. <https://doi.org/10.1038/nchembio.765>
- 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. <https://doi.org/10.7554/eLife.01340>
- Naef, L., Moquin, L., Dal Bo, G., Giros, B., Gratton, A., Walker, C.-D., 2011. Maternal high-fat intake alters presynaptic regulation of dopamine in the nucleus accumbens and increases motivation for fat rewards in the offspring. *Neuroscience* 176, 225–236. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.12.037>
- 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, 4357–4366. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.1999.00873.x>
- Najm, F.J., Madhavan, M., Zaremba, A., Shick, E., Karl, R.T., Factor, D.C., Miller, T.E., Nevin, Z.S., Kantor, C., Sargent, A., Quick, K.L., Schlatzer, D.M., Tang, H., Papoian, R., Brimacombe, K.R., Shen, M., Boxer, M.B., Jadhav, A., Robinson, A.P., Podojil, J.R., Miller, S.D., Miller, R.H., Tesar, P.J., 2015. Drug-based modulation of endogenous stem cells promotes functional remyelination in vivo. *Nature* 522, 216–220. <https://doi.org/10.1038/nature14335>
- Nave, K.-A., 2010. Myelination and the trophic support of long axons. *Nat. Rev. Neurosci.* 11, 275–283. <https://doi.org/10.1038/nrn2797>
- Nawaz, S., Sánchez, P., Schmitt, S., Snaidero, N., Mitkovski, M., Velte, C., Brückner, B.R., Alexopoulos, I., Czopka, T., Jung, S.Y., Rhee, J.S., Janshoff, A., Witke, W., Schaap, I.A.T., 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, 139–151. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.05.013>
- Nazarenko, I., Hedrén, A., Sjödin, H., Orrego, A., Andrae, J., Afink, G.B., Nistér, M., Lindström, M.S., 2011. Brain abnormalities and glioma-like lesions in mice overexpressing the long isoform of PDGF-A in astrocytic cells. *PloS One* 6, e18303. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018303>
- Nemazannikova, N., Mikkelsen, K., Stojanovska, L., Blatch, G.L., Apostolopoulos, V., 2018. Is there a Link between Vitamin B and Multiple Sclerosis? *Med. Chem. Shariqah United Arab Emir.* 14, 170–180. <https://doi.org/10.2174/1573406413666170906123857>
- Ng, J.M.Y., Curran, T., 2011. The Hedgehog's tale: developing strategies for targeting cancer. *Nat. Rev. Cancer* 11, 493–501. <https://doi.org/10.1038/nrc3079>
- Nieh, E.H., Matthews, G.A., Allsop, S.A., Presbrey, K.N., Leppla, C.A., Wichmann, R., Neve, R., Wildes, C.P., Tye, K.M., 2015. Decoding neural circuits that control compulsive sucrose seeking. *Cell* 160, 528–541. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.003>
- Nieuwenhuis, E., Motoyama, J., Barnfield, P.C., Yoshikawa, Y., Zhang, X., Mo, R., Crackower, M.A., Hui, C.-C., 2006. Mice with a targeted mutation of patched2 are viable but develop alopecia and epidermal hyperplasia. *Mol. Cell Biol.* 26, 6609–6622. <https://doi.org/10.1128/MCB.00295-06>
- Niewiadomski, P., Kong, J.H., Ahrends, R., Ma, Y., Humke, E.W., Khan, S., Teruel, M.N., Novitch, B.G., Rohatgi, R., 2014. Gli protein activity is controlled by multisite phosphorylation in vertebrate Hedgehog signaling. *Cell Rep.* 6, 168–181. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.12.003>
- Nitta, T., Hata, M., Gotoh, S., Seo, Y., Sasaki, H., Hashimoto, N., Furuse, M., Tsukita, S., 2003. Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *J. Cell Biol.* 161, 653–660. <https://doi.org/10.1083/jcb.200302070>
- Nüsslein-Volhard, C., Wieschaus, E., 1980. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 287, 795–801. <https://doi.org/10.1038/287795a0>

- Obernier, K., Alvarez-Buylla, A., 2019. Neural stem cells: origin, heterogeneity and regulation in the adult mammalian brain. *Dev. Camb. Engl.* 146. <https://doi.org/10.1242/dev.156059>
- Obernier, K., Cebrian-Silla, A., Thomson, M., Parraguez, J.I., Anderson, R., Guinto, C., Rodas Rodriguez, J., Garcia-Verdugo, J.-M., Alvarez-Buylla, A., 2018. Adult Neurogenesis Is Sustained by Symmetric Self-Renewal and Differentiation. *Cell Stem Cell* 22, 221-234.e8. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.01.003>
- Ogden, S.K., Fei, D.L., Schilling, N.S., Ahmed, Y.F., Hwa, J., Robbins, D.J., 2008. G protein Galphai functions immediately downstream of Smoothed in Hedgehog signalling. *Nature* 456, 967–970. <https://doi.org/10.1038/nature07459>
- Ohno, Y., Tokudome, K., Kunisawa, N., Iha, H.A., Kinboshi, M., Mukai, T., Serikawa, T., Shimizu, S., 2014. Role of astroglial Kir4.1 channels in the pathogenesis and treatment of epilepsy. *Ther. Targets Neurol. Dis.* <https://doi.org/10.14800/ttnd.476>
- 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, 369–373. <https://doi.org/10.1038/nature05246>
- Okuda, H., Tatsumi, K., Morita-Takemura, S., Nakahara, K., Nochioka, K., Shinjo, T., Terada, Y., Wanaka, A., 2016. Hedgehog Signaling Modulates the Release of Gliotransmitters from Cultured Cerebellar Astrocytes. *Neurochem. Res.* 41, 278–289. <https://doi.org/10.1007/s11064-015-1791-y>
- Ollmann, M.M., Wilson, B.D., Yang, Y.K., Kerns, J.A., Chen, Y., Gantz, I., Barsh, G.S., 1997. Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein. *Science* 278, 135–138. <https://doi.org/10.1126/science.278.5335.135>
- Olofsson, L.E., Unger, E.K., Cheung, C.C., Xu, A.W., 2013. Modulation of AgRP-neuronal function by SOCS3 as an initiating event in diet-induced hypothalamic leptin resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, E697-706. <https://doi.org/10.1073/pnas.1218284110>
- Orre, M., Kamphuis, W., Osborn, L.M., Jansen, A.H.P., Kooijman, L., Bossers, K., Hol, E.M., 2014. Isolation of glia from Alzheimer's mice reveals inflammation and dysfunction. *Neurobiol. Aging* 35, 2746–2760. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.06.004>
- Ortega, J.A., Radonjić, N.V., Zecevic, N., 2013. Sonic hedgehog promotes generation and maintenance of human forebrain Olig2 progenitors. *Front. Cell. Neurosci.* 7, 254. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00254>
- Ortmann, C., Pickhinke, U., Exner, S., Ohlig, S., Lawrence, R., Jboor, H., Dreier, R., Grobe, K., 2015. Sonic hedgehog processing and release are regulated by glypican heparan sulfate proteoglycans. *J. Cell Sci.* 128, 2374–2385. <https://doi.org/10.1242/jcs.170670>
- Pal, K., Hwang, S.-H., Somatilaka, B., Badgandi, H., Jackson, P.K., DeFea, K., Mukhopadhyay, S., 2016. Smoothed determines  $\beta$ -arrestin-mediated removal of the G protein-coupled receptor Gpr161 from the primary cilium. *J. Cell Biol.* 212, 861–875. <https://doi.org/10.1083/jcb.201506132>
- 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001505>
- Palma, V., Lim, D.A., Dahmane, N., Sánchez, 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. *Dev. Camb. Engl.* 132, 335–344. <https://doi.org/10.1242/dev.01567>
- Palma, V., Ruiz i Altaba, A., 2004. Hedgehog-Gli signaling regulates the behavior of cells with stem cell properties in the developing neocortex. *Dev. Camb. Engl.* 131, 337–345. <https://doi.org/10.1242/dev.00930>
- Palmer, T.D., Willhoite, A.R., Gage, F.H., 2000. Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *J. Comp. Neurol.* 425, 479–494. [https://doi.org/10.1002/1096-9861\(20001002\)425:4<479::aid-cne2>3.0.co;2-3](https://doi.org/10.1002/1096-9861(20001002)425:4<479::aid-cne2>3.0.co;2-3)
- Pan, S., Wu, X., Jiang, J., Gao, W., Wan, Y., Cheng, D., Han, D., Liu, J., Englund, N.P., Wang, Y., Peukert, S., Miller-Moslin, K., Yuan, J., Guo, R., Matsumoto, M., Vattay, A., Jiang, Y., Tsao, J., Sun, F., Pferdekammer, A.C., Dodd, S., Tuntland, T., Maniara, W., Kelleher, J.F., Yao, Y.-M., Warmuth, M., Williams, J.,

- Dorsch, M., 2010. Discovery of NVP-LDE225, a Potent and Selective Smoothed Antagonist. *ACS Med. Chem. Lett.* 1, 130–134. <https://doi.org/10.1021/ml1000307>
- Pan, Y., Wang, B., 2007. A novel protein-processing domain in Gli2 and Gli3 differentially blocks complete protein degradation by the proteasome. *J. Biol. Chem.* 282, 10846–10852. <https://doi.org/10.1074/jbc.M608599200>
- Panáková, D., Sprong, H., Marois, E., Thiele, C., Eaton, S., 2005. Lipoprotein particles are required for Hedgehog and Wntless signalling. *Nature* 435, 58–65. <https://doi.org/10.1038/nature03504>
- 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, 4700–4717. <https://doi.org/10.1091/mbc.E15-09-0671>
- 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, 389–396. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04223.x>
- Pastrana, E., Cheng, L.-C., Doetsch, F., 2009. Simultaneous prospective purification of adult subventricular zone neural stem cells and their progeny. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 6387–6392. <https://doi.org/10.1073/pnas.0810407106>
- Pellerin, L., Magistretti, P.J., 2012. Sweet sixteen for ANLS. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 32, 1152–1166. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2011.149>
- Pepinsky, R.B., Zeng, C., Wen, D., Rayhorn, P., Baker, D.P., Williams, K.P., Bixler, S.A., Ambrose, C.M., Garber, E.A., Miatkowski, K., Taylor, F.R., Wang, E.A., Galdes, A., 1998. Identification of a palmitic acid-modified form of human Sonic hedgehog. *J. Biol. Chem.* 273, 14037–14045. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.22.14037>
- Petrova, E., Rios-Esteves, J., Ouerfelli, O., Glickman, J.F., Resh, M.D., 2013. Inhibitors of Hedgehog acyltransferase block Sonic Hedgehog signaling. *Nat. Chem. Biol.* 9, 247–249. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1184>
- Petrova, R., Garcia, A.D.R., Joyner, A.L., 2013. Titration of GLI3 repressor activity by sonic hedgehog signaling is critical for maintaining multiple adult neural stem cell and astrocyte functions. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 33, 17490–17505. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2042-13.2013>
- Peukert, S., Miller-Moslin, K., 2010. Small-molecule inhibitors of the hedgehog signaling pathway as cancer therapeutics. *ChemMedChem* 5, 500–512. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201000011>
- Pfeffer, S.R., 2019. NPC intracellular cholesterol transporter 1 (NPC1)-mediated cholesterol export from lysosomes. *J. Biol. Chem.* 294, 1706–1709. <https://doi.org/10.1074/jbc.TM118.004165>
- Pietrobono, S., Gagliardi, S., Stecca, B., 2019. Non-canonical Hedgehog Signaling Pathway in Cancer: Activation of GLI Transcription Factors Beyond Smoothed. *Front. Genet.* 10. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00556>
- Pimentel, G.D., Lira, F.S., Rosa, J.C., Oliveira, J.L., Losinskas-Hachul, A.C., Souza, G.I.H., das Graças T do Carmo, M., Santos, R.V.T., de Mello, M.T., Tufik, S., Seelaender, M., Oyama, L.M., Oller do Nascimento, C.M., Watanabe, R.H., Ribeiro, E.B., Pisani, L.P., 2012. Intake of trans fatty acids during gestation and lactation leads to hypothalamic inflammation via TLR4/NFκBp65 signaling in adult offspring. *J. Nutr. Biochem.* 23, 265–271. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2010.12.003>
- Pitcher, J.A., Freedman, N.J., Lefkowitz, R.J., 1998. G protein-coupled receptor kinases. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 653–692. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.67.1.653>
- Placzek, M., Briscoe, J., 2018. Sonic hedgehog in vertebrate neural tube development. *Int. J. Dev. Biol.* 62, 225–234. <https://doi.org/10.1387/ijdb.170293jb>
- Polizio, A.H., Chinchilla, P., Chen, X., Kim, S., Manning, D.R., Riobo, N.A., 2011. Heterotrimeric Gi proteins link Hedgehog signaling to activation of Rho small GTPases to promote fibroblast migration. *J. Biol. Chem.* 286, 19589–19596. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.197111>
- Ponti, G., Obernier, K., Guinto, C., Jose, L., Bonfanti, L., Alvarez-Buylla, A., 2013. Cell cycle and lineage progression of neural progenitors in the ventricular-subventricular zones of adult mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, E1045–E1054. <https://doi.org/10.1073/pnas.1219563110>

- 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., 1996a. Hedgehog patterning activity: role of a lipophilic modification mediated by the carboxy-terminal autoprocessing domain. *Cell* 86, 21–34. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80074-4](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80074-4)
- Porter, J.A., von Kessler, D.P., Ekker, S.C., Young, K.E., Lee, J.J., Moses, K., Beachy, P.A., 1995. The product of hedgehog autoproteolytic cleavage active in local and long-range signalling. *Nature* 374, 363–366. <https://doi.org/10.1038/374363a0>
- Porter, J.A., Young, K.E., Beachy, P.A., 1996b. Cholesterol modification of hedgehog signaling proteins in animal development. *Science* 274, 255–259. <https://doi.org/10.1126/science.274.5285.255>
- Prada, P.O., Zecchin, H.G., Gasparetti, A.L., Torsoni, M.A., Ueno, M., Hirata, A.E., Corezola do Amaral, M.E., Höer, N.F., Boschero, A.C., Saad, M.J.A., 2005. Western diet modulates insulin signaling, c-Jun N-terminal kinase activity, and insulin receptor substrate-1ser307 phosphorylation in a tissue-specific fashion. *Endocrinology* 146, 1576–1587. <https://doi.org/10.1210/en.2004-0767>
- Prevot, V., Dehouck, B., Sharif, A., Ciofi, P., Giacobini, P., Clasadonte, J., 2018. The Versatile Tanycyte: A Hypothalamic Integrator of Reproduction and Energy Metabolism. *Endocr. Rev.* 39, 333–368. <https://doi.org/10.1210/er.2017-00235>
- Pringle, N.P., Mudhar, H.S., Collarini, E.J., Richardson, W.D., 1992. PDGF receptors in the rat CNS: during late neurogenesis, PDGF alpha-receptor expression appears to be restricted to glial cells of the oligodendrocyte lineage. *Dev. Camb. Engl.* 115, 535–551.
- Qi, C., Di Minin, G., Vercellino, I., Wutz, A., Korkhov, V.M., 2019. Structural basis of sterol recognition by human hedgehog receptor PTCH1. *Sci. Adv.* 5, eaaw6490. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaw6490>
- Qi, X., Liu, H., Thompson, B., McDonald, J., Zhang, C., Li, X., 2019. Cryo-EM structure of oxysterol-bound human Smoothed coupled to a heterotrimeric Gi. *Nature* 571, 279–283. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1286-0>
- Qi, X., Schmiede, P., Coutavas, E., Li, X., 2018a. Two Patched molecules engage distinct sites on Hedgehog yielding a signaling-competent complex. *Science* 362. <https://doi.org/10.1126/science.aas8843>
- Qi, X., Schmiede, P., Coutavas, E., Wang, J., Li, X., 2018b. Structures of human Patched and its complex with native palmitoylated sonic hedgehog. *Nature* 560, 128–132. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0308-7>
- 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, 440–450. [https://doi.org/10.1016/s1044-7431\(03\)00067-8](https://doi.org/10.1016/s1044-7431(03)00067-8)
- Qian, H., Cao, P., Hu, M., Gao, S., Yan, N., Gong, X., 2019. Inhibition of tetrameric Patched1 by Sonic Hedgehog through an asymmetric paradigm. *Nat. Commun.* 10, 2320. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10234-9>
- Qin, Y., Zhang, W., Yang, P., 2015. Current states of endogenous stem cells in adult spinal cord. *J. Neurosci. Res.* 93, 391–398. <https://doi.org/10.1002/jnr.23480>
- Qiu, J., Zhang, C., Borgquist, A., Nestor, C.C., Smith, A.W., Bosch, M.A., Ku, S., Wagner, E.J., Rønnekleiv, O.K., Kelly, M.J., 2014. Insulin excites anorexigenic proopiomelanocortin neurons via activation of canonical transient receptor potential channels. *Cell Metab.* 19, 682–693. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.03.004>
- Queiroz, K.C.S., Tio, R.A., Zeebregts, C.J., Bijlsma, M.F., Zijlstra, F., Badlou, B., de Vries, M., Ferreira, C.V., Spek, C.A., Peppelenbosch, M.P., Rezaee, F., 2010. Human plasma very low density lipoprotein carries Indian hedgehog. *J. Proteome Res.* 9, 6052–6059. <https://doi.org/10.1021/pr100403q>
- Raasakka, A., Ruskamo, S., Kowal, J., Barker, R., Baumann, A., Martel, A., Tuusa, J., Myllykoski, M., Bürck, J., Ulrich, A.S., Stahlberg, H., Kursula, P., 2017. Membrane Association Landscape of Myelin Basic Protein Portrays Formation of the Myelin Major Dense Line. *Sci. Rep.* 7, 4974. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05364-3>
- Raleigh, D.R., Sever, N., Choksi, P.K., Sigg, M.A., Hines, K.M., Thompson, B.M., Elnatan, D., Jaishankar, P., Bisignano, P., Garcia-Gonzalo, F.R., Krup, A.L., Eberl, M., Byrne, E.F.X., Siebold, C., Wong, S.Y., Renslo, A.R., Grabe, M., McDonald, J.G., Xu, L., Beachy, P.A., Reiter, J.F., 2018. Cilia-Associated Oxysterols Activate Smoothed. *Mol. Cell* 72, 316–327.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.08.034>

- Ramírez-Weber, F.A., Kornberg, T.B., 1999. Cytonemes: cellular processes that project to the principal signaling center in *Drosophila* imaginal discs. *Cell* 97, 599–607. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80771-0](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80771-0)
- Rana, R., Carroll, C.E., Lee, H.-J., Bao, J., Marada, S., Grace, C.R.R., Guibao, C.D., Ogden, S.K., Zheng, J.J., 2013. Structural insights into the role of the Smoothed cysteine-rich domain in Hedgehog signaling. *Nat. Commun.* 4, 2965. <https://doi.org/10.1038/ncomms3965>
- Rash, J.E., 2010. Molecular disruptions of the pial syncytium block potassium siphoning and axonal saltatory conduction: pertinence to neuromyelitis optica and other demyelinating diseases of the central nervous system. *Neuroscience* 168, 982–1008. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.10.028>
- Razumilava, N., Gradilone, S.A., Smoot, R.L., Mertens, J.C., Bronk, S.F., Sirica, A.E., Gores, G.J., 2014. Non-canonical Hedgehog signaling contributes to chemotaxis in cholangiocarcinoma. *J. Hepatol.* 60, 599–605. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2013.11.005>
- Reich, D.S., Lucchinetti, C.F., Calabresi, P.A., 2018. Multiple Sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 378, 169–180. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1401483>
- Reichenbach, A., Bringmann, A., 2013. New functions of Müller cells. *Glia* 61, 651–678. <https://doi.org/10.1002/glia.22477>
- Reifenberger, J., Wolter, M., Knobbe, C.B., Köhler, B., Schönicke, A., Scharwächter, C., Kumar, K., Blaschke, B., Ruzicka, T., Reifenberger, G., 2005. Somatic mutations in the PTCH, SMOH, SUFUH and TP53 genes in sporadic basal cell carcinomas. *Br. J. Dermatol.* 152, 43–51. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2005.06353.x>
- Reiner, D.J., Mietlicki-Baase, E.G., McGrath, L.E., Zimmer, D.J., Bence, K.K., Sousa, G.L., Konanur, V.R., Krawczyk, J., Burk, D.H., Kanoski, S.E., Hermann, G.E., Rogers, R.C., Hayes, M.R., 2016. Astrocytes Regulate GLP-1 Receptor-Mediated Effects on Energy Balance. *J. Neurosci.* 36, 3531–3540. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3579-15.2016>
- Ren, H., Yan, S., Zhang, B., Lu, T.Y., Arancio, O., Accili, D., 2014. Glut4 expression defines an insulin-sensitive hypothalamic neuronal population. *Mol. Metab.* 3, 452–459. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2014.04.006>
- Resh, M.D., 2016. Fatty Acylation of Proteins: The Long and the Short of it. *Prog. Lipid Res.* 63, 120–131. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2016.05.002>
- Rezai-Zadeh, K., Yu, S., Jiang, Y., Laque, A., Schwartzburg, C., Morrison, C.D., Derbenev, A.V., Zsombok, A., Münzberg, H., 2014. Leptin receptor neurons in the dorsomedial hypothalamus are key regulators of energy expenditure and body weight, but not food intake. *Mol. Metab.* 3, 681–693. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2014.07.008>
- Richert, S., Kleinecke, S., Günther, J., Schaumburg, F., Edgar, J., Nienhaus, G.U., Nave, K.-A., Kassmann, C.M., 2014. In vivo labeling of peroxisomes by photoconvertible mEos2 in myelinating glia of mice. *Biochimie* 98, 127–134. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2013.10.022>
- Riddle, R.D., Johnson, R.L., Laufer, E., Tabin, C., 1993. Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell* 75, 1401–1416. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90626-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90626-2)
- Riobo, N.A., Manning, D.R., 2007. Pathways of signal transduction employed by vertebrate Hedgehogs. *Biochem. J.* 403, 369–379. <https://doi.org/10.1042/BJ20061723>
- Riobo, N.A., Saucy, B., Dilizio, C., Manning, D.R., 2006. Activation of heterotrimeric G proteins by Smoothed. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 12607–12612. <https://doi.org/10.1073/pnas.0600880103>
- Robin, L.M., Oliveira da Cruz, J.F., Langlais, V.C., Martin-Fernandez, M., Metna-Laurent, M., Busquets-Garcia, A., Bellocchio, L., Soria-Gomez, E., Papouin, T., Varilh, M., Sherwood, M.W., Belluomo, I., Balcells, G., Matias, I., Bosier, B., Drago, F., Van Eeckhaut, A., Smolders, I., Georges, F., Araque, A., Panatier, A., Olié, S.H.R., Marsicano, G., 2018. Astroglial CB1 Receptors Determine Synaptic D-Serine Availability to Enable Recognition Memory. *Neuron* 98, 935–944.e5. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.04.034>
- Robins, S.C., Stewart, I., McNay, D.E., Taylor, V., Giachino, C., Goetz, M., Ninkovic, J., Briancon, N., Maratos-Flier, E., Flier, J.S., Kokoeva, M.V., Placzek, M., 2013.  $\alpha$ -TANCYTES of the adult hypothalamic third

- ventricle include distinct populations of FGF-responsive neural progenitors. *Nat. Commun.* 4, 2049. <https://doi.org/10.1038/ncomms3049>
- Rodríguez, E.M., Blázquez, J.L., Guerra, M., 2010. The design of barriers in the hypothalamus allows the median eminence and the arcuate nucleus to enjoy private milieus: the former opens to the portal blood and the latter to the cerebrospinal fluid. *Peptides* 31, 757–776. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2010.01.003>
- Roelink, H., Augsburger, A., Heemskerk, J., Korzh, V., Norlin, S., Ruiz i Altaba, A., Tanabe, Y., Placzek, M., Edlund, T., Jessell, T.M., 1994. Floor plate and motor neuron induction by vhh-1, a vertebrate homolog of hedgehog expressed by the notochord. *Cell* 76, 761–775. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90514-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90514-2)
- Roessler, E., Belloni, E., Gaudenz, K., Vargas, F., Scherer, S.W., Tsui, L.C., Muenke, M., 1997. Mutations in the C-terminal domain of Sonic Hedgehog cause holoprosencephaly. *Hum. Mol. Genet.* 6, 1847–1853. <https://doi.org/10.1093/hmg/6.11.1847>
- Roh, E., Song, D.K., Kim, M.-S., 2016. Emerging role of the brain in the homeostatic regulation of energy and glucose metabolism. *Exp. Mol. Med.* 48, e216. <https://doi.org/10.1038/emm.2016.4>
- Rohatgi, R., Milenkovic, L., Corcoran, R.B., Scott, M.P., 2009. Hedgehog signal transduction by Smoothened: pharmacologic evidence for a 2-step activation process. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 3196–3201. <https://doi.org/10.1073/pnas.0813373106>
- Rohatgi, R., Milenkovic, L., Scott, M.P., 2007. Patched1 regulates hedgehog signaling at the primary cilium. *Science* 317, 372–376. <https://doi.org/10.1126/science.1139740>
- Rojas-Ríos, P., Guerrero, I., González-Reyes, A., 2012. Cytoneme-mediated delivery of hedgehog regulates the expression of bone morphogenetic proteins to maintain germline stem cells in *Drosophila*. *PLoS Biol.* 10, e1001298. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001298>
- Roper, R.J., Baxter, L.L., Saran, N.G., Klinedinst, D.K., Beachy, P.A., Reeves, R.H., 2006. Defective cerebellar response to mitogenic Hedgehog signaling in Down [corrected] syndrome mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 1452–1456. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510750103>
- Rosenbaum, J.L., Witman, G.B., 2002. Intraflagellar transport. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 813–825. <https://doi.org/10.1038/nrm952>
- 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, 14662–14667. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805640105>
- Rouach, N., Koulakoff, A., Abudara, V., Willecke, K., Giaume, C., 2008. Astroglial metabolic networks sustain hippocampal synaptic transmission. *Science* 322, 1551–1555. <https://doi.org/10.1126/science.1164022>
- Roudaut, H., Traiffort, E., Gorojankina, T., Vincent, L., Faure, H., Schoenfelder, A., Mann, A., Manetti, F., Solinas, A., Taddei, M., Ruat, M., 2011. Identification and mechanism of action of the acylguanidine MRT-83, a novel potent Smoothened antagonist. *Mol. Pharmacol.* 79, 453–460. <https://doi.org/10.1124/mol.110.069708>
- Ruat, M., Faure, H., Daynac, M., 2015. Smoothened, Stem Cell Maintenance and Brain Diseases, in: Ruat, M. (Ed.), *The Smoothened Receptor in Cancer and Regenerative Medicine*, Topics in Medicinal Chemistry. Springer International Publishing, Cham, pp. 147–171. [https://doi.org/10.1007/7355\\_2014\\_83](https://doi.org/10.1007/7355_2014_83)
- Ruat, M., Hoch, L., Faure, H., Rognan, D., 2014. Targeting of Smoothened for therapeutic gain. *Trends Pharmacol. Sci.* 35, 237–246. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2014.03.002>
- Rubin, J.B., Choi, Y., Segal, R.A., 2002. Cerebellar proteoglycans regulate sonic hedgehog responses during development. *Dev. Camb. Engl.* 129, 2223–2232.
- Rudin, C.M., Hann, C.L., Lattera, J., Yauch, R.L., Callahan, C.A., Fu, L., Holcomb, T., Stinson, J., Gould, S.E., Coleman, B., LoRusso, P.M., Von Hoff, D.D., de Sauvage, F.J., Low, J.A., 2009. Treatment of medulloblastoma with hedgehog pathway inhibitor GDC-0449. *N. Engl. J. Med.* 361, 1173–1178. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0902903>
- Ruiz i Altaba, A., Mas, C., Stecca, B., 2007. The Gli code: an information nexus regulating cell fate, stemness and cancer. *Trends Cell Biol.* 17, 438–447. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2007.06.007>

- Russell, C.D., Ricci, M.R., Brolin, R.E., Magill, E., Fried, S.K., 2001. Regulation of the leptin content of obese human adipose tissue. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 280, E399-404. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.2001.280.3.E399>
- Saab, A.S., Neumeyer, A., Jahn, H.M., Cupido, A., Šimek, A.A.M., Boele, H.-J., Scheller, A., Le Meur, K., Götz, M., Monyer, H., Sprengel, R., Rubio, M.E., Deitmer, J.W., De Zeeuw, C.I., Kirchhoff, F., 2012. Bergmann glial AMPA receptors are required for fine motor coordination. *Science* 337, 749–753. <https://doi.org/10.1126/science.1221140>
- Saab, A.S., Tzvetavona, I.D., Trevisiol, A., Baltan, S., Dibaj, P., Kusch, K., Möbius, W., Goetze, B., Jahn, H.M., Huang, W., Steffens, H., Schomburg, E.D., Pérez-Samartín, A., Pérez-Cerdá, F., Bakhtiari, D., Matute, C., Löwel, S., Griesinger, C., Hirrlinger, J., Kirchhoff, F., Nave, K.-A., 2016. Oligodendroglial NMDA Receptors Regulate Glucose Import and Axonal Energy Metabolism. *Neuron* 91, 119–132. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.05.016>
- Sakers, K., Lake, A.M., Khazanchi, R., Ouwenga, R., Vasek, M.J., Dani, A., Dougherty, J.D., 2017. Astrocytes locally translate transcripts in their peripheral processes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, E3830–E3838. <https://doi.org/10.1073/pnas.1617782114>
- Salaritabar, A., Berindan-Neagoe, I., Darvish, B., Hadjiakhoondi, F., Manayi, A., Devi, K.P., Barreca, D., Orhan, I.E., Süntar, I., Farooqi, A.A., Gulei, D., Nabavi, S.F., Sureda, A., Daglia, M., Dehpour, A.R., Nabavi, S.M., Shirooie, S., 2019. Targeting Hedgehog signaling pathway: Paving the road for cancer therapy. *Pharmacol. Res.* 141, 466–480. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.01.014>
- 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, 448–452. <https://doi.org/10.1038/nature14957>
- Sampaio-Baptista, C., Khrapitchev, A.A., Foxley, S., Schlagheck, T., Scholz, J., Jbabdi, S., DeLuca, G.C., Miller, K.L., Taylor, A., Thomas, N., Kleim, J., Sibson, N.R., Bannerman, D., Johansen-Berg, H., 2013. Motor skill learning induces changes in white matter microstructure and myelination. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 33, 19499–19503. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3048-13.2013>
- Samuel, V.T., Shulman, G.I., 2012. Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links. *Cell* 148, 852–871. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.017>
- Sanchez, M.A., Armstrong, R.C., 2018. Postnatal Sonic hedgehog (Shh) responsive cells give rise to oligodendrocyte lineage cells during myelination and in adulthood contribute to remyelination. *Exp. Neurol.* 299, 122–136. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2017.10.010>
- Sanchez, M.A., Sullivan, G.M., Armstrong, R.C., 2018. Genetic detection of Sonic hedgehog (Shh) expression and cellular response in the progression of acute through chronic demyelination and remyelination. *Neurobiol. Dis.* 115, 145–156. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2018.04.003>
- Sánchez-Arrones, L., Nieto-Lopez, F., Sánchez-Camacho, C., Carreres, M.I., Herrera, E., Okada, A., Bovolenta, P., 2013. Shh/Boc signaling is required for sustained generation of ipsilateral projecting ganglion cells in the mouse retina. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 33, 8596–8607. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2083-12.2013>
- Sanders, T.A., Llagostera, E., Barna, M., 2013. Specialized filopodia direct long-range transport of SHH during vertebrate tissue patterning. *Nature* 497, 628–632. <https://doi.org/10.1038/nature12157>
- Saper, C.B., Lowell, B.B., 2014. The hypothalamus. *Curr. Biol.* CB 24, R1111-1116. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.10.023>
- Sasai, N., Toriyama, M., Kondo, T., 2019. Hedgehog Signal and Genetic Disorders. *Front. Genet.* 10, 1103. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.01103>
- Satir, P., Christensen, S.T., 2007. Overview of structure and function of mammalian cilia. *Annu. Rev. Physiol.* 69, 377–400. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.69.040705.141236>
- Savtchouk, I., Volterra, A., 2018. Gliotransmission: Beyond Black-and-White. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 38, 14–25. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0017-17.2017>
- Saxena, A., Bauer, J., Scheikl, T., Zappulla, J., Audebert, M., Desbois, S., Waisman, A., Lassmann, H., Liblau, R.S., Mars, L.T., 2008. Cutting edge: Multiple sclerosis-like lesions induced by effector CD8 T cells recognizing a sequestered antigen on oligodendrocytes. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 181, 1617–1621. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.3.1617>

- Scales, S.J., de Sauvage, F.J., 2009. Mechanisms of Hedgehog pathway activation in cancer and implications for therapy. *Trends Pharmacol. Sci.* 30, 303–312. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2009.03.007>
- Schaeffer, M., Langlet, F., Lafont, C., Molino, F., Hodson, D.J., Roux, T., Lamarque, L., Verdié, P., Bourrier, E., Dehouck, B., Banères, J.-L., Martinez, J., Méry, P.-F., Marie, J., Trinquet, E., Fehrentz, J.-A., Prévot, V., Mollard, P., 2013. Rapid sensing of circulating ghrelin by hypothalamic appetite-modifying neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 1512–1517. <https://doi.org/10.1073/pnas.1212137110>
- Schafer, D.P., Lehrman, E.K., Kautzman, A.G., Koyama, R., Mardinly, A.R., Yamasaki, R., Ransohoff, R.M., Greenberg, M.E., Barres, B.A., Stevens, B., 2012. Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. *Neuron* 74, 691–705. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.03.026>
- Schneider, S., Gruart, A., Grade, S., Zhang, Y., Kröger, S., Kirchhoff, F., Eichele, G., Delgado García, J.M., Dimou, L., 2016. Decrease in newly generated oligodendrocytes leads to motor dysfunctions and changed myelin structures that can be rescued by transplanted cells. *Glia* 64, 2201–2218. <https://doi.org/10.1002/glia.23055>
- Schock, E.N., Chang, C.-F., Youngworth, I.A., Davey, M.G., Delany, M.E., Brugmann, S.A., 2016. Utilizing the chicken as an animal model for human craniofacial ciliopathies. *Dev. Biol.* 415, 326–337. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2015.10.024>
- 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, 72–77. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2005.12.004>
- Schwarz, Y., Zhao, N., Kirchhoff, F., Bruns, D., 2017. Astrocytes control synaptic strength by two distinct v-SNARE-dependent release pathways. *Nat. Neurosci.* 20, 1529–1539. <https://doi.org/10.1038/nn.4647>
- Seidl, A.H., 2014. Regulation of conduction time along axons. *Neuroscience* 276, 126–134. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.06.047>
- Sekulic, A., Migden, M.R., Oro, A.E., Dirix, L., Lewis, K.D., Hainsworth, J.D., Solomon, J.A., Yoo, S., Arron, S.T., Friedlander, P.A., Marmor, E., Rudin, C.M., Chang, A.L.S., Low, J.A., Mackey, H.M., Yauch, R.L., Graham, R.A., Reddy, J.C., Hauschild, A., 2012. Efficacy and safety of vismodegib in advanced basal-cell carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 366, 2171–2179. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1113713>
- Seri, B., García-Verdugo, J.M., Collado-Morente, L., McEwen, B.S., Alvarez-Buylla, A., 2004. Cell types, lineage, and architecture of the germinal zone in the adult dentate gyrus. *J. Comp. Neurol.* 478, 359–378. <https://doi.org/10.1002/cne.20288>
- Shadel, G.S., Horvath, T.L., 2015. Mitochondrial ROS signaling in organismal homeostasis. *Cell* 163, 560–569. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.10.001>
- Shahriyari, L., Komarova, N.L., 2013. Symmetric vs. asymmetric stem cell divisions: an adaptation against cancer? *PloS One* 8, e76195. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076195>
- Sharpe, H.J., Pau, G., Dijkgraaf, G.J., Basset-Seguín, N., Modrusan, Z., Januario, T., Tsui, V., Durham, A.B., Dlugosz, A.A., Haverty, P.M., Bourgon, R., Tang, J.Y., Sarin, K.Y., Dirix, L., Fisher, D.C., Rudin, C.M., Sofen, H., Migden, M.R., Yauch, R.L., de Sauvage, F.J., 2015. Genomic analysis of smoothed inhibitor resistance in basal cell carcinoma. *Cancer Cell* 27, 327–341. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.02.001>
- Shen, F., Cheng, L., Douglas, A.E., Riobo, N.A., Manning, D.R., 2013. Smoothed is a fully competent activator of the heterotrimeric G protein G(i). *Mol. Pharmacol.* 83, 691–697. <https://doi.org/10.1124/mol.112.082511>
- Sheng, T., Li, C., Zhang, X., Chi, S., He, N., Chen, K., McCormick, F., Gatalica, Z., Xie, J., 2004. Activation of the hedgehog pathway in advanced prostate cancer. *Mol. Cancer* 3, 29. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-3-29>
- Sheng, Z., Santiago, A.M., Thomas, M.P., Routh, V.H., 2014. Metabolic regulation of lateral hypothalamic glucose-inhibited orexin neurons may influence midbrain reward neurocircuitry. *Mol. Cell. Neurosci.* 62, 30–41. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2014.08.001>
- Sherman, D.L., Brophy, P.J., 2005. Mechanisms of axon ensheathment and myelin growth. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 683–690. <https://doi.org/10.1038/nrn1743>

- Shi, D., Lv, X., Zhang, Z., Yang, X., Zhou, Z., Zhang, L., Zhao, Y., 2013. Smoothed oligomerization/higher order clustering in lipid rafts is essential for high Hedgehog activity transduction. *J. Biol. Chem.* 288, 12605–12614. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.399477>
- Shi, H., Tzamelis, I., Bjørbaek, C., Flier, J.S., 2004. Suppressor of cytokine signaling 3 is a physiological regulator of adipocyte insulin signaling. *J. Biol. Chem.* 279, 34733–34740. <https://doi.org/10.1074/jbc.M403886200>
- Shi, Y.-C., Lau, J., Lin, Z., Zhang, H., Zhai, L., Sperk, G., Heilbronn, R., Mietzsch, M., Weger, S., Huang, X.-F., Enriquez, R.F., Baldock, P.A., Zhang, L., Sainsbury, A., Herzog, H., Lin, S., 2013. Arcuate NPY controls sympathetic output and BAT function via a relay of tyrosine hydroxylase neurons in the PVN. *Cell Metab.* 17, 236–248. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.01.006>
- Shigetomi, E., Bushong, E.A., Haustein, M.D., Tong, X., Jackson-Weaver, O., Kracun, S., Xu, J., Sofroniew, M.V., Ellisman, M.H., Khakh, B.S., 2013. Imaging calcium microdomains within entire astrocyte territories and endfeet with GCaMPs expressed using adeno-associated viruses. *J. Gen. Physiol.* 141, 633–647. <https://doi.org/10.1085/jgp.201210949>
- Shin, A.C., Filatova, N., Lindtner, C., Chi, T., Degann, S., Oberlin, D., Buettner, C., 2017. Insulin Receptor Signaling in POMC, but Not AgRP, Neurons Controls Adipose Tissue Insulin Action. *Diabetes* 66, 1560–1571. <https://doi.org/10.2337/db16-1238>
- Shrestha, Y.B., Wickwire, K., Giraudo, S., 2009. Effect of reducing hypothalamic ghrelin receptor gene expression on energy balance. *Peptides* 30, 1336–1341. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2009.03.013>
- Sibille, J., Pannasch, U., Rouach, N., 2014. Astroglial potassium clearance contributes to short-term plasticity of synaptically evoked currents at the tripartite synapse. *J. Physiol.* 592, 87–102. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2013.261735>
- Siddle, K., 2011. Signalling by insulin and IGF receptors: supporting acts and new players. *J. Mol. Endocrinol.* 47, R1-10. <https://doi.org/10.1530/JME-11-0022>
- Simon, C., Götz, M., Dimou, L., 2011. Progenitors in the adult cerebral cortex: Cell cycle properties and regulation by physiological stimuli and injury. *Glia* 59, 869–881. <https://doi.org/10.1002/glia.21156>
- Simons, M., Krämer, E.-M., Macchi, P., Rathke-Hartlieb, S., Trotter, J., Nave, K.-A., Schulz, J.B., 2002. Overexpression of the myelin proteolipid protein leads to accumulation of cholesterol and proteolipid protein in endosomes/lysosomes. *J. Cell Biol.* 157, 327–336. <https://doi.org/10.1083/jcb.200110138>
- Sims, J.R., Lee, S.-W., Topalkara, K., Qiu, J., Xu, J., Zhou, Z., Moskowitz, M.A., 2009. Sonic hedgehog regulates ischemia/hypoxia-induced neural progenitor proliferation. *Stroke* 40, 3618–3626. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.109.561951>
- Sirko, S., Behrendt, G., Johansson, P.A., Tripathi, P., Costa, M., Bek, S., Heinrich, C., Tiedt, S., Colak, D., Dichgans, M., Fischer, I.R., Plesnila, N., Staufenbiel, M., Haass, C., Snapyan, M., Saghatelian, A., Tsai, L.-H., Fischer, A., Grobe, K., Dimou, L., Götz, M., 2013. Reactive glia in the injured brain acquire stem cell properties in response to sonic hedgehog. [corrected]. *Cell Stem Cell* 12, 426–439. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.01.019>
- Sisó, S., Jeffrey, M., González, L., 2010. Sensory circumventricular organs in health and disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 120, 689–705. <https://doi.org/10.1007/s00401-010-0743-5>
- Skoda, A.M., Simovic, D., Karin, V., Kardum, V., Vranic, S., Serman, L., 2018. The role of the Hedgehog signaling pathway in cancer: A comprehensive review. *Bosn. J. Basic Med. Sci.* 18, 8–20. <https://doi.org/10.17305/bjbms.2018.2756>
- Snaidero, N., Möbius, W., Czopka, T., Hekking, L.H.P., 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, 277–290. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.11.044>
- Sobrino Crespo, C., Perianes Cachero, A., Puebla Jiménez, L., Barrios, V., Arilla Ferreira, E., 2014. Peptides and food intake. *Front. Endocrinol.* 5, 58. <https://doi.org/10.3389/fendo.2014.00058>
- Sofroniew, M.V., 2009. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci.* 32, 638–647. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2009.08.002>

- Sofroniew, M.V., Vinters, H.V., 2010. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 119, 7–35. <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0619-8>
- Soleti, R., Benameur, T., Porro, C., Panaro, M.A., Andriantsitohaina, R., Martínez, M.C., 2009. Microparticles harboring Sonic Hedgehog promote angiogenesis through the upregulation of adhesion proteins and proangiogenic factors. *Carcinogenesis* 30, 580–588. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp030>
- Song, L., Li, Z.-Y., Liu, W.-P., Zhao, M.-R., 2015. Crosstalk between Wnt/ $\beta$ -catenin and Hedgehog/Gli signaling pathways in colon cancer and implications for therapy. *Cancer Biol. Ther.* 16, 1–7. <https://doi.org/10.4161/15384047.2014.972215>
- Stadelmann, C., Timmler, S., Barrantes-Freer, A., Simons, M., 2019. Myelin in the Central Nervous System: Structure, Function, and Pathology. *Physiol. Rev.* 99, 1381–1431. <https://doi.org/10.1152/physrev.00031.2018>
- Stanton, B.Z., Peng, L.F., Maloof, N., Nakai, K., Wang, X., Duffner, J.L., Taveras, K.M., Hyman, J.M., Lee, S.W., Koehler, A.N., Chen, J.K., Fox, J.L., Mandinova, A., Schreiber, S.L., 2009. A small molecule that binds Hedgehog and blocks its signaling in human cells. *Nat. Chem. Biol.* 5, 154–156. <https://doi.org/10.1038/nchembio.142>
- Ste Marie, L., Miura, G.I., Marsh, D.J., Yagaloff, K., Palmiter, R.D., 2000. A metabolic defect promotes obesity in mice lacking melanocortin-4 receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 12339–12344. <https://doi.org/10.1073/pnas.220409497>
- Steculorum, S.M., Collden, G., Coupe, B., Croizier, S., Lockie, S., Andrews, Z.B., Jarosch, F., Klussmann, S., Bouret, S.G., 2015. Neonatal ghrelin programs development of hypothalamic feeding circuits. *J. Clin. Invest.* 125, 846–858. <https://doi.org/10.1172/JCI73688>
- Steculorum, S.M., Ruud, J., Karakasilioti, I., Backes, H., Engström Ruud, L., Timper, K., Hess, M.E., Tsaousidou, E., Mauer, J., Vogt, M.C., Paeger, L., Bremser, S., Klein, A.C., Morgan, D.A., Frommolt, P., Brinkkötter, P.T., Hammerschmidt, P., Benzing, T., Rahmouni, K., Wunderlich, F.T., Kloppenburg, P., Brüning, J.C., 2016. AgRP Neurons Control Systemic Insulin Sensitivity via Myostatin Expression in Brown Adipose Tissue. *Cell* 165, 125–138. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.02.044>
- Steculorum, S.M., Vogt, M.C., Brüning, J.C., 2013. Perinatal programming of metabolic diseases: role of insulin in the development of hypothalamic neurocircuits. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 42, 149–164. <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2012.10.002>
- Stedehouder, J., Kushner, S.A., 2017. Myelination of parvalbumin interneurons: a parsimonious locus of pathophysiological convergence in schizophrenia. *Mol. Psychiatry* 22, 4–12. <https://doi.org/10.1038/mp.2016.147>
- Steiner, B., Kronenberg, G., Jessberger, S., Brandt, M.D., Reuter, K., Kempermann, G., 2004. Differential regulation of gliogenesis in the context of adult hippocampal neurogenesis in mice. *Glia* 46, 41–52. <https://doi.org/10.1002/glia.10337>
- Strigini, M., Cohen, S.M., 1997. A Hedgehog activity gradient contributes to AP axial patterning of the *Drosophila* wing. *Dev. Camb. Engl.* 124, 4697–4705.
- Suh, H., Consiglio, A., Ray, J., Sawai, T., D'Amour, K.A., Gage, F.H., 2007. In vivo fate analysis reveals the multipotent and self-renewal capacities of Sox2<sup>+</sup> neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell Stem Cell* 1, 515–528. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.09.002>
- Swierczynska, M.M., Lamounier-Zepter, V., Bornstein, S.R., Eaton, S., 2013. Lipoproteins and Hedgehog signalling—possible implications for the adrenal gland function. *Eur. J. Clin. Invest.* 43, 1178–1183. <https://doi.org/10.1111/eci.12145>
- Taipale, J., Chen, J.K., Cooper, M.K., Wang, B., Mann, R.K., Milenkovic, L., Scott, M.P., Beachy, P.A., 2000. Effects of oncogenic mutations in Smoothed and Patched can be reversed by cyclopamine. *Nature* 406, 1005–1009. <https://doi.org/10.1038/35023008>
- Takayasu, Y., Iino, M., Shimamoto, K., Tanaka, K., Ozawa, S., 2006. Glial Glutamate Transporters Maintain One-to-One Relationship at the Climbing Fiber–Purkinje Cell Synapse by Preventing Glutamate Spillover. *J. Neurosci.* 26, 6563–6572. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5342-05.2006>
- Takezaki, T., Hide, T., Takanaga, H., Nakamura, H., Kuratsu, J.-I., Kondo, T., 2011. Essential role of the Hedgehog signaling pathway in human glioma-initiating cells. *Cancer Sci.* 102, 1306–1312. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2011.01943.x>

- Tang, J.Y., Mackay-Wiggan, J.M., Aszterbaum, M., Yauch, R.L., Lindgren, J., Chang, K., Coppola, C., Chanana, A.M., Marji, J., Bickers, D.R., Epstein, E.H., 2012. Inhibiting the hedgehog pathway in patients with the basal-cell nevus syndrome. *N. Engl. J. Med.* 366, 2180–2188. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1113538>
- Taschner, M., Bhogaraju, S., Lorentzen, E., 2012. Architecture and function of IFT complex proteins in ciliogenesis. *Differ. Res. Biol. Divers.* 83, S12-22. <https://doi.org/10.1016/j.diff.2011.11.001>
- Tekki-Kessarar, 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. *Dev. Camb. Engl.* 128, 2545–2554.
- 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, 647–656. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2006.04.004>
- 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, 414–426. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.09.021>
- Thaler, J.P., Guyenet, S.J., Dorfman, M.D., Wisse, B.E., Schwartz, M.W., 2013. Hypothalamic inflammation: marker or mechanism of obesity pathogenesis? *Diabetes* 62, 2629–2634. <https://doi.org/10.2337/db12-1605>
- Thaler, J.P., Yi, C.-X., Schur, E.A., Guyenet, S.J., Hwang, B.H., Dietrich, M.O., Zhao, X., Sarruf, D.A., Izgur, V., Maravilla, K.R., Nguyen, H.T., Fischer, J.D., Matsen, M.E., Wisse, B.E., Morton, G.J., Horvath, T.L., Baskin, D.G., Tschöp, M.H., Schwartz, M.W., 2012. Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. *J. Clin. Invest.* 122, 153–162. <https://doi.org/10.1172/JCI59660>
- The, I., Bellaiche, Y., Perrimon, N., 1999. Hedgehog movement is regulated through tout velu-dependent synthesis of a heparan sulfate proteoglycan. *Mol. Cell* 4, 633–639. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)80214-2](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)80214-2)
- Theodosis, D.T., Poulain, D.A., Oliet, S.H.R., 2008. Activity-dependent structural and functional plasticity of astrocyte-neuron interactions. *Physiol. Rev.* 88, 983–1008. <https://doi.org/10.1152/physrev.00036.2007>
- Theunissen, J.-W., de Sauvage, F.J., 2009. Paracrine Hedgehog signaling in cancer. *Cancer Res.* 69, 6007–6010. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-0756>
- 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, 843–846. <https://doi.org/10.1126/science.1085405>
- Tian, L., Jin, T., 2016. The incretin hormone GLP-1 and mechanisms underlying its secretion. *J. Diabetes* 8, 753–765. <https://doi.org/10.1111/1753-0407.12439>
- Tickle, C., Towers, M., 2017. Sonic Hedgehog Signaling in Limb Development. *Front. Cell Dev. Biol.* 5, 14. <https://doi.org/10.3389/fcell.2017.00014>
- Timper, K., Brüning, J.C., 2017. Hypothalamic circuits regulating appetite and energy homeostasis: pathways to obesity. *Dis. Model. Mech.* 10, 679–689. <https://doi.org/10.1242/dmm.026609>
- Titchenell, P.M., Lazar, M.A., Birnbaum, M.J., 2017. Unraveling the Regulation of Hepatic Metabolism by Insulin. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* 28, 497–505. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2017.03.003>
- Toda, C., Santoro, A., Kim, J.D., Diano, S., 2017. POMC Neurons: From Birth to Death. *Annu. Rev. Physiol.* 79, 209–236. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-022516-034110>
- 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 Rep.* 5, 461–470. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2015.08.013>
- Torii, T., Miyamoto, Y., Yamauchi, J., Tanoue, A., 2014. Pelizaeus-Merzbacher disease: cellular pathogenesis and pharmacologic therapy. *Pediatr. Int. Off. J. Jpn. Pediatr. Soc.* 56, 659–666. <https://doi.org/10.1111/ped.12450>

- Toyoda, R., Assimacopoulos, S., Wilcoxon, J., Taylor, A., Feldman, P., Suzuki-Hirano, A., Shimogori, T., Grove, E.A., 2010. FGF8 acts as a classic diffusible morphogen to pattern the neocortex. *Dev. Camb. Engl.* 137, 3439–3448. <https://doi.org/10.1242/dev.055392>
- Traiffort, E., Angot, E., Ruat, M., 2010. Sonic Hedgehog signaling in the mammalian brain. *J. Neurochem.* 113, 576–590. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.06642.x>
- Traiffort, E., Charytoniuk, D., Watroba, L., Faure, H., Sales, N., Ruat, M., 1999. Discrete localizations of hedgehog signalling components in the developing and adult rat nervous system. *Eur. J. Neurosci.* 11, 3199–3214. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.1999.00777.x>
- Traiffort, E., Charytoniuk, D.A., Faure, H., Ruat, M., 1998. Regional distribution of Sonic Hedgehog, patched, and smoothened mRNA in the adult rat brain. *J. Neurochem.* 70, 1327–1330. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1998.70031327.x>
- Traiffort, E., Dubourg, C., Faure, H., Rognan, D., Odent, S., Durou, M.-R., David, V., Ruat, M., 2004. Functional characterization of sonic hedgehog mutations associated with holoprosencephaly. *J. Biol. Chem.* 279, 42889–42897. <https://doi.org/10.1074/jbc.M405161200>
- Traiffort, E., Kassoussi, A., Zahaf, A., Laouarem, Y., 2020. Astrocytes and Microglia as Major Players of Myelin Production in Normal and Pathological Conditions. *Front. Cell. Neurosci.* 14, 79. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00079>
- Traiffort, E., Moya, K.L., Faure, H., Hässig, R., Ruat, M., 2001. High expression and anterograde axonal transport of aminoterminal sonic hedgehog in the adult hamster brain. *Eur. J. Neurosci.* 14, 839–850. <https://doi.org/10.1046/j.0953-816x.2001.01708.x>
- Traiffort, E., Zakaria, M., Laouarem, Y., Ferent, J., 2016. Hedgehog: A Key Signaling in the Development of the Oligodendrocyte Lineage. *J. Dev. Biol.* 4. <https://doi.org/10.3390/jdb4030028>
- Tripathi, R.B., Jackiewicz, M., McKenzie, I.A., Kougioumtzidou, E., Grist, M., Richardson, W.D., 2017. Remarkable Stability of Myelinating Oligodendrocytes in Mice. *Cell Rep.* 21, 316–323. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.09.050>
- Tripathi, R.B., Rivers, L.E., Young, K.M., Jamen, F., Richardson, W.D., 2010. NG2 Glia Generate New Oligodendrocytes But Few Astrocytes in a Murine Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Model of Demyelinating Disease. *J. Neurosci.* 30, 16383–16390. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3411-10.2010>
- Trousse, F., Martí, E., Gruss, P., Torres, M., Bovolenta, P., 2001. Control of retinal ganglion cell axon growth: a new role for Sonic hedgehog. *Dev. Camb. Engl.* 128, 3927–3936.
- Trzaska, K.A., King, C.C., Li, K.-Y., Kuzhikandathil, E.V., Nowycky, M.C., Ye, J.-H., Rameshwar, P., 2009. Brain-derived neurotrophic factor facilitates maturation of mesenchymal stem cell-derived dopamine progenitors to functional neurons. *J. Neurochem.* 110, 1058–1069. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06201.x>
- Tseng, T.T., Gratwick, K.S., Kollman, J., Park, D., Nies, D.H., Goffeau, A., Saier, M.H., 1999. The RND permease superfamily: an ancient, ubiquitous and diverse family that includes human disease and development proteins. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 1, 107–125.
- Tsuboi, K., Shults, C.W., 2002. Intraatrial injection of sonic hedgehog reduces behavioral impairment in a rat model of Parkinson's disease. *Exp. Neurol.* 173, 95–104. <https://doi.org/10.1006/exnr.2001.7825>
- 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, 308–320. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.07.010>
- Tukachinsky, H., Petrov, K., Watanabe, M., Salic, A., 2016. Mechanism of inhibition of the tumor suppressor Patched by Sonic Hedgehog. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, E5866–E5875. <https://doi.org/10.1073/pnas.1606719113>
- Ugbode, C.I., Smith, I., Whalley, B.J., Hirst, W.D., Rattray, M., 2017. Sonic hedgehog signalling mediates astrocyte crosstalk with neurons to confer neuroprotection. *J. Neurochem.* 142, 429–443. <https://doi.org/10.1111/jnc.14064>
- Urbach, A., Witte, O.W., 2019. Divide or Commit - Revisiting the Role of Cell Cycle Regulators in Adult Hippocampal Neurogenesis. *Front. Cell Dev. Biol.* 7, 55. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00055>

- Valdearcos, M., Robblee, M.M., Benjamin, D.I., Nomura, D.K., Xu, A.W., Koliwad, S.K., 2014. Microglia dictate the impact of saturated fat consumption on hypothalamic inflammation and neuronal function. *Cell Rep.* 9, 2124–2138. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.11.018>
- Varela, L., Horvath, T.L., 2012a. AgRP neurons: a switch between peripheral carbohydrate and lipid utilization. *EMBO J.* 31, 4252–4254. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.287>
- Varela, L., Horvath, T.L., 2012b. Leptin and insulin pathways in POMC and AgRP neurons that modulate energy balance and glucose homeostasis. *EMBO Rep.* 13, 1079–1086. <https://doi.org/10.1038/embo.2012.174>
- Varjosalo, M., Li, S.-P., Taipale, J., 2006. Divergence of hedgehog signal transduction mechanism between *Drosophila* and mammals. *Dev. Cell* 10, 177–186. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2005.12.014>
- Varjosalo, M., Taipale, J., 2008. Hedgehog: functions and mechanisms. *Genes Dev.* 22, 2454–2472. <https://doi.org/10.1101/gad.1693608>
- Vecino, E., Rodriguez, F.D., Ruzafa, N., Pereiro, X., Sharma, S.C., 2016. Glia-neuron interactions in the mammalian retina. *Prog. Retin. Eye Res.* 51, 1–40. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2015.06.003>
- Vogt, M.C., Brüning, J.C., 2013. CNS insulin signaling in the control of energy homeostasis and glucose metabolism - from embryo to old age. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* 24, 76–84. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2012.11.004>
- Vorobyeva, A.G., Saunders, A.J., 2018. Amyloid- $\beta$  interrupts canonical Sonic hedgehog signaling by distorting primary cilia structure. *Cilia* 7, 5. <https://doi.org/10.1186/s13630-018-0059-y>
- Voss-Andreae, A., Murphy, J.G., Ellacott, K.L.J., Stuart, R.C., Nillni, E.A., Cone, R.D., Fan, W., 2007. Role of the central melanocortin circuitry in adaptive thermogenesis of brown adipose tissue. *Endocrinology* 148, 1550–1560. <https://doi.org/10.1210/en.2006-1389>
- Vyas, N., Goswami, D., Manonmani, A., Sharma, P., Ranganath, H.A., VijayRaghavan, K., Shashidhara, L.S., Sowdhamini, R., Mayor, S., 2008. Nanoscale organization of hedgehog is essential for long-range signaling. *Cell* 133, 1214–1227. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.05.026>
- Wallace, V.A., Raff, M.C., 1999. A role for Sonic hedgehog in axon-to-astrocyte signalling in the rodent optic nerve. *Dev. Camb. Engl.* 126, 2901–2909.
- Wang, B., Fallon, J.F., Beachy, P.A., 2000. Hedgehog-regulated processing of Gli3 produces an anterior/posterior repressor gradient in the developing vertebrate limb. *Cell* 100, 423–434. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80678-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80678-9)
- Wang, B., Li, Y., 2006. Evidence for the direct involvement of  $\beta$ TrCP in Gli3 protein processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 33–38. <https://doi.org/10.1073/pnas.0509927103>
- Wang, C., Wu, H., Evron, T., Vardy, E., Han, G.W., Huang, X.-P., Hufeisen, S.J., Mangano, T.J., Urban, D.J., Katritch, V., Cherezov, V., Caron, M.G., Roth, B.L., Stevens, R.C., 2014. Structural basis for Smoothed receptor modulation and chemoresistance to anticancer drugs. *Nat. Commun.* 5, 4355. <https://doi.org/10.1038/ncomms5355>
- 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, 338–343. <https://doi.org/10.1038/nature12167>
- Wang, D., He, X., Zhao, Z., Feng, Q., Lin, R., Sun, Y., Ding, T., Xu, F., Luo, M., Zhan, C., 2015. Whole-brain mapping of the direct inputs and axonal projections of POMC and AgRP neurons. *Front. Neuroanat.* 9, 40. <https://doi.org/10.3389/fnana.2015.00040>
- Wang, F., Smith, N.A., Xu, Q., Fujita, T., Baba, A., Matsuda, T., Takano, T., Bekar, L., Nedergaard, M., 2012. Astrocytes modulate neural network activity by  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent uptake of extracellular  $\text{K}^+$ . *Sci. Signal.* 5, ra26. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2002334>
- Wang, J., Ge, J., Cao, H., Zhang, X., Guo, Y., Li, X., Xia, B., Yang, G., Shi, X., 2019. Leptin Promotes White Adipocyte Browning by Inhibiting the Hh Signaling Pathway. *Cells* 8. <https://doi.org/10.3390/cells8040372>
- Wang, J., Lu, J., Bond, M.C., Chen, M., Ren, X.-R., Lyster, H.K., Barak, L.S., Chen, W., 2010. Identification of select glucocorticoids as Smoothed agonists: potential utility for regenerative medicine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 9323–9328. <https://doi.org/10.1073/pnas.0910712107>

- Wang, P.Y.T., Caspi, L., Lam, C.K.L., Chari, M., Li, X., Light, P.E., Gutierrez-Juarez, R., Ang, M., Schwartz, G.J., Lam, T.K.T., 2008. Upper intestinal lipids trigger a gut-brain-liver axis to regulate glucose production. *Nature* 452, 1012–1016. <https://doi.org/10.1038/nature06852>
- Wang, S., Bates, J., Li, X., Schanz, S., Chandler-Militello, D., Levine, C., Maherali, N., Studer, L., Hochedlinger, K., Windrem, M., Goldman, S.A., 2013. Human iPSC-Derived Oligodendrocyte Progenitor Cells Can Myelinate and Rescue a Mouse Model of Congenital Hypomyelination. *Cell Stem Cell* 12, 252–264. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.12.002>
- Wang, Y., Davidow, L., Arvanites, A.C., Blanchard, J., Lam, K., Xu, K., Oza, V., Yoo, J.W., Ng, J.M.Y., Curran, T., Rubin, L.L., McMahon, A.P., 2012. Glucocorticoid compounds modify smoothed localization and hedgehog pathway activity. *Chem. Biol.* 19, 972–982. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2012.06.012>
- Wang, Y., Imitola, J., Rasmussen, S., O'Connor, K.C., Khoury, S.J., 2008. Paradoxical dysregulation of the neural stem cell pathway sonic hedgehog-Gli1 in autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 64, 417–427. <https://doi.org/10.1002/ana.21457>
- Wanner, I.B., Anderson, M.A., Song, B., Levine, J., Fernandez, A., Gray-Thompson, Z., Ao, Y., Sofroniew, M.V., 2013. Glial Scar Borders Are Formed by Newly Proliferated, Elongated Astrocytes That Interact to Corral Inflammatory and Fibrotic Cells via STAT3-Dependent Mechanisms after Spinal Cord Injury. *J. Neurosci.* 33, 12870–12886. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2121-13.2013>
- Warburg, O., 1956. On the origin of cancer cells. *Science* 123, 309–314. <https://doi.org/10.1126/science.123.3191.309>
- Ward, P.S., Thompson, C.B., 2012. Metabolic reprogramming: a cancer hallmark even warburg did not anticipate. *Cancer Cell* 21, 297–308. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.02.014>
- Waterson, M.J., Horvath, T.L., 2015. Neuronal Regulation of Energy Homeostasis: Beyond the Hypothalamus and Feeding. *Cell Metab.* 22, 962–970. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.09.026>
- Watkins, D.N., Berman, D.M., Burkholder, S.G., Wang, B., Beachy, P.A., Baylin, S.B., 2003. Hedgehog signaling within airway epithelial progenitors and in small-cell lung cancer. *Nature* 422, 313–317. <https://doi.org/10.1038/nature01493>
- Wegner, M., Stolt, C.C., 2005. From stem cells to neurons and glia: a Soxist's view of neural development. *Trends Neurosci.* 28, 583–588. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2005.08.008>
- Weider, M., Reiprich, S., Wegner, M., 2013. Sox appeal - Sox10 attracts epigenetic and transcriptional regulators in myelinating glia. *Biol. Chem.* 394, 1583–1593. <https://doi.org/10.1515/hsz-2013-0146>
- Weierstall, U., James, D., Wang, C., White, T.A., Wang, D., Liu, W., Spence, J.C.H., Bruce Doak, R., Nelson, G., Fromme, P., Fromme, R., Grotjohann, I., Kupitz, C., Zatsepin, N.A., Liu, H., Basu, S., Wacker, D., Han, G.W., Katritch, V., Boutet, S., Messerschmidt, M., Williams, G.J., Koglin, J.E., Marvin Seibert, M., Klinker, M., Gati, C., Shoeman, R.L., Barty, A., Chapman, H.N., Kirian, R.A., Beyerlein, K.R., Stevens, R.C., Li, D., Shah, S.T.A., Howe, N., Caffrey, M., Cherezov, V., 2014. Lipidic cubic phase injector facilitates membrane protein serial femtosecond crystallography. *Nat. Commun.* 5, 3309. <https://doi.org/10.1038/ncomms4309>
- White, R., Krämer-Albers, E.-M., 2014. Axon-glia interaction and membrane traffic in myelin formation. *Front. Cell. Neurosci.* 7, 284. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00284>
- Williams, E.K., Chang, R.B., Strohlic, D.E., Umans, B.D., Lowell, B.B., Liberles, S.D., 2016. Sensory Neurons that Detect Stretch and Nutrients in the Digestive System. *Cell* 166, 209–221. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.011>
- Williams, K.W., Margatho, L.O., Lee, C.E., Choi, M., Lee, S., Scott, M.M., Elias, C.F., Elmquist, J.K., 2010. Segregation of acute leptin and insulin effects in distinct populations of arcuate proopiomelanocortin neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 30, 2472–2479. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3118-09.2010>
- Willnow, T.E., Hammes, A., Eaton, S., 2007. Lipoproteins and their receptors in embryonic development: more than cholesterol clearance. *Dev. Camb. Engl.* 134, 3239–3249. <https://doi.org/10.1242/dev.004408>

- Wilson, C.W., Chen, M.-H., Chuang, P.-T., 2009. Smoothed adopts multiple active and inactive conformations capable of trafficking to the primary cilium. *PloS One* 4, e5182. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005182>
- Witcher, M.R., Park, Y.D., Lee, M.R., Sharma, S., Harris, K.M., Kirov, S.A., 2010. Three-dimensional relationships between perisynaptic astroglia and human hippocampal synapses. *Glia* 58, 572–587. <https://doi.org/10.1002/glia.20946>
- Witek, R.P., Yang, L., Liu, R., Jung, Y., Omenetti, A., Syn, W.-K., Choi, S.S., Cheong, Y., Fearing, C.M., Agboola, K.M., Chen, W., Diehl, A.M., 2009. Liver cell-derived microparticles activate hedgehog signaling and alter gene expression in hepatic endothelial cells. *Gastroenterology* 136, 320-330.e2. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.09.066>
- Wong, S.Y., Seol, A.D., So, P.-L., Ermilov, A.N., Bichakjian, C.K., Epstein, E.H., Dlugosz, A.A., Reiter, J.F., 2009. Primary cilia can both mediate and suppress Hedgehog pathway-dependent tumorigenesis. *Nat. Med.* 15, 1055–1061. <https://doi.org/10.1038/nm.2011>
- Wren, A.M., Small, C.J., Abbott, C.R., Dhillo, W.S., Seal, L.J., Cohen, M.A., Batterham, R.L., Taheri, S., Stanley, S.A., Ghatei, M.A., Bloom, S.R., 2001. Ghrelin causes hyperphagia and obesity in rats. *Diabetes* 50, 2540–2547. <https://doi.org/10.2337/diabetes.50.11.2540>
- Wright, S.C., Koziellewicz, P., Kowalski-Jahn, M., Petersen, J., Bowin, C.-F., Slodkiewicz, G., Marti-Solano, M., Rodríguez, D., Hot, B., Okashah, N., Strakova, K., Valnohova, J., Babu, M.M., Lambert, N.A., Carlsson, J., Schulte, G., 2019. A conserved molecular switch in Class F receptors regulates receptor activation and pathway selection. *Nat. Commun.* 10, 667. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08630-2>
- Wu, F., Zhang, Y., Sun, B., McMahon, A.P., Wang, Y., 2017. Hedgehog Signaling: From Basic Biology to Cancer Therapy. *Cell Chem. Biol.* 24, 252–280. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2017.02.010>
- Wu, M., Hernandez, M., Shen, S., Sabo, J.K., Kelkar, D., Wang, J., O’Leary, R., Phillips, G.R., Cate, H.S., Casaccia, P., 2012. Differential modulation of the oligodendrocyte transcriptome by sonic hedgehog and bone morphogenetic protein 4 via opposing effects on histone acetylation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 32, 6651–6664. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4876-11.2012>
- Wu, X., Ding, S., Ding, Q., Gray, N.S., Schultz, P.G., 2002. A small molecule with osteogenesis-inducing activity in multipotent mesenchymal progenitor cells. *J. Am. Chem. Soc.* 124, 14520–14521. <https://doi.org/10.1021/ja0283908>
- Wu, Z., Kim, E.R., Sun, H., Xu, Yuanzhong, Mangieri, L.R., Li, D.-P., Pan, H.-L., Xu, Yong, Arenkiel, B.R., Tong, Q., 2015. GABAergic Projections from Lateral Hypothalamus to Paraventricular Hypothalamic Nucleus Promote Feeding. *J. Neurosci.* 35, 3312–3318. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3720-14.2015>
- Xavier, G.M., Seppala, M., Barrell, W., Birjandi, A.A., Geoghegan, F., Cobourne, M.T., 2016. Hedgehog receptor function during craniofacial development. *Dev. Biol.* 415, 198–215. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2016.02.009>
- Xekardaki, A., Giannakopoulos, P., Haller, S., 2011. White Matter Changes in Bipolar Disorder, Alzheimer Disease, and Mild Cognitive Impairment: New Insights from DTI. *J. Aging Res.* 2011, 286564. <https://doi.org/10.4061/2011/286564>
- Xiao, J., Yang, R., Biswas, S., Zhu, Y., Qin, X., Zhang, M., Zhai, L., Luo, Y., He, X., Mao, C., Deng, W., 2018. Neural Stem Cell-Based Regenerative Approaches for the Treatment of Multiple Sclerosis. *Mol. Neurobiol.* 55, 3152–3171. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0566-7>
- Xiao, X., Tang, J.-J., Peng, C., Wang, Y., Fu, L., Qiu, Z.-P., Xiong, Y., Yang, L.-F., Cui, H.-W., He, X.-L., Yin, L., Qi, W., Wong, C.C.L., Zhao, Y., Li, B.-L., Qiu, W.-W., Song, B.-L., 2017. Cholesterol Modification of Smoothed Is Required for Hedgehog Signaling. *Mol. Cell* 66, 154-162.e10. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.02.015>
- Xie, H., Paradise, B.D., Ma, W.W., Fernandez-Zapico, M.E., 2019. Recent Advances in the Clinical Targeting of Hedgehog/GLI Signaling in Cancer. *Cells* 8. <https://doi.org/10.3390/cells8050394>
- Xie, J., Murone, M., Luoh, S.M., Ryan, A., Gu, Q., Zhang, C., Bonifas, J.M., Lam, C.W., Hynes, M., Goddard, A., Rosenthal, A., Epstein, E.H., de Sauvage, F.J., 1998. Activating Smoothed mutations in sporadic basal-cell carcinoma. *Nature* 391, 90–92. <https://doi.org/10.1038/34201>

- Xing, Y.L., Röth, P.T., Stratton, J.A.S., Chuang, B.H.A., Danne, J., Ellis, S.L., Ng, S.W., Kilpatrick, T.J., Merson, T.D., 2014. Adult neural precursor cells from the subventricular zone contribute significantly to oligodendrocyte regeneration and remyelination. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 34, 14128–14146. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3491-13.2014>
- Xu, B., Goulding, E.H., Zang, K., Cepoi, D., Cone, R.D., Jones, K.R., Tecott, L.H., Reichardt, L.F., 2003. Brain-derived neurotrophic factor regulates energy balance downstream of melanocortin-4 receptor. *Nat. Neurosci.* 6, 736–742. <https://doi.org/10.1038/nn1073>
- Xu, B., Xie, X., 2016. Neurotrophic factor control of satiety and body weight. *Nat. Rev. Neurosci.* 17, 282–292. <https://doi.org/10.1038/nrn.2016.24>
- 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, 349–362. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.03.022>
- Yang, H., Xiang, J., Wang, N., Zhao, Y., Hyman, J., Li, S., Jiang, J., Chen, J.K., Yang, Z., Lin, S., 2009. Converse conformational control of smoothed activity by structurally related small molecules. *J. Biol. Chem.* 284, 20876–20884. <https://doi.org/10.1074/jbc.M807648200>
- Yang, L., McKnight, G.S., 2015. Hypothalamic PKA regulates leptin sensitivity and adiposity. *Nat. Commun.* 6, 8237. <https://doi.org/10.1038/ncomms9237>
- Yang, L., Qi, Y., Yang, Y., 2015. Astrocytes control food intake by inhibiting AGRP neuron activity via adenosine A1 receptors. *Cell Rep.* 11, 798–807. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.04.002>
- Yang, Z.-J., Ellis, T., Markant, S.L., Read, T.-A., Kessler, J.D., Bourbonlous, M., Schüller, U., Machold, R., Fishell, G., Rowitch, D.H., Wainwright, B.J., Wechsler-Reya, R.J., 2008. Medulloblastoma can be initiated by deletion of Patched in lineage-restricted progenitors or stem cells. *Cancer Cell* 14, 135–145. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2008.07.003>
- Yao, S., Lum, L., Beachy, P., 2006. The ihog cell-surface proteins bind Hedgehog and mediate pathway activation. *Cell* 125, 343–357. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.040>
- Yauch, R.L., Dijkgraaf, G.J.P., Alicke, B., Januario, T., Ahn, C.P., Holcomb, T., Pujara, K., Stinson, J., Callahan, C.A., Tang, T., Bazan, J.F., Kan, Z., Seshagiri, S., Hann, C.L., Gould, S.E., Low, J.A., Rudin, C.M., de Sauvage, F.J., 2009. Smoothed mutation confers resistance to a Hedgehog pathway inhibitor in medulloblastoma. *Science* 326, 572–574. <https://doi.org/10.1126/science.1179386>
- Yauch, R.L., Gould, S.E., Scales, S.J., Tang, T., Tian, H., Ahn, C.P., Marshall, D., Fu, L., Januario, T., Kallop, D., Nannini-Pepe, M., Kotkow, K., Marsters, J.C., Rubin, L.L., de Sauvage, F.J., 2008. A paracrine requirement for hedgehog signalling in cancer. *Nature* 455, 406–410. <https://doi.org/10.1038/nature07275>
- Yeo, G.S.H., Connie Hung, C.-C., Rochford, J., Keogh, J., Gray, J., Sivaramakrishnan, S., O’Rahilly, S., Farooqi, I.S., 2004. A de novo mutation affecting human TrkB associated with severe obesity and developmental delay. *Nat. Neurosci.* 7, 1187–1189. <https://doi.org/10.1038/nn1336>
- Yeo, G.S.H., Heisler, L.K., 2012. Unraveling the brain regulation of appetite: lessons from genetics. *Nat. Neurosci.* 15, 1343–1349. <https://doi.org/10.1038/nn.3211>
- Yeung, M.S.Y., Djelloul, M., Steiner, E., Bernard, S., Salehpour, M., Possnert, G., Brundin, L., Frisé, J., 2019. Dynamics of oligodendrocyte generation in multiple sclerosis. *Nature* 566, 538–542. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0842-3>
- Yi, C.-X., Gericke, M., Krüger, M., Alkemade, A., Kabra, D.G., Hanske, S., Filosa, J., Pfluger, P., Bingham, N., Woods, S.C., Herman, J., Kalsbeek, A., Baumann, M., Lang, R., Stern, J.E., Bechmann, I., Tschöp, M.H., 2012a. High calorie diet triggers hypothalamic angiopathy. *Mol. Metab.* 1, 95–100. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2012.08.004>
- Yi, C.-X., Tschöp, M.H., Woods, S.C., Hofmann, S.M., 2012b. High-fat-diet exposure induces IgG accumulation in hypothalamic microglia. *Dis. Model. Mech.* 5, 686–690. <https://doi.org/10.1242/dmm.009464>
- Yi, C.-X., Walter, M., Gao, Y., Pitra, S., Legutko, B., Kälin, S., Layritz, C., García-Cáceres, C., Bielohuby, M., Bidlingmaier, M., Woods, S.C., Ghanem, A., Conzelmann, K.-K., Stern, J.E., Jastroch, M., Tschöp, M.H., 2017. TNF $\alpha$  drives mitochondrial stress in POMC neurons in obesity. *Nat. Commun.* 8, 15143. <https://doi.org/10.1038/ncomms15143>

- Yin, W.-C., Satkunendran, T., Mo, R., Morrissy, S., Zhang, X., Huang, E.S., Uusküla-Reimand, L., Hou, H., Son, J.E., Liu, W., Liu, Y.C., Zhang, J., Parker, J., Wang, X., Farooq, H., Selvadurai, H., Chen, X., Ngan, E.S.-W., Cheng, S.Y., Dirks, P.B., Angers, S., Wilson, M.D., Taylor, M.D., Hui, C.-C., 2019. Dual Regulatory Functions of SUFU and Targetome of GLI2 in SHH Subgroup Medulloblastoma. *Dev. Cell* 48, 167–183.e5. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.11.015>
- Yin, Y., Bangs, F., Paton, I.R., Prescott, A., James, J., Davey, M.G., Whitley, P., Genikhovich, G., Technau, U., Burt, D.W., Tickle, C., 2009. The Talpid3 gene (KIAA0586) encodes a centrosomal protein that is essential for primary cilia formation. *Dev. Camb. Engl.* 136, 655–664. <https://doi.org/10.1242/dev.028464>
- Yoo, S., Blackshaw, S., 2018. Regulation and function of neurogenesis in the adult mammalian hypothalamus. *Prog. Neurobiol.* 170, 53–66. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2018.04.001>
- 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, 873–885. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.01.006>
- Yu, Y., Casaccia, P., Lu, Q.R., 2010. Shaping the oligodendrocyte identity by epigenetic control. *Epigenetics* 5, 124–128. <https://doi.org/10.4161/epi.5.2.11160>
- Yu, Y., Chen, Y., Kim, B., Wang, H., Zhao, C., He, X., Liu, L., Liu, W., Wu, L.M.N., Mao, M., Chan, J.R., Wu, J., Lu, Q.R., 2013. Olig2 targets chromatin remodelers to enhancers to initiate oligodendrocyte differentiation. *Cell* 152, 248–261. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.12.006>
- Yun, S.P., Kam, T.-I., Panicker, N., Kim, SangMin, Oh, Y., Park, J.-S., Kwon, S.-H., Park, Y.J., Karuppagounder, S.S., Park, H., Kim, Sangjune, Oh, N., Kim, N.A., Lee, Saebom, Brahmachari, S., Mao, X., Lee, J.H., Kumar, M., An, D., Kang, S.-U., Lee, Y., Lee, K.C., Na, D.H., Kim, D., Lee, S.H., Roschke, V.V., Liddelow, S.A., Mari, Z., Barres, B.A., Dawson, V.L., Lee, Seulki, Dawson, T.M., Ko, H.S., 2018. Block of A1 astrocyte conversion by microglia is neuroprotective in models of Parkinson's disease. *Nat. Med.* 24, 931–938. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0051-5>
- Zabolotny, J.M., Kim, Y.-B., Welsh, L.A., Kershaw, E.E., Neel, B.G., Kahn, B.B., 2008. Protein-tyrosine phosphatase 1B expression is induced by inflammation in vivo. *J. Biol. Chem.* 283, 14230–14241. <https://doi.org/10.1074/jbc.M800061200>
- Zeisel, A., Muñoz-Manchado, A.B., Codeluppi, S., Lönnerberg, P., La Manno, G., Juréus, A., Marques, S., Munguba, H., He, L., Betsholtz, C., Rolny, C., Castelo-Branco, G., Hjerling-Leffler, J., Linnarsson, S., 2015. Brain structure. Cell types in the mouse cortex and hippocampus revealed by single-cell RNA-seq. *Science* 347, 1138–1142. <https://doi.org/10.1126/science.aaa1934>
- Zeng, X., Goetz, J.A., Suber, L.M., Scott, W.J., Schreiner, C.M., Robbins, D.J., 2001. A freely diffusible form of Sonic hedgehog mediates long-range signalling. *Nature* 411, 716–720. <https://doi.org/10.1038/35079648>
- Zhang, H., Ping, X.L., Lee, P.K., Wu, X.L., Yao, Y.J., Zhang, M.J., Silvers, D.N., Ratner, D., Malhotra, R., Peacocke, M., Tsou, H.C., 2001. Role of PTCH and p53 genes in early-onset basal cell carcinoma. *Am. J. Pathol.* 158, 381–385. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63980-6](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63980-6)
- Zhang, R., Dhillon, H., Yin, H., Yoshimura, A., Lowell, B.B., Maratos-Flier, E., Flier, J.S., 2008. Selective inactivation of Socs3 in SF1 neurons improves glucose homeostasis without affecting body weight. *Endocrinology* 149, 5654–5661. <https://doi.org/10.1210/en.2008-0805>
- Zhang, W., Hong, M., Bae, G., Kang, J.-S., Krauss, R.S., 2011. Cdo modifies the holoprosencephaly spectrum of Cdo mutant mice. *Dis. Model. Mech.* 4, 368–380. <https://doi.org/10.1242/dmm.005744>
- Zhang, W., Kang, J.-S., Cole, F., Yi, M.-J., Krauss, R.S., 2006. Cdo functions at multiple points in the Sonic Hedgehog pathway, and Cdo-deficient mice accurately model human holoprosencephaly. *Dev. Cell* 10, 657–665. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2006.04.005>
- Zhang, X., van den Pol, A.N., 2016. Hypothalamic arcuate nucleus tyrosine hydroxylase neurons play orexigenic role in energy homeostasis. *Nat. Neurosci.* 19, 1341–1347. <https://doi.org/10.1038/nn.4372>
- Zhang, X., Zhang, G., Zhang, H., Karin, M., Bai, H., Cai, D., 2008. Hypothalamic IKKbeta/NF-kappaB and ER stress link overnutrition to energy imbalance and obesity. *Cell* 135, 61–73. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.07.043>

- Zhang, Y., Bulkley, D.P., Xin, Y., Roberts, K.J., Asarnow, D.E., Sharma, A., Myers, B.R., Cho, W., Cheng, Y., Beachy, P.A., 2018. Structural Basis for Cholesterol Transport-like Activity of the Hedgehog Receptor Patched. *Cell* 175, 1352-1364.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.10.026>
- Zhang, Y., Liu, G., Guo, T., Liang, X.G., Du, H., Yang, L., Bhaduri, A., Li, X., Xu, Z., Zhang, Z., Li, Z., He, M., Tsyporin, J., Kriegstein, A.R., Rubenstein, J.L., Yang, Z., Chen, B., 2020. Cortical Neural Stem Cell Lineage Progression Is Regulated by Extrinsic Signaling Molecule Sonic Hedgehog. *Cell Rep.* 30, 4490-4504.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.03.027>
- Zhang, Y., Reichel, J.M., Han, C., Zuniga-Hertz, J.P., Cai, D., 2017. Astrocytic process plasticity and IKK $\beta$ /NF- $\kappa$ B in central control of blood glucose, blood pressure and body weight. *Cell Metab.* 25, 1091-1102.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.04.002>
- Zhang, Y., Sloan, S.A., Clarke, L.E., Caneda, C., Plaza, C.A., Blumenthal, P.D., Vogel, H., Steinberg, G.K., Edwards, M.S.B., Li, G., Duncan, J.A., Cheshier, S.H., Shuer, L.M., Chang, E.F., Grant, G.A., Gephart, M.G.H., Barres, B.A., 2016. Purification and Characterization of Progenitor and Mature Human Astrocytes Reveals Transcriptional and Functional Differences with Mouse. *Neuron* 89, 37–53. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.11.013>
- Zhang, Z.-Y., Dodd, G.T., Tiganis, T., 2015. Protein Tyrosine Phosphatases in Hypothalamic Insulin and Leptin Signaling. *Trends Pharmacol. Sci.* 36, 661–674. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2015.07.003>
- Zhao, Y., Tong, C., Jiang, J., 2007. Hedgehog regulates smoothed activity by inducing a conformational switch. *Nature* 450, 252–258. <https://doi.org/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. <https://doi.org/10.1101/gad.1870310>
- Zhu, X., Bergles, D.E., Nishiyama, A., 2008. NG2 cells generate both oligodendrocytes and gray matter astrocytes. *Dev. Camb. Engl.* 135, 145–157. <https://doi.org/10.1242/dev.004895>
- Zhulyan, O., Nieuwenhuis, E., Liu, Y.C., Angers, S., Hui, C., 2015. Ptch2 shares overlapping functions with Ptch1 in Smo regulation and limb development. *Dev. Biol.* 397, 191–202. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2014.10.023>
- Zuchero, J.B., Fu, 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, 152–167. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.06.011>

## **ANNEXES**

## ROLE DE LA VOIE DE SIGNALISATION SONIC HEDGEHOG DANS LES CELLULES GLAST POSITIVES DU CERVEAU DE SOURIS ADULTE

**Mots clés : Sonic Hedgehog, Astrocytes, Métabolisme, Glast**

La voie Sonic Hedgehog (Shh) est active dans le cerveau de rongeur adulte où elle participe au maintien des cellules souches neurales (CSNs), aux interactions entre neurones et astrocytes et à la réparation des tissus. Chez l'adulte, les astrocytes régulent l'apport énergétique et l'activité des neurones et seraient les principales cellules répondant au signal Shh. Cependant, l'implication de la voie Shh dans les fonctions astrocytaires est mal connue. Au cours de ma thèse, j'ai étudié le rôle de la voie Shh dans les astrocytes à l'aide de diverses approches génétiques, moléculaires, biochimiques et pharmacologiques. J'ai notamment utilisé la lignée de souris transgéniques *Glast-Cre<sup>ERT2</sup>-YFP-Ptc<sup>-/-</sup>* (*YFP-Ptc<sup>-/-</sup>*), un modèle de délétion conditionnelle du récepteur Patched (*Ptc*) dans les cellules *Glast<sup>+</sup>*, et les contrôles *YFP-Ptc<sup>+/+</sup>*. La recombinaison par tamoxifène des souris *YFP-Ptc<sup>-/-</sup>* à l'âge adulte a conduit à la délétion de *Ptc* et à l'expression du rapporteur YFP dans les cellules *Glast<sup>+</sup>*, à savoir les astrocytes, les CSNs et leur descendance. J'ai effectué la première analyse détaillée par smFISH (single molecule fluorescent *in situ* hybridization) des transcrits de la voie Shh dans les astrocytes de plusieurs régions cérébrales dont l'hypothalamus. De plus, j'ai identifié une sous-population d'oligodendrocytes (OLs) matures, exprimant *CC1*, *Olig2* et *Sox10*, comme source potentielle de ligand Shh pour les astrocytes et les neurones *Ptc<sup>+</sup>* du cerveau postnatal. J'ai démontré la présence de la protéine et des transcrits de Shh dans ces OLs avec l'anticorps monoclonal C9C5 ciblant spécifiquement Shh et par smFISH, respectivement.

La caractérisation du phénotype métabolique des souris *YFP-Ptc<sup>+/+</sup>* et *YFP-Ptc<sup>-/-</sup>* à différents âges a révélé l'implication de la voie Shh astrocytaire dans la régulation de l'homéostasie énergétique (HE). En effet, l'activation de la voie Shh dans les astrocytes *Glast<sup>+</sup>* est associée à une sensibilité plus importante au glucose démontrée par des tests de tolérance au glucose et à l'insuline. Cet effet est maintenu au cours du temps et est associé à des niveaux sanguins d'insuline plus faibles. De plus, les souris *YFP-Ptc<sup>-/-</sup>* sont caractérisées

par une absence de prise de poids. Elles présentent une réduction des tissus adipeux s'accompagnant d'une augmentation de l'oxydation des acides gras mesurée par cage métabolique. A l'inverse, la prise alimentaire, l'activité locomotrice et la température corporelle ne sont pas modifiées. Ainsi, l'activation de la signalisation Shh astrocytaire bloque les altérations métaboliques associées à l'âge ou induites par l'obésité. Au niveau cellulaire, la délétion de *Ptc* n'affecte pas l'entrée de glucose dans des cultures primaires d'astrocytes suggérant que les effets observés sont médiés par un autre mécanisme. Dans l'hypothalamus, une région clé pour le contrôle de l'HE, l'activation de la voie Shh astrocytaire a entraîné une augmentation de l'expression des gènes de la voie de l'insuline. L'ensemble de ces données suggère l'idée d'une nouvelle fonction de la voie Shh dans les astrocytes, importante pour la régulation hypothalamique de l'HE. L'analyse du phénotype des souris *YFP-Ptc<sup>+/+</sup>* et *YFP-Ptc<sup>-/-</sup>* a également révélé un rôle clé de la voie Shh dans la balance entre quiescence et activation des CSNs au sein de la zone ventriculaire-sous ventriculaire des ventricules latéraux, une des principales niches neurogéniques chez l'adulte. L'activation de cette voie dans les CSNs induit, à long terme, une hausse du nombre de CSNs quiescentes tandis que les CSNs activées et leur descendance sont très diminuées, affectant la neurogénèse dans cette région. Dans l'ensemble, ce travail met en avant de nouvelles propriétés de la signalisation Shh qui vont permettre d'approfondir la compréhension des fonctions de la voie dans le cerveau adulte, et élargir le potentiel thérapeutique de ses modulateurs pharmacologiques aux maladies neurodégénératives, démyélinisantes et métaboliques.

## INVESTIGATING THE ROLE OF SONIC HEDGEHOG SIGNALING IN GLAST POSITIVE CELLS IN THE ADULT MOUSE BRAIN

**Keywords : Sonic Hedgehog, Astrocytes, Metabolism, Glast**

During embryogenesis, the Sonic Hedgehog (Shh) signaling pathway plays a key role in neural patterning. The pathway is still active in the adult rodent brain where it participates to the maintenance of neural stem cells (NSCs), to neuronal and glial circuitry and to tissue repair (Ruat et al, *Top. Med. Chem.*, 2015). In the adult brain, the astrocytes, glial cells regulating trophic support and activity of neurons, are proposed as the main Shh-responsive cells (Garcia et al, *J. Neurosci.*, 2018). However, the implication of Shh signaling in these astrocytic functions is still poorly characterized.

Here, I investigated the role of Shh signaling in astrocytes using various genetic, molecular, biochemical and pharmacological approaches. I used the transgenic mouse line *Glaxt-Cre<sup>ERT2</sup>-YFP-Ptc<sup>-/-</sup>* (*YFP-Ptc<sup>-/-</sup>*), a model of conditional deletion of the Shh receptor Patched (Ptc) in *Glaxt*-expressing cells, and their control littermates, *YFP-Ptc<sup>+/+</sup>* mice. Tamoxifen-mediated recombination in *YFP-Ptc<sup>-/-</sup>* mice during adulthood led to Ptc deletion and YFP reporter expression specifically in *Glaxt<sup>+</sup>* cells, namely astrocytes, NSCs and their progeny. I provided the first detailed analysis of Shh pathway transcripts expression (Ptc, *Gli1*, *Gli2*, *Gli3*) in astrocytes using single-molecule fluorescent *in situ* hybridization (smFISH) combined to immunohistofluorescence in various brain regions, including the hypothalamus. Moreover, I identified a subpopulation of mature oligodendrocytes (OLs), expressing the OLs markers *CC1*, *Olig2* and *Sox10*, as a potential source of Shh ligand for these astrocytes and for neurons expressing Ptc in the postnatal brain. I demonstrated the presence of Shh protein and transcripts in these cells using the specific Shh monoclonal antibody C9C5 and smFISH, respectively. The characterization of *YFP-Ptc<sup>+/+</sup>* and *YFP-Ptc<sup>-/-</sup>* mice metabolic phenotype at different timepoints revealed the implication of astrocytic Shh pathway in the regulation of whole body energy homeostasis. Indeed the activation of Shh pathway in *Glaxt<sup>+</sup>* astrocytes is associated to a higher sensitivity to

glucose demonstrated by glucose and insulin tolerance tests. This effect was maintained over time and was associated to lower blood insulin levels. *YFP-Ptc<sup>-/-</sup>* mice also exhibited a strong lean phenotype related to the absence of body weight gain. They presented a reduction of white and brown adipose tissues accompanied by an increase of fatty acid oxidation evaluated in metabolic cage, while food intake, locomotor activity and body temperature were not altered. Thus, the activation of astrocytic Shh signaling counteracted age-associated but also diet-induced metabolic alterations. At the cellular level, Ptc deletion did not affect glucose uptake in primary astrocytes cultures suggesting that these effects are mediated by another mechanism. In the hypothalamus, a key region in the control of energy homeostasis, the activation of astrocytic Shh pathway led to an increase of insulin signaling genes expression. Altogether, these data argue for a novel important role of Shh signaling in astrocytes for hypothalamic regulation of energy metabolism.

The phenotype analysis of *YFP-Ptc<sup>+/+</sup>* and *YFP-Ptc<sup>-/-</sup>* mice also revealed a key role of Shh signaling in orchestrating the quiescence and activation of NSCs in the ventricular-subventricular zone of the lateral ventricles, one of the main adult neurogenic niche. Long term activation of Shh pathway in NSCs induced an increase of quiescent NSCs number while activated NSCs and their progeny were strongly depleted affecting neurogenesis in this region.

Overall, this work highlights novel properties of Shh signaling that will allow deeper understanding of its functions in the adult brain, and widens the therapeutic potential of pharmacological modulators of this pathway to neurodegenerative, demyelinating and metabolic disorders.

