



Etude du rôle des oligodendrocytes dans les mécanismes de formation des noeuds de Ranvier

Quentin Rappeneau

► To cite this version:

Quentin Rappeneau. Etude du rôle des oligodendrocytes dans les mécanismes de formation des noeuds de Ranvier. Sciences du Vivant [q-bio]. 2016. hal-01467628

HAL Id: hal-01467628

<https://ephe.hal.science/hal-01467628>

Submitted on 14 Feb 2017

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

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

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES

Sciences de la Vie et de la Terre

Mémoire présenté par
Quentin RAPPENEAU

pour l'obtention du Diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

ETUDE DU ROLE DES OLIGODENDROCYTES
DANS LES MECANISMES DE FORMATION
DES NŒUDS DE RANVIER

Soutenu le Jeudi 8 Septembre 2016 devant le jury :

Dr Sophie THENET - Président de jury
Dr Nathalie SOL-FOULON - Tuteur scientifique
Dr Hamid EL HACHIMI - Tuteur pédagogique
Dr Laurence GOUTEBROZE - Rapporteur
Pr Catherine LUBETZKI - Examineur

Mémoire préparé sous la direction de :

Dr Nathalie SOL-FOULON
Laboratoire de: Etude des
mécanismes de (re)myélinisation
dans le système nerveux central
Directeur : Pr Catherine LUBETZKI
& Pr Bruno STANKOFF

et de
Dr Hamid EL HACHIMI
Laboratoire de: Bases moléculaires,
physiopathologie et traitement des
maladies neurodégénératives
Directeur : Dr Alexis BRICE
EPHE (Sciences de la Vie et de la
Terre)

Je tiens à remercier Catherine Lubetzki pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et pour m'avoir encouragé à suivre cette formation. Nathalie, merci pour ton soutien, tes conseils. Je te suis reconnaissant pour m'avoir guidé dans la réalisation de ce travail.

Je remercie M. Hamid El Hachimi pour avoir accepté d'être mon tuteur au sein de l'EPHE et Mme Laurence Goutebroze pour avoir accepté d'être rapporteur.

Je tiens également à remercier toute l'équipe, Marie-Stéphane, Melina, Pierre-Loup, Sokounthie, Anne, Sean, Emilie, Aysegul, Marc, ainsi que Corentine, Laurent, Magali pour tous les bons moments.

Je remercie aussi tous les membres de l'institut et particulièrement Nicole et Rolando.

Enfin, je remercie mon frère Etienne, Aurélie, Marjorie ainsi que mes parents pour leurs encouragements et leur soutien.

Table des matières

Introduction	1
1. Myélinisation des neurones	2
a. Propagation des potentiels d'action	2
b. La gaine de myéline	3
i. Propriétés	3
ii. Différentes régions de l'axone myélinisé	4
iii. Composition de la myéline	5
c. Oligodendrocytes (différenciation et myélinisation)	6
i. Les différents stades de différenciation	6
ii. Facteurs contrôlant la différenciation des OPCs au cours du développement ..	8
d. Sclérose en plaques	11
i. Aspects cliniques et épidémiologiques	11
ii. Conséquences axonales de la démyélinisation	11
2. Composition moléculaire des domaines axonaux	12
a. Les nœuds de Ranvier	12
b. Les paranœuds	14
c. Les juxtaparanœuds	15
3. Mécanismes d'assemblage des nœuds dans le SNP et le SNC	15
a. SNP	15
b. SNC	17
4. Le projet de recherche	20
Méthodologie	22
1. Animaux	23
2. Culture cellulaire	23
a. Neurones d'hippocampe	23
i. Culture mixte	23
ii. Culture de neurones purifiés	25
b. Cellules gliales	25
i. Culture des cellules gliales	25
ii. Culture des Oligodendrocytes	26
3. Préparation du Milieu Conditionné d'Oligodendrocytes (MCO)	26
a. Traitement des oligodendrocytes	26
4. Traitements des neurones purifiés avec le MCO	27
5. Coupes de tissus au cryostat	27

6. Coupes de tissus au vibratome.....	28
7. Immunofluorescence	28
a. Anticorps utilisés pour les marquages immunofluorescents	28
b. Fixation et marquage des cellules en culture	29
c. Coupes de cerveau flottantes	30
d. Acquisition et traitement des images	30
8. Quantification et analyse statistique	30
9. Analyse protéomique.....	31
a. Fractionnement du MCO	31
b. Préparation des MC (QuaNCAT)	32
c. Analyse des données (pathway studio/ingenuity).....	33
10. Immunoprécipitation et Western Blot	34
a. Immunoprécipitation.....	34
b. Western Blot.....	35
i. Préparation des échantillons	35
ii. Migration et transfert	35
iii. Incubation des Anticorps.....	36
iv. Electro-ChimioLuminescence (ECL).....	37
Résultats	38
1. Chronologie d'apparition des nœuds de Ranvier sur les neurones hippocampaux.....	39
a. Neurones d'hippocampe en culture	39
b. Neurones d'hippocampe au cours du développement <i>in vivo</i>	41
2. L'assemblage de prénœuds est induit par des signaux oligodendrogliaux	44
a. Effet du milieu conditionné d'oligodendrocytes (MCO)	44
b. Phénotype des oligodendrocytes produisant le MCO et activité	45
c. Cinétique d'agrégation des canaux sodium après ajout du MCO à différents temps de culture	46
3. Caractérisation des propriétés biochimiques du MCO.....	49
a. Le(s) facteur(s) responsable(s) de l'activité de clustering est (sont) de nature protéique.....	49
b. Fractionnement	49
c. Exosomes.....	52
4. Analyse protéomique.....	52
a. Analyse protéomique des fractions actives du MCO	53
b. Analyse protéomique du MCO par QuaNCAT	53
c. Différents critères d'analyse	54
d. Résultats obtenus pour les fractions actives	54
e. Résultats de la comparaison MCO/MCA et MCN.....	55

5. Sélection de protéines candidates et Validation	56
a. Choix des candidats.....	56
b. Vérification de l'expression – western blot et immunoprécipitation	57
c. Déplétion du MCO par IP	58
d. Inhibition de la sécrétion par des drogues.....	58
 6. Etude de la régulation de la sécrétion de facteurs pro-agrégants par la signalisation neuronale	 59
 Discussion	 61
 1. Visualisation des prénoeuds in vitro et in vivo dans les neurones GABAergiques avant la myélinisation	 62
 2. Le rôle des molécules nodales pour la mise en place des prénoeuds	 63
 3. Effet de la maturation neuronale sur la capacité à former des prénoeuds.....	 64
 4. Un (des) facteur(s) oligodendrocytaire soluble induit l'agrégation prénodale	 65
 5. Identification de molécules candidates	 66
 6. La sécrétion des facteurs pro-agrégants est régulée par la signalisation neuronale	 68
 Bibliographie	 69

Liste des abréviations :

Ac : anticorps

AIS : segment initial de l'axone

AnkG : Ankyrine G

CAMs : molécule d'adhésion cellulaire

CGP : ceramide galactosyltransferase

CSPG : chondroïtine sulfate proteoglycan

CST : cerebroside sulfotransferase

Div : Day (jours) *in vitro*

GalC : galactocerebroside

IP : immunoprécipitation

K_v : canaux potassique voltage-dépendant

MBP : protéine basique de la myéline

MCA : milieu conditionné d'astrocytes

MCN : milieu conditionné de neurones purifiés

MCO : milieu conditionné d'oligodendrocytes

MEC : matrice extracellulaire

Na_v : canaux sodium voltage-dépendant

Nfasc186 : isoforme 186-kDa de la Neurofascine

NrCAM : NgCAM related cell adhesion molecule

OPC : cellule précurseur d'oligodendrocyte

PDGF : Platelet-derived growth factor

PLP : protéine protéolipidique

SCN : système nerveux central

SEP : Sclérose en Plaques

SNP : système nerveux périphérique

SVF : sérum de veau fœtal

VGAT : vésicules transporteurs du GABA

Introduction

Chez les vertébrés, les informations sont analysées, traitées par les neurones qui enregistrent et organisent les réponses à transmettre à l'ensemble du corps via leurs axones, sous forme d'impulsion électrique : les potentiels d'action. La myélinisation des axones, associée aux nœuds de Ranvier, petits domaines enrichis en canaux sodium voltage dépendants (Na_v), assure une conduction saltatoire rapide de l'influx nerveux.

1. Myélinisation des neurones

a. Propagation des potentiels d'action

La propagation des potentiels d'action sur les fibres non myélinisées s'opère de proche en proche grâce aux canaux sodium voltage-dépendants (Na_v) qui permettent l'entrée de courant dépolarisant sous la forme d'ions sodium Na^+ (figure 1b). Ce courant dépolarisant va diffuser passivement de proche en proche le long de la membrane axonale alors que l'efflux d'ions potassium K^+ par ouverture des canaux potassium voltage-dépendants (K_v) après le passage du potentiel d'action va inactiver les canaux Na_v et lentement permettre la repolarisation de la membrane vers son potentiel de repos. Ces potentiels d'action sont ensuite intégrés au niveau des synapses formées dans la région somatodendritique avec les neurones cibles. Plusieurs paramètres biophysiques gouvernent la vitesse de propagation de l'influx nerveux : le diamètre axonal, la densité des canaux sodium et la température. Mais l'augmentation du diamètre axonal est restreinte par le squelette. La myéline, structure multilamellaire riche en lipides, jouant un rôle d'isolant, permet d'accélérer la vitesse de conduction d'un facteur 50 à 100 pour un axone de même diamètre. La myéline est présente de manière discontinue le long de l'axone, interrompue par des petits domaines enrichis en canaux sodium voltage dépendant (Na_v), les nœuds de Ranvier. Ainsi, la présence de myéline restreint la dépolarisation de la membrane des axones seulement aux nœuds de Ranvier ce qui a pour conséquence une conduction rapide et saltatoire (du latin *saltare*, sauter) des potentiels d'action (Sherman and Brophy, 2005a; Susuki and Rasband, 2008) (figure 1a, 2b).

b. La gaine de myéline

La gaine de myéline fut initialement décrite par Virchow en 1854. L'apparition de la myéline il y a environ 420 millions d'années chez les poissons ayant une mâchoire est l'une des dernières étapes clés de l'évolution du système nerveux des vertébrés (Zalc et al., 2008). Elle est produite par les oligodendrocytes dans le système nerveux central (SNC) et par les cellules de Schwann dans le système nerveux périphérique (SNP) (Bunge et al., 1962; Del Rio-Hortega, 2012). Contrairement à la cellule de Schwann, un seul oligodendrocyte peut myéliniser plusieurs axones : dans le nerf optique par exemple, il myélinise 20 à 40 axones.

i. Propriétés

La myéline associée aux nœuds de Ranvier permet une augmentation de la vitesse de conduction des influx nerveux jusqu'à 100 fois plus importante comparée à celle des axones de même diamètre non myélinisés. La myélinisation permet une considérable économie d'espace et d'énergie. A titre d'exemple, l'axone géant de calmar, qui est amyélinique, occupe un espace 15000 fois supérieur à celui d'une fibre myélinisée dont la vitesse de conduction est équivalente chez le mammifère, et a une dépense énergétique qui est plusieurs milliers de fois plus élevée. Généralement, le taux de myélinisation, qui peut atteindre quelques dizaines de spires membranaires, est quantifié en mesurant le g-ratio, rapport entre le diamètre de l'axone et le diamètre externe de sa gaine (figure 1d). L'organisation et la composition de cette gaine de myéline assurent un soutien à la fois trophique et fonctionnel à l'axone, nécessaire à la conduction et à la survie neuronale.

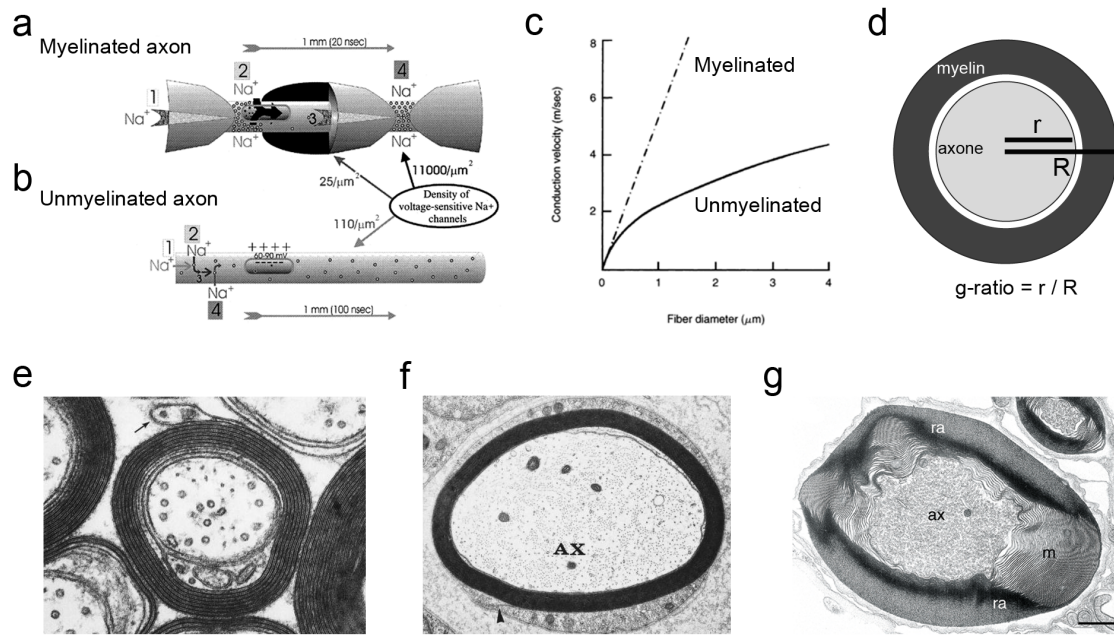


Figure 1 : Sur un axone non-myélinisé, le potentiel d'action se déplace de proche en proche (b) à la différence d'un axone myélinisé, où la conduction est saltatoire, de nœud à nœud (a). Au-delà de $0,2\mu\text{m}$ de diamètre axonal, la conduction des fibres myélinisées est plus rapide que celle des fibres non myélinisées (c). Schéma illustrant le calcul du g-ratio à partir de la coupe coronale d'un axone myélinisé (d). Par microscopie électronique, en coupe coronale, on peut nettement distinguer les axones entourés par des gaines de myéline, synthétisées par les oligodendrocytes dans le SNC (e) ou les cellules de Schwann dans le SNP (f). Chez certains Invertébrés, on peut observer des formations similaires, ou pseudo-gaines myélinisantes (g, barre d'échelle $0,5\mu\text{m}$)

(a) et (b) issus de Garbay et al., 2000; (c) de Waxman and Bennett, 1972; (e) et (f) de Morell and Quarles, 1999; (g) de Davis et al., 1999.

ii. Différentes régions de l'axone myélinisé

Les axones des neurones myélinisés comportent différents domaines (figure 2A) : (1) le segment axonal initial (AIS) où sont générés les potentiels d'action ; (2) les nœuds de Ranvier qui vont permettre la régénération de ces potentiels d'action ; (3) les régions périnodales : paranœuds et juxtaparanœuds qui permettent l'adhésion de la myéline sur l'axone et (4) les internœuds qui sont les régions axonales myélinisées (Desmazières et al., 2012; Freeman et al., 2015).

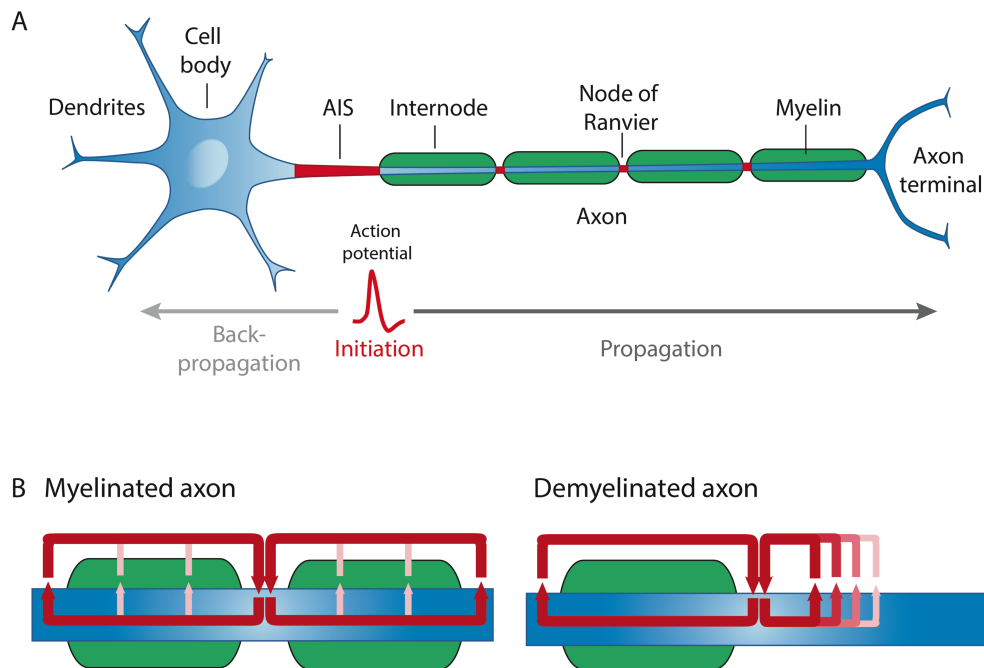


Figure 2 : A - Organisation d'un neurone myélinisé : corps cellulaire / AIS, gaine de myéline et nœuds de Ranvier, terminaisons synaptiques et Représentation de l'initiation et de la propagation d'un potentiel d'action. B – Sur les fibres myélinisées, les potentiels d'action sont régénérés aux nœuds de Ranvier où des courants membranaires forts (flèches rouges) sont observés. En cas de démyélinisation, la propagation des potentiels d'action est ralentie ou bloquée. Extrait de Freeman et al., 2016

iii. Composition de la myéline

La composition de la myéline est caractérisée par une très faible hydratation (40% d'eau) et un enrichissement important en lipides plus qu'en protéines contrairement à la plupart des autres membranes cellulaires.

Composition en lipides :

Les principaux lipides sont répartis en trois groupes : les glycolipides, le cholestérol et les phospholipides. Un groupe en particulier, celui des galactolipides, domine la famille des glycolipides de la myéline.

Le galactocerebroside (GalC) et son dérivé sulfaté représentent un tiers de la masse lipidique de la myéline (Dupree et al., 1998). Le galactocerebroside est un lipide composé de galactose et de ceramide, lié au premier groupe hydroxyle par la ceramide galactosyltransferase (CGT), alors que le sulfatide est formé par la sulfatation du galactocerebroside par l'enzyme cerebroside sulfotransferase (CST; Morell and Radin, 1969). Les galactolipides ont été très étudiés en raison de leur abondance et de leur expression précoce dans les oligodendrocytes. En utilisant

une lignée de souris dont le gène codant pour CGT a été inactivé, plusieurs études ont montré que ces souris ont une myéline avec une ultrastructure anormale, ainsi qu'une rupture au niveau des paranœuds, et une diminution de la vitesse de conduction axonale (Bosio et al., 1996; Coetzee et al., 1996; Dupree et al., 1998). En utilisant une lignée de souris déficiente pour CST, un défaut d'assemblage des paranœuds a été également observé, soulignant l'importance du sulfatide (Honke et al., 2002; Marcus et al., 2006).

Composition en protéines :

Comme mentionné précédemment, certaines protéines bien que présentes en faible proportion dans la myéline sont spécifiques et ont un rôle important. Citons la plus abondante d'entre elles, la protéine protéolipidique ou PLP, protéine de faible masse moléculaire qui n'est pas nécessaire à la myélinisation ou la compaction de la myéline mais est requise pour assurer sa stabilité ainsi que pour la préservation de l'intégrité axonale. En effet, chez les animaux ou les patients qui n'ont pas de PLP on observe une dégénérescence axonale (Garbern et al., 2002; Griffiths et al., 1998). La protéine MBP ou myéline basique protéine constitue 30% des protéines de la myéline. L'absence de MBP chez les souris *shiverer* se traduit par une hypomyélinisation et une absence de ligne dense majeure (Privat et al., 1979). La 2',3'-cyclic-nucleotide 3'phosphodiesterase ou CNP joue un rôle important au niveau des jonctions paranodales et pour l'intégrité axonale mais son absence n'a pas d'impact direct sur la structure de la myéline (Lappe-Siefke et al., 2003; Rasband et al., 2005).

c. Oligodendrocytes (différenciation et myélinisation)

i. Les différents stades de différenciation

Au cours du développement, les oligodendrocytes se différencient à partir de progéniteurs et passent par différents stades de maturation avant de pouvoir former la myéline. Ces différents stades sont : oligodendrocyte précurseur (OPC), pré-oligodendrocyte, oligodendrocyte immature et oligodendrocyte mature non myélinisant. Puis, après ce stade de différenciation, l'oligodendrocyte est capable

de myéliniser et est appelé oligodendrocyte mature myélinisant. Des changements morphologiques sont observés au cours de la maturation. En effet, plus les oligodendrocytes sont matures, plus on observe un nombre important de ramifications. Ces changements morphologiques sont accompagnés d'une évolution de l'expression protéique et glycolipidique. On peut donc repérer les différents stades par immunomarquage de ces protéines et glycolipides. Les principaux marqueurs sont exprimés indiqués sur la figure 3 et sont en particulier : le récepteur PDGFR α (platelet derived growth factor receptor alpha), le ganglioside A2B5 et le chondroïtine sulfate protéoglycan NG2 qui marquent les OPCs ; le sulfatide O4, la galactocérébroside GalC, et CNP qui marquent les oligodendrocytes immatures et la protéine proteolipidique PLP et la MBP, marqueurs des oligodendrocytes matures et myélinisants. Au stade OPC, les cellules sont capables de proliférer et de migrer puis perdent cette capacité et forment des ramifications qui au stade mature pourront s'enrouler autour des axones. Ce processus se produit dans une fenêtre de temps assez courte, tout au moins dans le modèle développemental du poisson-zèbre (Czopka et al., 2013; Watkins et al., 2008).

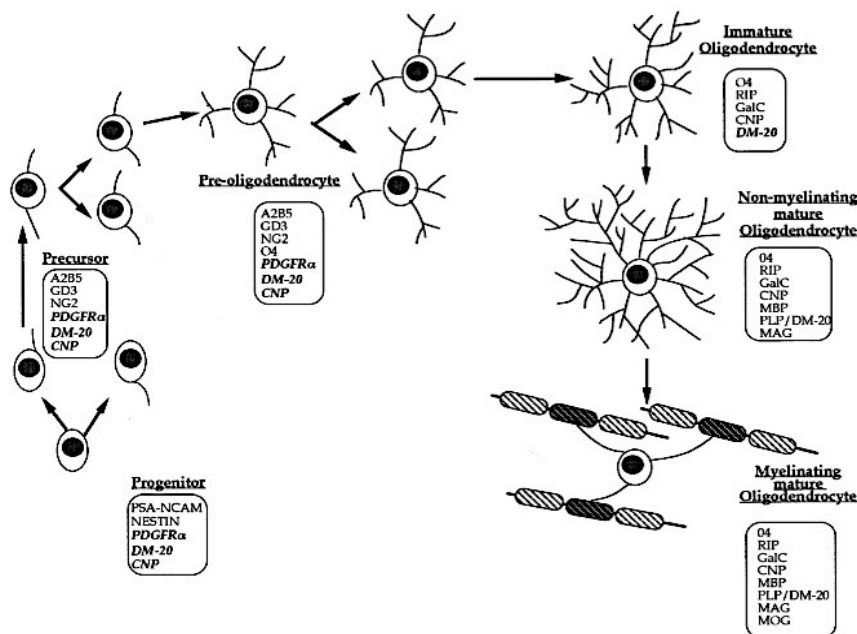


Figure 3 : Représentation schématique des différentes étapes de différenciation et de maturation des oligodendrocytes. Au cours de la période de différenciation, la cellule précurseur devient successivement cellule progénitrice, préoligodendrocyte puis oligodendrocyte immature, cellule post-mitotique. La maturation transforme ensuite l'oligodendrocyte immature en oligodendrocyte mature non myélinisant puis myélinisant. Chacune de ces étapes est caractérisée par des modifications morphologiques et par l'apparition (ou la disparition) de marqueurs spécifiques.

- ii. Facteurs contrôlant la différenciation des OPCs au cours du développement

Les facteurs intrinsèques oligodendrocytaires :

La différenciation des OPCs, qui est spontanée *in vitro* dans des cultures pures et est observable sur des cultures neuronales fixées ou sur des nanofibres synthétiques (Lee et al., 2012, 2013), semble en partie régie par des signaux intracellulaires. Le lignage oligodendrocytaire est initialement régulé par le facteur de transcription Olig2 (Zhou and Anderson, 2002). La différenciation des OPCs est ensuite sous le contrôle d'une combinaison de facteurs tels qu'Olig1, Ascl1, Sox10, Sox17, Myt1 ou YY1 (Gokhan et al., 2005; He et al., 2007; Küspert et al., 2011; Nakatani et al., 2013; Nielsen et al., 2004; Sohn et al., 2006; Zolova and Wight, 2011). Les facteurs de transcriptions à homéodomaines Nkx2.2 et Nkx6.2 semblent jouer un rôle conjoint dans la régulation de la myélinisation. Les signaux transcriptionnels impliqués dans la maturation des oligodendrocytes sont moins connus. De récentes études transcriptomiques ont permis d'avoir un accès plus large aux gènes spécifiquement exprimé par les OPCs, à la fois par rapport aux oligodendrocytes matures et aussi par rapport aux autres types cellulaires comme les astrocytes et les neurones (Cahoy et al., 2008; Dugas et al., 2006).

Les facteurs de contact oligodendrocytaires :

En plus de signaux intracellulaires, la différenciation des OPCs est contrôlée par des molécules de contact. Par exemple, il a été montré que Lingo-1 (leucine rich repeat and Ig domain containing 1), à la fois exprimée par les oligodendrocytes et les neurones, inhibe la maturation des OPCs. En effet, la perte de fonction de Lingo-1 augmente la myélinisation, alors que sa surexpression l'inhibe (Jepson et al., 2012; Mi et al., 2005). Les OPCs et les oligodendrocytes matures expriment aussi le récepteur membranaire Notch1 qui peut être clivé et son domaine intracellulaire transloqué dans le noyau, où il régule de nombreux gènes (Wang et al., 1998). Il semblerait que Notch ait un effet inhibiteur sur la différenciation des OPCs, à la fois *in vitro* et *in vivo* (Genoud et al., 2002). De même, les récepteurs purinergiques de type P2Y GPR17

et GPR30 semblent orchestrer la transition d'un stade OPC immature vers un stade oligodendrocyte mature (Hirahara et al., 2013). Des facteurs déjà connus pour leurs effets négatifs sur la repousse axonale tels que les chondroitines sulfate proteoglycans (CSPG) peuvent aussi avoir un effet inhibiteur dans la maturation des OPCs (Siebert and Osterhout, 2011).

Les facteurs axonaux :

In vivo, les oligodendrocytes ne myélinisent que les axones dont le diamètre est supérieur à 0,2µm (Simons and Trajkovic, 2006). Bien que le mécanisme de sélection soit inconnu, le contact axonal doit donc jouer un rôle sur la maturation des OPCs. Etant donné que la protéine neuréguline-1 (NRG1) est essentielle à la myélinisation des axones du SNP par les cellules de Schwann, il a longtemps été envisagé que NRG1 puisse aussi être impliquée dans la myélinisation du SNC. Cependant, la souris knock-out pour NRG1 présente uniquement une hypomyélinisation du SNC, ce qui montre que NRG1, bien que jouant un rôle dans la myélinisation du SNC, n'y est pas crucial (Roy et al., 2007). L'activité électrique semble être un signal indispensable à l'engagement de la myélinisation par les OPCs. En effet, bloquer ou activer la propagation des potentiels d'action à l'aide de toxines au cours du développement permet respectivement de diminuer ou d'augmenter la myélinisation (Demerens et al., 1996). L'activité électrique axonale envoie donc un signal pro-myélinisant, potentiellement transmis par une production d'ATP, d'adénosine, de glutamate ou de certaines cytokines (Kukley et al., 2007; Wake et al., 2011). L'ATP n'aurait pas un effet direct sur les OPCs ni les oligodendrocytes, mais en favorisant la sécrétion du facteur inhibiteur leucémique (LIF) par les astrocytes, il engagerait la maturation des cellules oligodendrogiales (Ishibashi et al., 2006). *In vitro*, il semble également que la signalisation induite par les récepteurs glutamatergiques présents à la surface des OPCs affecte la prolifération, la migration et la différenciation des OPCs (Gallo et al., 1996; Gudz et al., 2006). La libération de glutamate produite par l'activité neuronale peut aussi contrôler localement l'expression des gènes de myéline et donc favoriser la myélinisation (Wake et al., 2011). L'activité électrique augmente le nombre de feuilletts myéliniques produits par un

oligodendrocyte (Mensch et al., 2015). De plus, des travaux récents réalisés sur le poisson zèbre en vidéo-microscopie, ont montré que seulement 25% des prolongements envoyés par les oligodendrocytes pour initier un enroulement sur l'axone sont stabilisés et que l'activité électrique axonale participe à cette sélection (Hines et al., 2015).

D'autres mécanismes, dépendant de la maturation neuronale, semblent aussi impliqués dans le processus de myélinisation. Comme son homologue oligodendrocytaire, Lingo-1 neuronal limite la différenciation des OPCs et la myélinisation (Lee et al., 2007). Au cours du développement, les fibres nerveuses expriment aussi PSA-NCAM, qui limite les interactions intercellulaires. *In vivo* et *in vitro*, seuls ces axones dépourvus de PSA-NCAM ou du domaine polysialylé sont myélinisés (Charles et al., 2000). Inversement, la protéine axonale L1 semble être impliquée dans les phases précoces de myélinisation, en agissant sur l'adhésion axone/oligodendrocyte, puisque l'utilisation d'anticorps dirigés contre L1 bloque la myélinisation *in vitro* (Barbin et al., 2004).

Les facteurs sécrétés :

La différenciation des OPCs est également régulée par des signaux sécrétés, et notamment négativement par certains facteurs de croissance (PDGF, FGF-2, NGF, HGF) connus pour favoriser leur prolifération. Au contraire, en plus de leur rôle sur la prolifération et la survie des OPCs, le CNTF, le BDNF et l'IGF stimulent aussi la différenciation des OPCs et la myélinisation *in vitro* (Cheng et al., 1998; Stankoff et al., 2002; Xiao et al., 2009). L'expression d'hormones thyroïdiennes (triiodothyronine, T3), d'acide rétinoïque ou de chemokines semble également engager les OPCs vers la sortie du cycle cellulaire et promouvoir leur différenciation (Barres et al., 1994; Turbic et al., 2011; Yuen et al., 2013) à l'inverse de l'accumulation d'acide hyaluronique (Back et al., 2005).

d. Sclérose en plaques

i. Aspects cliniques et épidémiologiques

La sclérose en plaques (SEP) est une maladie auto-immune, inflammatoire du SNC caractérisée pour la première fois en 1868 par le neurologue français Jean-Martin Charcot à l'Hôpital de la Pitié-Salpêtrière.

Elle est décrite comme une maladie inflammatoire démyélinisante et neurodégénérative provoquant des lésions démyélinisantes qui peuvent se manifester dans différentes régions du SNC. Les patients atteints par la maladie présentent divers symptômes cliniques comme l'engourdissement d'un membre, des troubles de la vision, des sensations de décharge électrique dans un membre ou dans le dos, etc. L'étiologie précise de la SEP demeure inconnue, mais impliquerait des facteurs immunologiques, génétiques et environnementaux. Cette maladie touche environ 1 personne sur 1000 avec une répartition de 3 femmes atteintes pour 1 homme (données Arsep).

Bien que l'évolution de la maladie soit variable entre les individus, elle est initialement généralement rémittente, caractérisée par l'alternance de « poussées » et de rémissions. Au bout de quelques années, les « poussées » évoluent vers une forme « progressive », caractérisée par une dégénérescence chronique, responsable de déficits fonctionnels irréversibles : perte de la mobilité, de la perception sensorielle, etc.

ii. Conséquences axonales de la démyélinisation

La démyélinisation est associée à une perte de l'organisation des domaines axonaux et une expression diffuse des canaux Na_v le long de l'axone, (pour revue, Desmazières et al., 2012; Piaton et al., 2010). L'analyse de tissus de patients atteints de SEP montre qu'au niveau des plaques de démyélinisation les canaux Na_v sont redistribués de manière diffuse le long de l'axone (Coman et al., 2006; Craner et al., 2004). On observe également une expression diffuse de Na_v dans des modèles animaux de SEP. De plus, des études d'imagerie sur l'animal *in vivo* et la détection d'Anticorps (Ac) dirigés contre les protéines des nœuds de Ranvier

chez les patients suggère qu'une attaque directe des nœuds est possible (Desmazières et al., 2012; Freeman et al., 2015; Susuki et al., 2013). La destruction de la myéline associée à la perte des nœuds entraîne une disparition de la conduction saltatoire, remplacée par une conduction lente et souvent par un blocage de la conduction à l'origine de symptômes neurologiques (Coman et al., 2006; Craner et al., 2004). Dans la SEP, un processus de réparation myélinique existe, bien que partiel. La remyélinisation s'accompagne d'une reformation des nœuds de Ranvier, du rétablissement de la conduction saltatoire, et de la résolution des symptômes. La réagrégation nodale est un événement précoce qui peut précéder la remyélinisation, ce qui suggère son rôle potentiel dans les processus de réparation axonale et myélinique (Coman et al., 2006). Remyélinisation et reformation des nœuds sont également impliqués dans la prévention de la neurodégénérescence observée à plus long terme (Waxman and Ritchie, 1993).

2. Composition moléculaire des domaines axonaux

a. Les nœuds de Ranvier

Les nœuds de Ranvier sont de petits domaines axonaux d'environ $1\mu\text{m}$ très enrichis en canaux sodium voltage dépendant (Na_v). Ces canaux consistent en un complexe hétérotrimérique entre une sous-unité α d'environ 260kDa constituant le pore du canal et deux sous-unités β formant des interactions non-covalentes ($\beta 1$, $\beta 3$) ou des ponts disulfures ($\beta 2$, $\beta 4$). La famille des SCNA code pour dix isoformes différentes des sous-unités α mais seules les isoformes $\text{Na}_v 1.1$, $\text{Na}_v 1.2$, $\text{Na}_v 1.6$, $\text{Na}_v 1.7$, $\text{Na}_v 1.8$, $\text{Na}_v 1.9$ ont été retrouvées aux nœuds de Ranvier (Catterall, 2012). La sous-unité α est composée de quatre domaines homologues (I à IV) chacun formé de six segments transmembranaires α -hélicoïdaux (S1 à S6) (figure 4). Le segment S4 de chaque domaine homologue permet l'activation (ouverture du canal) de la sous-unité α tandis que la liaison intracellulaire entre les domaines III et IV sert à l'inactivation, par la fermeture du canal, durant la phase de dépolarisation de la membrane. Les sous-unités β sont formées d'une famille de cinq protéines ($\beta 1\text{Na}_v$, $\beta 1\text{BNa}_v$, $\beta 2\text{Na}_v$, $\beta 3\text{Na}_v$, $\beta 4\text{Na}_v$) mais seules les

sous-unités $\beta 1$, $\beta 2$ et $\beta 4$ sont exprimées aux nœuds (Buffington and Rasband, 2013; O'Malley and Isom, 2015; Ratcliffe et al., 2001). Ces sous-unités ont pour rôle la régulation de l'activation ou l'inactivation des sous-unités α (Patton et al., 1994), ainsi que la modulation de l'expression à la membrane cytoplasmique des sous-unités β (Chunling Chen, 2003; O'Malley and Isom, 2015).

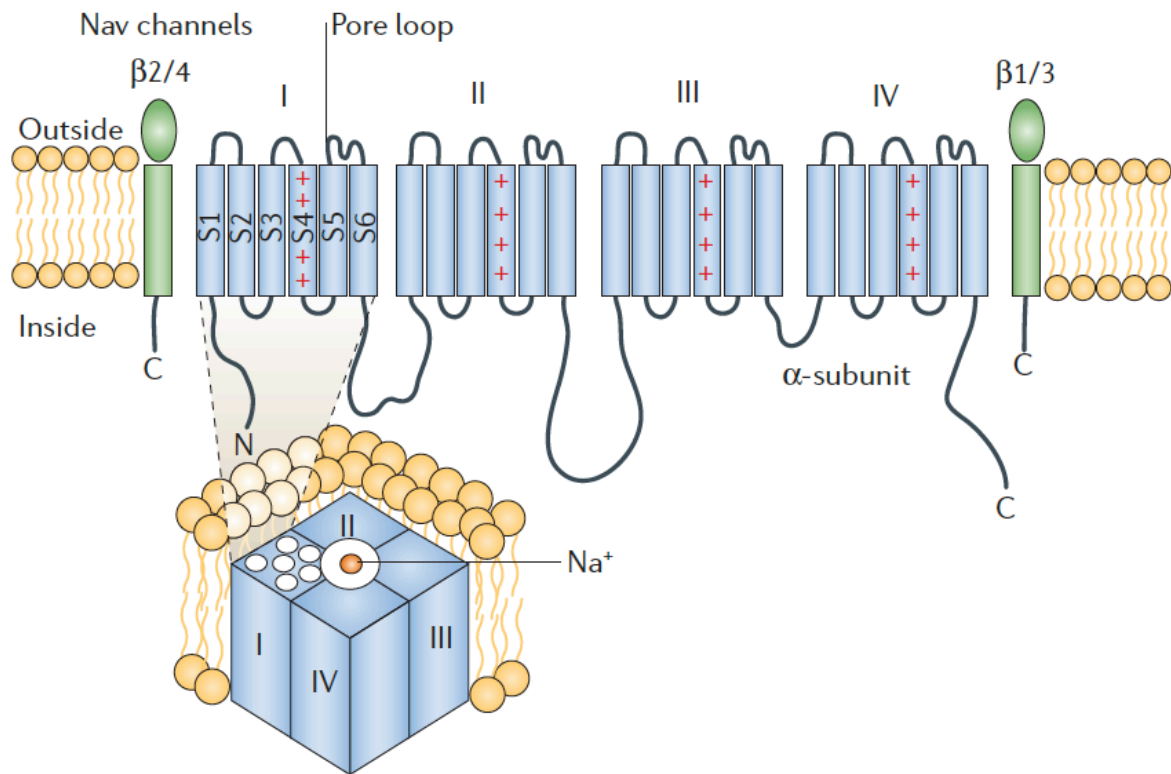


Figure 4 : Structure de la sous-unité α du canal Nav. Adapté de Lai and Jan, 2006.

Les canaux Na_v sont associés à des canaux potassiques voltage dépendants (K_v), à des molécules d'adhésion cellulaire telles que l'isoforme neurale de la neurofascine (Nfasc186), NrCAM (Neuronal Cell Adhesion Molecule) dans le SNC et le SNP (Davis et al., 1996; Sherman et al., 2005) et la contactine-1 dans le SNC seulement (Kazarinova-Noyes et al., 2001; Rios et al., 2000). Ils sont également associés à des protéines d'ancrage au cytosquelette d'actine comme l'ankyrine G (AnkG) et la βIV Spectrine (Chang and Rasband, 2013; Salzer, 2003). Les canaux $\text{K}_v7.2$, $\text{K}_v7.3$ et $\text{K}_v3.1b$ sont responsables de la repolarisation de la membrane axonale et de la régulation de l'excitabilité axonale (Schwarz et al., 2006; Trimmer, 2015). Dans la partie intracellulaire du nœud, les canaux Na_v , la Nfasc186 et la NrCAM sont capables de se lier à l'ankyrinG, capable à son tour

de fixer la β IV-Spectrine, créant une attache au cytosquelette d'actine (Chang and Rasband, 2013; Salzer, 2003; Sherman and Brophy, 2005b). D'autre part, l'interaction de la Nfasc186, la NrCAM ou la contactine-1 avec la sous-unité β 1Na_v par leur domaine extracellulaire Ig-like augmenterait l'expression de canaux Na_v fonctionnels (Kazarinova-Noyes et al., 2001; McEwen and Isom, 2004; Ratcliffe et al., 2001). L'enrichissement des glycoprotéines de la matrice extracellulaire (MEC) forme un réseau chargé négativement qui va induire un tampon cationique et servir dans le maintien des nœuds (Bekku et al., 2009, 2010; Oohashi et al., 2002; Susuki et al., 2013; Weber et al., 1999). Une différence entre le SNC et le SNP est la présence de prolongements des cellules Schwann qui se placent dans l'espace nodal et qui sécrètent de nombreuses molécules, comme la gliomédine ou NrCAM, jouant un rôle clé dans la mise en place des nœuds de Ranvier du SNP (Eshed et al., 2005, 2007; Feinberg et al., 2010). Bien que les cellules de Schwann soient absentes dans les nœuds de Ranvier du SNC, ceux-ci sont occasionnellement en contact avec des astrocytes mais les fonctions de ces interactions ne sont pas encore comprises (French-Constant, 1986).

b. Les paranœuds

Les nœuds sont flanqués de chaque côté par des paranœuds. L'attachement de la myéline se fait aux paranœuds par des jonctions cloisonnées riches en Caspr (Contactin-associated protein), en isoforme oligodendrogliale de la neurofascine (Nfasc 155) et contactine (Bhat et al., 2001a; Charles et al., 2002; Menegoz et al., 1997; Peles et al., 1997; Sherman et al., 2005; Tait et al., 2000). Soulignons que les paranœuds servent aussi de barrière de restriction des composants nodaux (Rios et al., 2003). Les protéines de structure sont enrichies aux paranœuds au niveau des axones et des cellules myélinisantes. Les isoformes 190- et 270-kDa de l'ankyrineG sont enrichies dans les paranœuds du SNC et proviennent d'une expression gliale tandis que l'isoforme 220-kDa de l'ankyrineB est agrégée aux paranœuds dans le SNP (Chang et al., 2014; Ogawa et al., 2006). La perte de ces protéines gliales provoque un défaut de la formation des jonctions paranodales (Chang et al., 2014). L'expression axonale de l' α II-Spectrine et de la

β II-Spectrine, protéines de structure, dans le SNC et dans le SNP au niveau des paranœuds est également impliquée dans l'organisation et le maintien des jonctions paranodales (Buttermore et al., 2011; Cifuentes-Diaz et al., 2011; Einheber et al., 2013; Horresh et al., 2010; Ogawa et al., 2006; Zhang et al., 2013). Une autre fonction importante des paranœuds est la barrière entre les nœuds et les juxtaparanœuds, enrichis en canaux K_v1 (Bhat et al., 2001; Boyle et al., 2001; Zhang et al., 2013; Zonta et al., 2008).

c. Les juxtaparanœuds

Enfin, la région juxtaparanodale est riche en canaux potassiques voltage-dépendants K_v1 formant des complexes macromoléculaires avec les CAM axonale Caspr2 et axonale et gliale TAG-1 (Transient axonal glycoprotein-1) (Gordon et al., 2014; Poliak and Peles, 2003; Traka et al., 2003). En dessous, on retrouve des protéines formant un complexe avec le cytosquelette PSD-93/95, ADAM22, β II-spectrin, α II-spectrin, and 4.1B (Chang and Rasband, 2013). Cette dernière protéine, 4.1B, jouent un rôle essentiel dans l'assemblage des complexes juxtaparanodaux (Cifuentes-Diaz et al., 2011; Horresh et al., 2010). A l'inverse des canaux Na_v , les canaux K_v sont très peu dépolarisés car ils sont situés sous la myéline.

3. Mécanismes d'assemblage des nœuds dans le SNP et le SNC

Bien que les nœuds de Ranvier dans le SNP et le SNC aient quasiment la même composition moléculaire, les mécanismes régulant leur formation ne sont pas les mêmes. Les nœuds se mettent en place au cours du processus de myélinisation grâce aux interactions neurone-glie et dépendent donc de deux types cellulaires différents: les cellules de Schwann dans le SNP et les oligodendrocytes dans le SNC.

a. SNP

Pendant la myélinisation des axones par les cellules de Schwann, les

composants nodaux agrégés aux régions adjacentes au segment myélinisé forment les héminœuds (Vabnick et al., 1996). L'étape initiale de la formation de l'héminœud dépend des interactions entre l'isoforme neurale de la neurofascine (Nfasc186) et la gliomédine et NrCAM exprimés sur les microvillis des cellules de Schwann (figure 5B) (Dzhashiashvili et al., 2007; Eshed et al., 2005; Feinberg et al., 2010; Lustig et al., 2001). Un nœud mature se forme ensuite par la fusion de deux héminœuds au moment de l'élongation des segments myéliniques. Cette interaction est mise en évidence par le fait que la Nfasc186 échoue à se localiser aux héminœuds chez les souris *NrCAM*^{-/-} et *Gliomédine*^{-/-}; cependant, des nœuds matures sont formés dans ces lignées Knock-out grâce aux jonctions paranodales qui jouent un rôle de barrière pour l'assemblage des molécules nodales (Custer et al., 2003; Feinberg et al., 2010). Pour l'assemblage des héminœuds, l'isoforme gliale de NrCAM stabilise les trimères de gliomédine sécrétés pour augmenter les interactions avec la Nfasc186 (Eshed et al., 2007; Feinberg et al., 2010). L'expression de certaines molécules de la MEC, au niveau de la lame basale et des microvilli, semble également renforcer l'agrégation héminodale (Colombelli et al., 2015; Saito et al., 2003).

La Nfasc186 interagit avec l'ankyrine G qui à son tour va être capable de recruter les canaux Na_v et les protéines d'ancrage au cytosquelette d'actine comme la β IV-spectrin (Bennett and Baines, 2001; Dzhashiashvili et al., 2007; Yang et al., 2007; Zhang et al., 2012). Les contacts axogliaux régis par la gliomédine, NrCAM et la Nfasc186 contribuent également au maintien à long-terme des canaux Na_v des nœuds de Ranvier (Amor et al., 2014; Desmazieres et al., 2014).

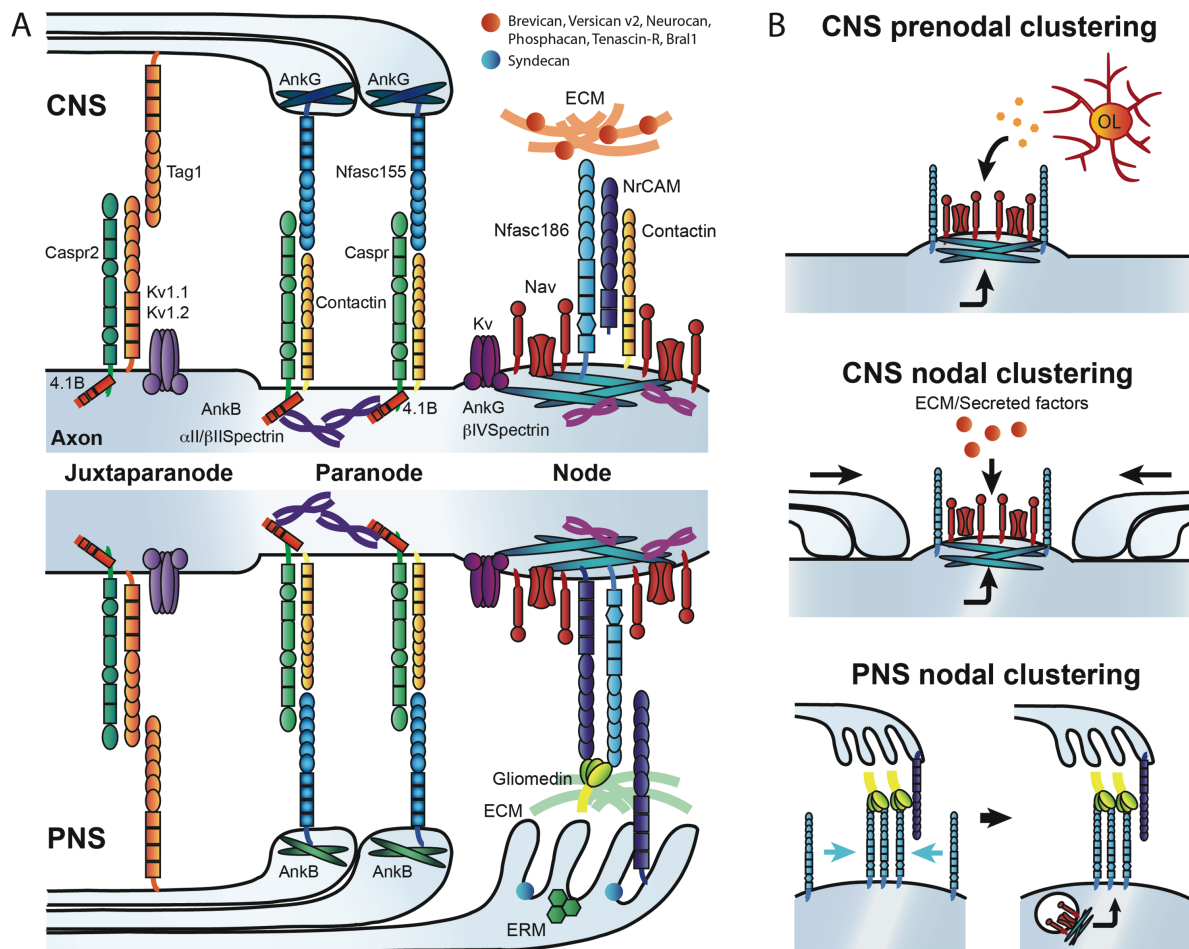


Figure 5 : A) Organisation moléculaire des nœuds de Ranvier et des domaines adjacents dans le système nerveux central et périphérique (CNS et PNS respectivement). B) Mécanismes impliqués dans l'agrégation des canaux Nav. La formation des agrégats nodaux dépend de signaux intrinsèques et extrinsèques (facteurs oligodendrogliaux sécrétés). L'agrégation nodale diffère dans le CNS et le PNS. Dans le CNS, trois composants différents (paranœuds, matrice extracellulaire et protéines de structure) jouent un rôle dans l'assemblage des canaux Nav. Dans le PNS, l'agrégation précoce de la Nfasc186 par l'interaction avec la Gliomédine gliale et NrCAM est suivie par la mise en place des protéines de structures et des canaux voltage-dépendants. Extrait de Freeman et al., 2016

b. SNC

Contrairement au SNP, les mécanismes moléculaires impliqués dans l'assemblage nodal dans le SNC sont partiellement connus. Trois mécanismes complémentaires ont été établis comme participant à l'assemblage des nœuds de Ranvier: l'agrégation des molécules d'adhésion cellulaire induites par la MEC, l'interaction avec les molécules d'ancrage au cytosquelette d'actine, et la formation d'une barrière au niveau des paranœuds (figure 2B) (Susuki et al., 2013). De plus, leur importance relative et des différences existantes entre les sous-populations neuronales sont encore débattues. Contrairement aux cellules

de Schwann, les oligodendrocytes ne contactent pas directement les nœuds de Ranvier et n'expriment pas la gliomédine. D'autres protéines gliales de la MEC (par exemple les chondroitines sulfates proteoglycans, la tenascine-R, Bral1) forment des complexes avec les CAMs axonales telles que la Nfasc186, NrCAM et la Contactine-1 et les sous-unités β des canaux sodium (Bekku et al., 2009; Dours-Zimmermann et al., 2009; Weber et al., 1999; Xiao et al., 1999). Notons que l'agrégation des molécules de la MEC apparaît *in vivo* après l'agrégation des composants nodaux axonaux sur le nerf optique de souris (Susuki et al., 2013). L'assemblage nodal se produit également chez des souris mutantes ne synthétisant pas les protéines de la MEC, suggérant que ces molécules peuvent être impliquées dans la maintenance des nœuds matures mais pas dans leur assemblage (Bekku et al., 2009; Dours-Zimmermann et al., 2009; Susuki et al., 2013; Weber et al., 1999).

Les CAMs axo-nodales contribuent à l'assemblage des nœuds de Ranvier dans le SNC. L'expression transgénique de la Nfasc186 ou Nfasc140 chez des souris *Nfasc*^{-/-}, qui ne sont capables de former ni des nœuds ni des paranœuds, restaure l'agrégation des composants des nœuds de Ranvier tels que Nav, les CAMs, les MEC et les protéines d'ancrage au cytosquelette (Zhang et al., 2015; Zonta et al., 2008). De plus, la perte de la Contactine-1, protéine à ancrage GPI, entraîne une réduction du nombre des nœuds de Ranvier le long de l'axone (Çolakoglu et al., 2014).

La barrière paranodale formée directement par le contact axoglial au niveau des jonctions paranodales participe également à l'assemblage des nœuds de Ranvier dans le SNC (Rasband et al., 1999; Susuki et al., 2013). Dans ce contexte, chez les souris *Nfasc*^{-/-}, la reconstruction des paranœuds par l'expression de l'isoforme gliale de la neurofascine (Nfasc155) est suffisante pour permettre l'agrégation des canaux Nav (Zonta et al., 2008). La souris double mutante pour la β IV-spectrine et pour les composants de la MEC (laissant ainsi intacte les jonctions paranodales) peut assembler des nœuds de Ranvier mais en présentant une réduction des canaux Nav comparé aux souris sauvages et aux simples mutantes (Susuki et al., 2013). Cependant, d'autres études ont montré

que la suppression des paranœuds par l'inactivation des gènes codant pour les protéines paranodales (Caspr ou Nfasc155) ou par la perturbation des jonctions paranodales par la perte des protéines ou des lipides de la myéline, ne modifie pas le délai de mise en place ou le nombre de nœuds de Ranvier (Bhat et al., 2001; Dupree et al., 1998; Ishibashi et al., 2002; Jenkins and Bennett, 2002; Mathis et al., 2001; Zonta et al., 2008). L'ensemble de ces résultats suggère que, tandis que les jonctions paranodales ont la possibilité d'agréger les nœuds de Ranvier dans le SNC, elles ne sont pas nécessaires pour la mise en place des nœuds. A l'inverse, les jonctions paranodales sont particulièrement importantes pour la maintenance des nœuds, suggérant que les mécanismes de stabilisation nodale dépendent d'interactions protéines-protéines qui sont différentes de celles permettant l'assemblage initial des nœuds (Desmazieres et al., 2014; Ishibashi et al., 2002; Rios et al., 2003).

Dans le SNC, les nœuds de Ranvier peuvent être également assemblés par un mécanisme intrinsèque neuronal via les protéines d'ancrage au cytosquelette telles que l'ankyrine G. Cette protéine est capable de se fixer sur plusieurs protéines axo-nodales transmembranaires grâce à de multiples répétitions ANK et de les connecter au cytosquelette (Bennett and Lorenzo, 2013), jetant ainsi les bases d'un grand complexe macromoléculaire hétérogène au niveau des nœuds. L'importance de l'ankyrine G dans l'assemblage nodal est mis en évidence par le fait que la perte des variants 270- et 480-kDa de l'ankyrine G montrent une réduction importante des nœuds formés (Jenkins et al., 2015). Il a été montré également que l'ankyrine érythrocytaire ou ankyrine R, peut être substituée à celle-ci quand son expression est complètement abolie (Ho et al., 2014). L'ankyrine G joue également un rôle important dans le trafic des canaux Na_v aux nœuds via une interaction directe avec la kinésine-1, moteur antérograde associé aux microtubules (Barry et al., 2014).

L'ensemble de ces résultats met en évidence que l'ankyrine G est une molécule importante qui régule l'assemblage des nœuds en liant les composants nodaux ensemble et par le trafic des canaux Na_v .

Enfin, une agrégation axonale des canaux Na_v avant la myélinisation et les contacts oligodendrogliaux a été montrée dans des cultures cellulaires de

ganglions de la rétine, où cette agrégation est induite par des facteurs oligodendrocytaires sécrétés (Kaplan et al., 1997, 2001). Plus récemment, il a été montré par notre équipe que des agrégats nodaux (canaux Na_v colocalisant avec la protéines d'ancrage ankyrine G et les CAMs) sont détectés avant la myélinisation le long des axones dans des cultures de neurones hippocampaux et de cellules gliales ainsi que dans l'hippocampe au cours du développement *in vivo*. Ces agrégats, ou prénœuds, peuvent être induits par un (des) facteur(s) oligodendrocytaires et dépendant de l'ankyrine G pour leur assemblage (Freeman et al., 2015). De manière importante, ces agrégats nodaux sont limités aux neurones GABAergiques, tandis que les agrégats de protéines nodales le long des axones des neurones pyramidaux apparaissent simultanément avec l'enroulement de la myéline, suggérant que les mécanismes d'assemblage peuvent différer selon les sous-populations neuronales (Freeman et al., 2015).

4. Le projet de recherche

Les interactions entre oligodendrocytes et neurones sont nécessaires à la formation des nœuds de Ranvier au cours du développement. Diverses protéines sont enrichies au niveau des nœuds de Ranvier et participent à la mise en place et la stabilisation des canaux Na_v , en les ancrant au cytosquelette et à la matrice extracellulaire. Cependant les mécanismes moléculaires impliqués restent partiellement élucidés. Des études réalisées sur des lésions de sclérose en plaques ont montré que l'organisation moléculaire des nœuds est profondément perturbée par la démyélinisation et que la reformation des nœuds précéderait la reconstitution de la myéline ce qui suggère son rôle potentiel dans les processus de réparation axonale et myélinique. De récents travaux menés par l'équipe ont de plus montré que la formation de structures nodales avant myélinisation est associée à une vitesse de conduction nerveuse accrue le long des axones en absence de myéline, suggérant un rôle fonctionnel de ces structures (Freeman et al, 2015).

Ces données récentes obtenues *in vitro* montrent que les oligodendrocytes sécrètent dans le milieu de culture (MCO, Milieu Conditionné d'Oligodendrocytes) un (des) facteur(s) capable(s) d'induire des agrégats de molécules nodales (Nav, ankyrineG, Nfasc186) ou préœuds avant la myélinisation sur des neurones hippocampaux. Notons que les préœuds sont observés sur des neurones GABAergiques en culture et *in vivo* au cours du développement. Ce(s) facteur(s) soluble(s) est une protéine car le MCO est inactivé quand il est soumis à un chauffage à 70°C ou un traitement par la trypsine. Cette formation de préœuds dépend également de facteurs intrinsèques neuronaux comme l'ankyrine G.

L'objectif de mon projet de recherche est d'identifier la ou les protéines sécrétées par les oligodendrocytes, capables de promouvoir l'assemblage de préœuds sur des neurones purifiés en culture. Notre stratégie a consisté d'une part à produire du milieu conditionné afin de réaliser des études protéomiques, et d'autre part à mieux caractériser les propriétés du MCO pour sélectionner des candidats.

L'identification de facteurs capables de promouvoir l'assemblage des nœuds de Ranvier pourrait permettre à long terme d'envisager de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Méthodologie

1. Animaux

Toutes les expérimentations animales ont été effectuées conformément aux directives institutionnelles (UPMC, INSERM et la Directive 86/609/EEC de la commission européenne). Les souches de rats et de souris suivantes ont été utilisées dans cette étude : rats Sprague-Dawley ou Wistar (commandés chez Janvier LABS S.A.S.), rats Wistar VGAT-venus (Uematsu et al., 2008), souris *Nfasc*^{-/-} (Sherman et al., 2005b), souris *NrCAM*^{-/-} (Moré et al., 2001) souris GAD67-GFP knockin (Tamamaki et al., 2003) et la souris du type-sauvage C57bl/6J.

2. Culture cellulaire

Pour les différentes cultures cellulaires, je dois préalablement réaliser une étape de « coating » ou revêtement sur les plastiques (gamme TPP) et lamelles en verre (VWR, ref 631-1578) en ajoutant une solution de polyéthylèneimine (PEI) à 50µg/ml (Sigma, ref P3143). Le PEI est un polymère cationique qui favorise l'adhésion des cellules dont la membrane est chargée négativement. Le PEI est incubé soit une nuit à 4°C ou 1h à 37°C puis rincé trois fois (car une présence résiduelle en excès serait toxique pour les cellules) avec une solution de PBS 1X (Gibco, ref 14200).

a. Neurones d'hippocampe

i. Culture mixte

Les cultures mixtes d'hippocampes (contenant les neurones et les cellules gliales) sont réalisées à partir de cerveaux d'embryons de rats au 18^{ème} jour de gestation selon un protocole précédemment décrit par Banker and Cowan, 1977 avec quelques modifications. Après dissection, les hippocampes sont dissociés dans une solution de trypsine à 1mg/ml (Worthington, ref LS003703) et de DNase à 24,7U/ml pendant 30min à 37°C. Suite à cette incubation, les cellules sont

également dissociées de façon mécanique à la pipette (aspiration-refoulement). Après neutralisation de la trypsine par ajout de SVF (Sérum de Veau Foetal, Gibco, ref 10270) les cellules sont centrifugées à 400g pendant 5min, et déposées sur les lamelles en verres précoatées au PEI à une densité de $5,0 \times 10^4$ cellules/35mm² (figure 6).

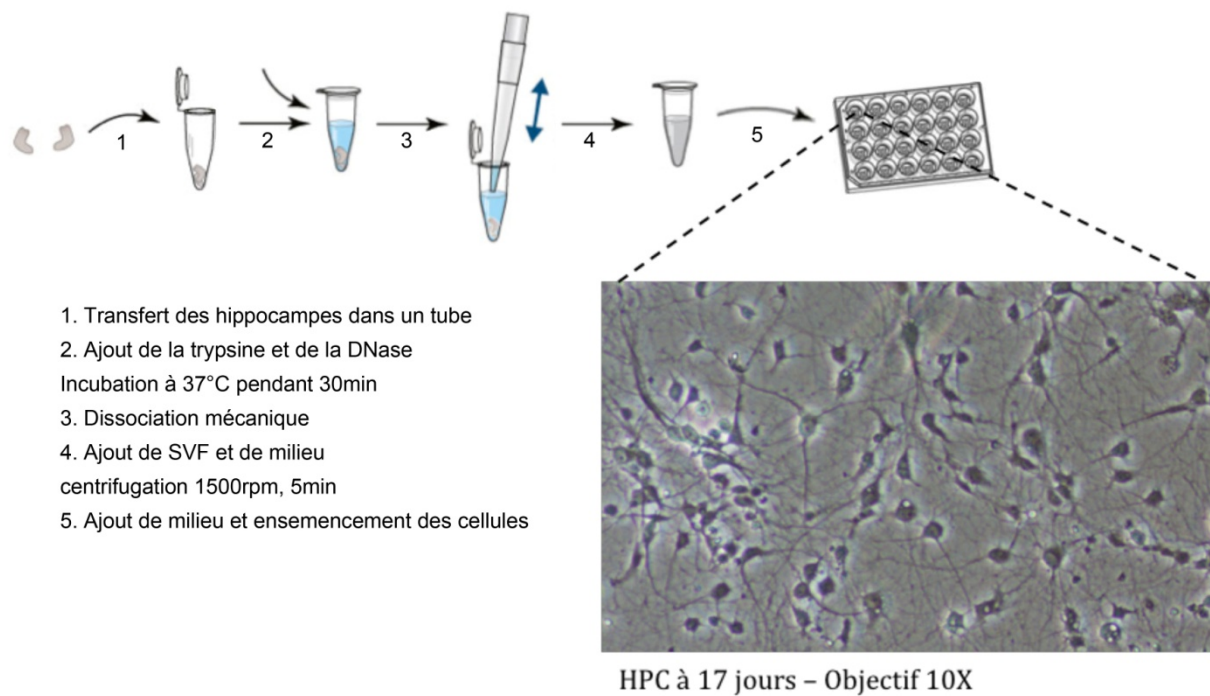


Figure 6 : Schéma de principe de la culture de neurones d'hippocampes

Les cultures sont maintenues pendant 24h (Div1) dans un milieu DMEM-SVF10% / Neurobasal-B27 (1:1 ; B27 utilisé au 1:50, Gibco, ref 17504). Le milieu de culture est ensuite remplacé par un mélange 1:1 de milieu Bottenstein-Sato modifié (BS) et Neurobasal-B27 pendant 48h. Ensuite, la moitié du milieu est changée par du Neurobasal-B27 environ 1 fois par semaine selon l'état des cellules, afin de renouveler les nutriments nécessaires au développement de la culture. Les cellules sont maintenues en culture dans l'incubateur à 37°C avec 5% de CO₂.

ii. Culture de neurones purifiés

Les cultures de neurones purifiés sont obtenues par ajout au Neurobasal-B27 (24h après la mise en culture des cellules, Div1) d'agents anti-mitotiques Uridine et 5-fluorodeoxyuridine (5 μ M; Sigma) pendant 36h (Div3).

b. Cellules gliales

i. Culture des cellules gliales

Les cellules gliales sont mises en culture par dissociation des cortex de cerveaux de rats Wistar de 2 jours. Ils sont dissociés, après élimination des méninges, par l'action de la papaine (Worthington, 28,9U/ml), de la DNase (Worthington, 24,7U/ml) et de la L-cystéine (Sigma, 12,4mg/ml) incubés pendant 30 min à 37°C. Les cellules sont ensuite homogénéisées mécaniquement et passées sur un tamis de 70 μ m (Miltenyi, ref 130-098-462) afin de bien les isoler. Je réalise une centrifugation (400g, 5min) afin d'éliminer le milieu contenant des résidus de papaine, de DNase et de L-cystéine. Les cellules sont ensuite mises en culture dans des flasques pendant une semaine à l'incubateur (37°C, 5% de CO₂), avec du milieu DMEM (Gibco, ref 65965) complété avec 10% de SVF (Gibco, ref 10270) ainsi que 1% d'antibiotiques (Pénicilline-Streptomycine, Gibco, ref 15070) à une densité de 10⁵ cellules/ cm². Après une semaine, la moitié du milieu est changée. Pour récupérer les oligodendrocytes, les flasques de cellules gliales seront mises trois fois en agitation à 8, 12 et 15 jours de cultures (figure 7).

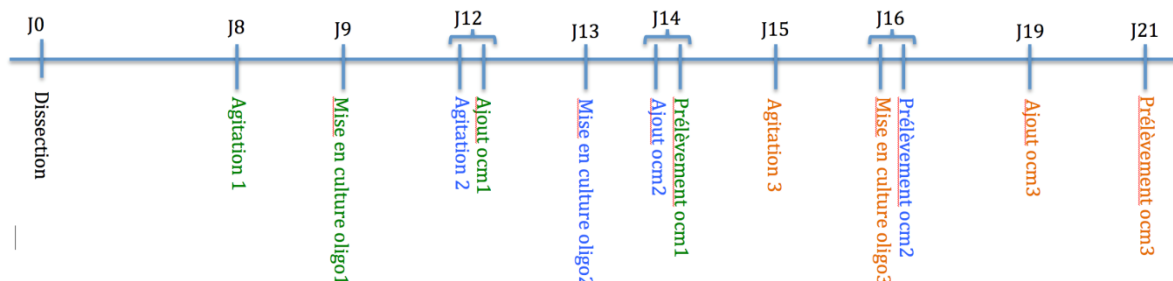


Figure 7 : Organisation temporelle de la production du MCO

ii. Culture des Oligodendrocytes

Après 8-15 jours de culture, les flasques de cultures sont mises en agitation pendant une nuit (entre 15h et 18h d'agitation, 250rpm, 37°C ; McCarthy and Vellis, 1980). Je prélève le milieu qui contient les oligodendrocytes ainsi que des cellules microgliales flottantes. Une étape d'adhésion au plastique est nécessaire afin d'éliminer un maximum de cellules microgliales car ces cellules adhèrent rapidement au plastique. Pour cela, j'incube le milieu dans des boîtes en plastique pendant 10 à 15min à 37°C. Le milieu contenant les cellules qui n'ont pas adhéré est récupéré et centrifugé à 400G pendant 5min. Les oligodendrocytes sont ensuite cultivés en milieu Bottenstein-Sato contenant du PDGF (10ng/ml) pendant 24h. Cela va permettre aux oligodendrocytes de proliférer (figure 7).

3. Préparation du Milieu Conditionné d'Oligodendrocytes (MCO)

Après 24h de culture, le milieu BS des oligodendrocytes est remplacé par du Neurobasal-B27. Ce milieu est prélevé après 48h, filtré sur un filtre de 0,22µm et stocké à 4°C (figure 7). La concentration en protéines du MCO (4.1 ± 2.4 µg/µL, moyenne $\pm$ écart-type de quatre MCO) a été mesurée par la méthode BCA (Bicinchoninic Acid, Pierce, ref 23227).

a. Traitement des oligodendrocytes

Pour étudier la régulation de l'activité du MCO, j'ai traité les oligodendrocytes au moment de produire le MCO avec différents agents pharmacologiques : l'édelfosine (10µM) et le U73122 (5µM) inhibiteurs de la phospholipase C, afin d'inhiber la sécrétion des molécules à ancrage GPI ; l'AMPA et le NMDA (10µM et 100µM) qui sont des agonistes glutamatergiques ainsi que le muscimol (10µM et 100µM) qui est un agoniste des récepteurs GABA_A.

Ces molécules ont été incorporées au milieu Neurobasal-B27 et mises en contact avec les oligodendrocytes pendant 1h. Le milieu a ensuite été changé pour du

Neurobasal-B27 sans la molécule et incubé pendant 48h pour produire le MCO. Dans le cas de l'AMPA, du NMDA et du muscimol, un autre traitement a été réalisé en laissant la molécule incubé pendant les 48h de production du MCO. De la même manière que les autres MCO, ils ont été filtrés et stockés à 4°C après le prélèvement.

4. Traitements des neurones purifiés avec le MCO

Le MCO (500 µl/ puits) est ajouté aux neurones d'hippocampes purifiés à Div3 après avoir retiré les agents anti-mitotiques. La moitié du milieu de culture est changée avec du Neurobasal-B27 environ 1 fois par semaine.

5. Coupes de tissus au cryostat

Les souris GAD67-GFP et les rats VGAT-venus sont anesthésiés à P12 et P13 par injection intrapéritonéale d'une dose létale d'Euthasol-Vet (10µl/g, Centravet) précédé par une anesthésie avec du Rompun 2% (Bayer). Les tissus des animaux sont fixés avec de la paraformaldehyde (PFA) à 1% ou 4% par perfusion intracardiaque, et les cerveaux sont disséqués et post-fixés en PFA 1% ou 4% (1/2 heure pour la fixation en pfa 4% et 1h pour la fixation en pfa 1%) et rincés avec une solution de PBS avant d'être équilibré dans solution à gradient de sucrose (5-30%), qui est un cryoprotecteur permettant la congélation des tissus sans les altérer.

Cette équilibration se fait progressivement. Je commence par les incubé une nuit dans une solution à 5% de sucrose. Le lendemain, je remplace la solution de 5% par une solution à 15% que j'incube sur la journée. Le soir, je la remplace par une solution à 30% que j'incube toute la nuit. Une fois équilibré, j'inclus le cerveau dans de l'OCT (Tissue-Tek) et je le congèle dans de l'isopentane froid (-63°C). Une fois congelé, le cerveau est coupé au cryostat (Leica, 3050S) à une épaisseur de 35 µm par coupe, en série selon le plan sagittal.

6. Coupes de tissus au vibratome

Les rats sont anesthésiés et les tissus fixés de la même manière que précédemment, avec de la PFA à 4% et post-fixé 1h, puis rincé au PBS. Le tissu est ensuite coupé au scalpel selon un plan à 120° pour aligner le trajet septo-hippocampal. Il est ensuite inclus dans un bloc à 3% d'agarose en prenant soin de bien aplatir les coupes 2 et 3 (voir figure 8a, extraite de l'article (Tóth et al., 1997). Le bloc est fixé sur une platine pour être coupé au vibratome (Microm, HM650V). Le cerveau est d'abord dégrossi en coupant à 250 µm pour obtenir une surface de coupe plane et le cerveau est ensuite coupé à une épaisseur de 40 µm.

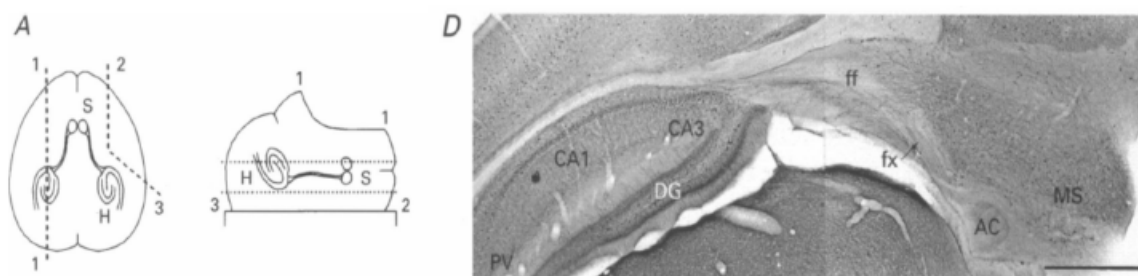


Figure 8 : Schéma de coupe parasagittale. Modifié de la figure 1 de l'article de Tóth et al., 1997.

7. Immunofluorescence

La technique d'immunocytochimie utilise la spécificité d'un anticorps (Ac) primaire à se fixer à son antigène cible, à la surface ou à l'intérieur d'une cellule. Pour cela, un premier Ac spécifique de l'antigène cible est utilisé, puis un second Ac couplé à un fluorochrome va reconnaître l'espèce du premier Ac.

a. Anticorps utilisés pour les marquages immunofluorescents

Les Ac primaires utilisés pour marquer les oligodendrocytes sont anti-NG2 (IgG de lapin, Millipore polyclonal, 1:100), O4 (IgM de souris, surnageant d'hybridome produit au laboratoire, 1:10), GalC (IgG de souris, surnageant d'hybridome produit au laboratoire, 1:10), PLP (IgM de rat, surnageant

d'hybridome produit au laboratoire, 1:10), MBP (IgG de poulet, Millipore polyclonal, 1:500). Pour marquer les astrocytes, j'utilise l'Ac anti-GFAP (IgG de lapin, Dako polyclonal, 1:500) et pour marquer la microglie j'utilise l'anti-CD11b (IgG2a de souris, BD pharmingen polyclonal, 1:100). Les marquages neuronaux ont été réalisés avec les Ac anti-GAD67 (IgG2a de souris, Millipore clone 1G10.2, 1:400), Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II (CamKII, IgG1 de souris, Abcam clone 6G9; 1:1,000), Neurofilament-M (IgG de lapin, Millipore polyclonal, 1:500), Neurofilament phosphorylé (Smi31, IgG1 souris, Covance, 1:1000). Les canaux sodium voltage-dépendants ont été marqués avec l'anti-Pan Na_v (IgG1 de souris, Sigma clone K58/35, 1:300) et les chaînes bêta ont été marquées avec les anti-β1 (IgG de lapin, donné par Peter Brophy, 1:200) et anti-β2 (IgG de lapin, Millipore polyclonal, 1:200). La neurofascine a été marquée avec les anti-Pan Nfasc externe (IgG2a souris, Neuromab clone A12/18, 1:100) et Pan Nfasc (IgG de lapin, Abcam polyclonal, 1:100). Deux Ac ont été utilisés pour marquer l'AnkyrinG, un Ac polyclonal (IgG de lapin, donné par Francois Couraud INSERM UMR5925 Paris, 1:500) et un Ac monoclonal (IgG2a de souris, Neuromab clone N106/36, 1:100). Les molécules fluorescentes GFP sont marquées avec un anti-GFP (IgG de poulet, Millipore polyclonal, 1:500), et la mcherry est marquée avec un anti-mcherry (IgG de poulet, Encor Biotechnology, 1:2000).

b. Fixation et marquage des cellules en culture

A l'issue de la culture, les cellules sont fixées avec du paraformaldéhyde à 4% pendant 10min ou, pour les marquages des canaux Na_v, par une combinaison de paraformaldéhyde à 1% pendant 10min suivi de méthanol froid (-20°C) pendant 10min. Une fois fixées, les cellules sont rincées en PBS 1X et immunomarquées immédiatement ou stockées dans du PBS 1X à 4°C.

Avant le marquage, les cellules sont incubées 10 minutes dans une solution de blocage composée par du PBS 1X, 5% Normal Goat Serum (Invitrogen, ref 50062Z) et si on doit perméabiliser les cellules on ajoute 0,1% de Triton X-100.

Les Ac primaires sont dilués dans cette même solution de blocage et incubés pendant 2h à température ambiante ou une nuit à 4°C. Les lamelles sont ensuite rincées deux fois avec du PBS 1X avant l'incubation de l'Ac secondaire pendant 1h à température ambiante. A la fin de l'incubation, j'ajoute une solution de Hoechst à 1µg/ml pendant 1 minute pour marquer les noyaux des cellules. Enfin, les lamelles sont rincées deux fois en PBS 1X, une fois en eau et séchées avant d'être montées sur lame avec du Fluoromount-G (SouthernBiotech, ref 0100-01).

c. Coupes de cerveau flottantes

Les coupes de cerveaux réalisées au cryostat sont prétraitées avec de l'éthanol froid (-20°C pendant 10min) et rincées au PBS avant les marquages. Elles sont ensuite traitées avec la solution de blocage contenant 0,2% de Triton X-100, 1h à température ambiante, avant l'incubation des Ac primaires sur la nuit à 4°C. Les coupes sont lavées en PBS et incubées 2h à température ambiante avec les Ac secondaires. Elles sont ensuite rincées en PBS et montées entre lame et lamelle avec du Fluoromount-G.

d. Acquisition et traitement des images

Les marquages sont visualisés avec un microscope confocal Olympus FV-1000 ou le système apotome (Zeiss AxioImager) et le logiciel d'acquisition Zen2. Les séries en Z des coupes de cerveau sont réalisées avec une distance de 0,3 µm pour les analyses qualitatives. Les fluorochromes sont acquis de façon séquentielle. Une projection en Z des images est réalisée en fonction du maximum d'intensité fluorescente grâce au logiciel ImageJ (NIH).

8. Quantification et analyse statistique

Pour déterminer l'état de maturation des populations d'oligodendrocytes qui servent à produire les milieux conditionnés, je réalise l'acquisition de 10

champs de vues par lamelle, sélectionnés de façon aléatoire. Les comptages des populations sont ensuite réalisés avec le logiciel ImageJ.

Afin d'évaluer l'activité pro-agrégante des milieux conditionnés produits, je compte parmi la population de neurones GABAergiques (marqués par l'anti-GAD67), le nombre de neurones qui ont formé des prénœuds (agrégats de canaux Na_v le long de l'axone du neurone, identifié par la présence de l'AIS ; figure 9). Ce pourcentage est établi sur le comptage de 50 à 100 neurones GABAergiques par lamelle et par la moyenne de deux lamelles par MCO.

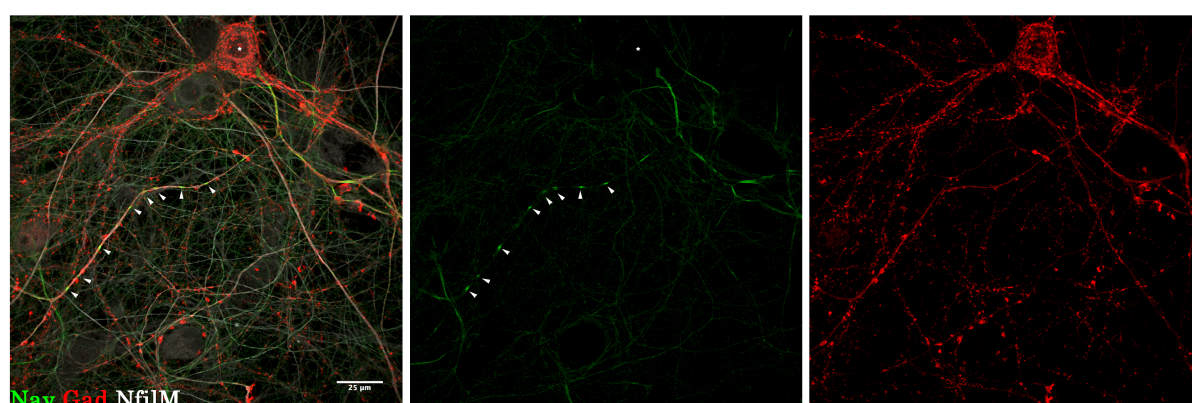


Figure 9 : Neurone GABAergique (GAD67+, en rouge) avec prénœuds (Nav, en vert).
★corps cellulaire, les flèches indiquent les agrégats de canaux Nav.

Les analyses statistiques ont été réalisées grâce au logiciel « prism » en utilisant un test de Mann Whitney.

9. Analyse protéomique

a. Fractionnement du MCO

Afin de restreindre la liste des candidats potentiels permettant l'agrégation des molécules nodales, nous collaborons avec des biochimistes qui ont fractionné le MCO et un milieu de culture non incubé (contrôle) sur une colonne d'échange d'anions (10 paires MCO/contrôle testées). J'ai testé les fractions obtenues sur des cultures de neurones purifiés pour déterminer dans quelle(s) fraction(s) se situe l'activité du MCO.

b. Préparation des MC (QuaNCAT)

Une autre approche plus sélective et quantitative est également mise en œuvre. Il s'agit de la technique QuaNCAT qui permet la quantification des protéines néo-synthétisées et sécrétées grâce à des acides aminés marqués (Eichelbaum et al., 2012a; Howden et al., 2013a). Le MCO est produit par la même technique mais en remplaçant la lysine et l'arginine par des isotopes stables et en remplaçant la méthionine par de l'AHA permettant de lier les protéines à une résine d'agarose. Ainsi, les protéines synthétisées dans le milieu vont pouvoir être isolées et identifiées par analyse peptidique en spectrophotométrie de masse. Le principe de cette technique est basé sur une comparaison entre le MCO et un milieu de référence n'ayant pas (ou peu) d'activité. Pour cela, je produis plusieurs milieux de référence qui vont être comparé au MCO :

- MCA : milieu conditionné d'astrocytes
- MCN : milieu conditionné de neurones purifiés

Pour pouvoir comparer les différents milieux lors de l'analyse par spectrophotométrie de masse, les acides aminés utilisés possèdent un marquage « lourd » pour produire le MCO et un marquage « intermédiaire » pour produire les milieux de référence (figure 10). L'équipe de biochimiste se charge d'effectuer la spectrophotométrie de masse comparative des différents milieux conditionnés et me fournissent des listes de protéines établies à partir des peptides identifiés.

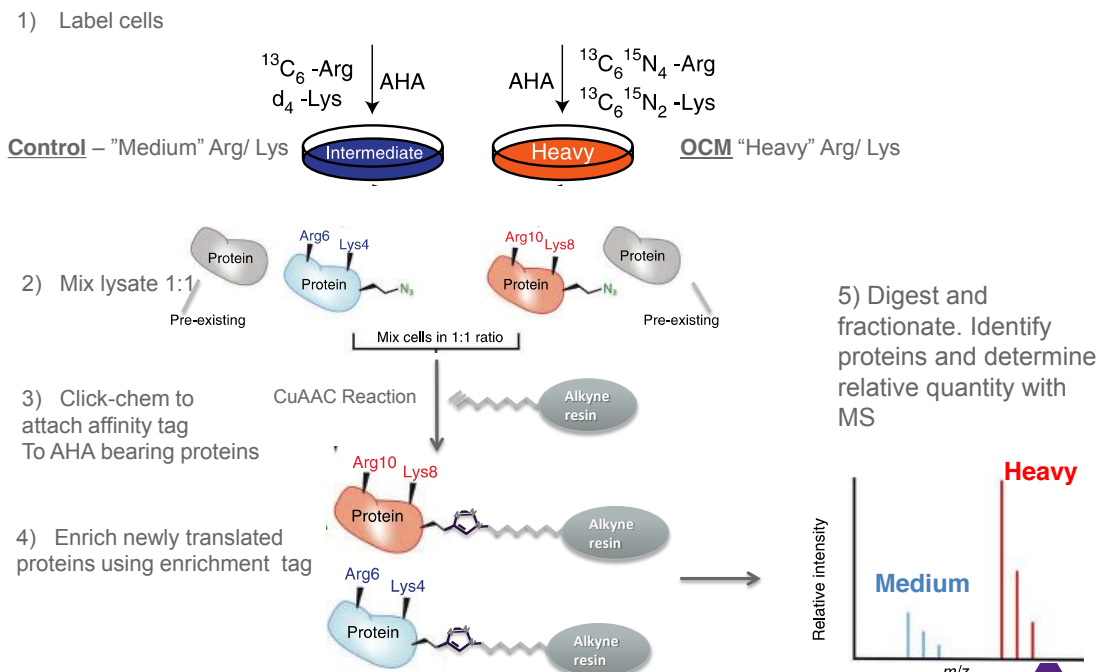


Figure 10 : Récapitulatif de la méthode QuanNCAT pour identifier les protéines néosynthétisées dans le MCO. Figure extraite de l'article Howden et al., 2013.

Les résultats sont analysés grâce à plusieurs paramètres indiquant pour une protéine :

- La somme des peptides uniques identifiés
- La somme totale des peptides identifiés
- Le pourcentage de la séquence protéique couvert par les peptides identifiés
- Le nombre de fois où le même peptide est identifié « Peptide Spectral Match », indicateur de l'abondance relative de la protéine

Les protéines contaminantes connues pour être présentes dans le sérum de veau foetal ainsi que celles avec un seul peptide unique identifié ont été retirées de la liste.

c. Analyse des données (pathway studio/ingenuity)

Pour analyser les listes obtenues via la méthode du QuanCAT, nous travaillons avec l'équipe de bioinformatique de l'Institut. Nous utilisons les logiciels « Ingenuity Pathway Analysis » et « Pathway Studio » qui regroupent

différentes bases de données décrivant les gènes et protéines ainsi que leurs interactions. Cela me permet de construire des réseaux de protéines en fonction de leurs interactions et nous aide à déterminer les candidats potentiellement intéressants.

10. Immunoprécipitation et Western Blot

Afin de vérifier et mesurer l'expression de protéines sélectionnées lors de l'analyse protéomique, dans le lysat d'oligodendrocytes et le surnageant, j'ai réalisé des immunoprécipitations avec un Ac spécifique et des billes magnétiques couplées à la protéine G, suivi d'une révélation en western blot.

a. Immunoprécipitation

Pour réaliser les immunoprécipitations, j'utilise le kit Life Technologies Dynabeads Protein G (ref 10007D). Cette technologie utilise les propriétés des aimants. Les billes aimantées, couplées à la protéine G, vont ainsi être attirées par l'aimant ce qui va permettre d'éliminer facilement le liquide dans lequel elles se trouvent.

La première étape consiste à lier mon anticorps (10µg dans 200µl de PBS) aux billes magnétiques couplées à la protéine G et mon échantillon la nuit à 4°C en agitation lente. A la fin de l'incubation, je récupère le surnageant déplété en protéine cible afin de tester l'activité d'agrégation sur des cultures de neurones purifiés. Le complexe Bm-pG-Ac-échantillon est ensuite lavé trois fois avec le Wash Buffer fourni par le kit et une élution est réalisée pour détacher la protéine cible du couple Bm-pG-Ac. Cet éluât ainsi que le surnageant déplété sont également analysés par western blot pour vérifier l'efficacité de l'immunoprécipitation.

b. Western Blot

Le western blot est une technique permettant, après séparation sur gel de polyacrylamide, de transférer sur une membrane, une protéine d'intérêt avec un Ac spécifique (Towbin et al., 1979).

i. Préparation des échantillons

La première étape consiste donc à préparer les échantillons pour les déposer sur un gel de polyacrylamide. Cela consiste à linéariser les protéines par rupture des ponts disulfures en chauffant les échantillons, 5min à 95°C, en présence d'agents réducteurs (10X, life technologies, ref NP 0004), ainsi que d'un tampon (4X, life technologies, ref NP0007) qui servira à charger les protéines négativement et à déposer les échantillons sur le gel pour la migration.

ii. Migration et transfert

La migration permet de séparer les protéines toutes chargées négativement en fonction de leur poids moléculaire. Pour cela, je dépose 25µl de chaque échantillon sur un gel de polyacrylamide (4-12% bis-Tris, Life technologie, ref NP0322). Cette migration est réalisée dans une cuve contenant un tampon (MOPS SDS running Buffer 20X, life technologies, ref NP0001) qui maintiendra la charge négative des protéines et par application d'un champ électrique, 100V pendant 2h30.

L'étape suivante consiste à transférer les protéines du gel sur une membrane de PVDF (Life technologies, ref IB24002) ou de nitrocellulose (en fonction de la protéine étudiée). Le transfert s'effectue dans un tampon (20X, Life technologies, ref NP0006) complété avec 10% de méthanol ou dans un tampon Tris-Glycine (30g Tris, 144g Glycine, qsp 1L d'eau pure ; tampon 10X) et par application d'un champ électrique, 100V pendant 1h30 (figure 11). La membrane de PVDF doit être préalablement activée par un bain de méthanol (30sec), suivi d'un bain de 10min dans le tampon de transfert.



Figure 11 : Principe du transfert des protéines sur membrane

Après cette étape, je contrôle l'efficacité du transfert par une coloration de la membrane au rouge ponceau (0,2g, 0,3ml TCA, qsp 100ml eau pure) pendant 5 minutes. Toutes les protéines présentes dans la membrane seront colorées en rouge de manière non spécifique. Le gel est coloré par une solution bleue (SimplyBlue SafeStain, Invitrogen, ref LC6060) et permet de colorer les protéines résiduelles, donc de contrôler la qualité du transfert.

iii. Incubation des Anticorps

Avant de pouvoir incuber la membrane avec un Ac spécifique, je dois saturer la membrane en protéines afin de bloquer les sites susceptibles de fixer non spécifiquement les Ac. Pour cela, j'incube la membrane dans une solution de blocage (PBS 1X, 0,1% Tween-20, 5% lait non gras) pendant 1h minimum avec agitation. L'incubation de l'Ac spécifique s'effectue ensuite dans la solution de blocage et incubée toute une nuit à 4°C avec agitation.

Après cette incubation, j'effectue plusieurs lavages de la membrane avec une solution de PBS 1X - 0,1% Tween 20 afin d'éliminer les Ac fixés de manière non spécifique. La membrane est ensuite incubée avec un Ac secondaire spécifique de l'espèce du premier Ac, couplé à une molécule HRP (Horse Radish Peroxydase), pendant 1h en agitation à l'abri de la lumière. Cette incubation est suivie de plusieurs lavages avec une solution PBS 1X - 0,1% Tween 20 avant la détection de la protéine.

iv. Electro-ChimioLuminescence (ECL)

La dernière étape consiste à imprimer la chimioluminescence produite par la molécule HRP sur un film autoradiographique (Hyperfilm ECL, Amersham, ref 28906837), après une réaction enzymatique d'électro chimioluminescence (ECL Prime, Amersham, ref RPN2232).

Cette réaction d'ECL s'effectue en mélangeant deux produits fournis par le kit et en incubant pendant 5min la membrane dessus. Le luminol va être oxydée par la réaction et émettre une luminescence. Cette lumière va être spécifique aux endroits où les Ac ont été fixés et va être imprimée sur le film à autoradiographie (figure 12).

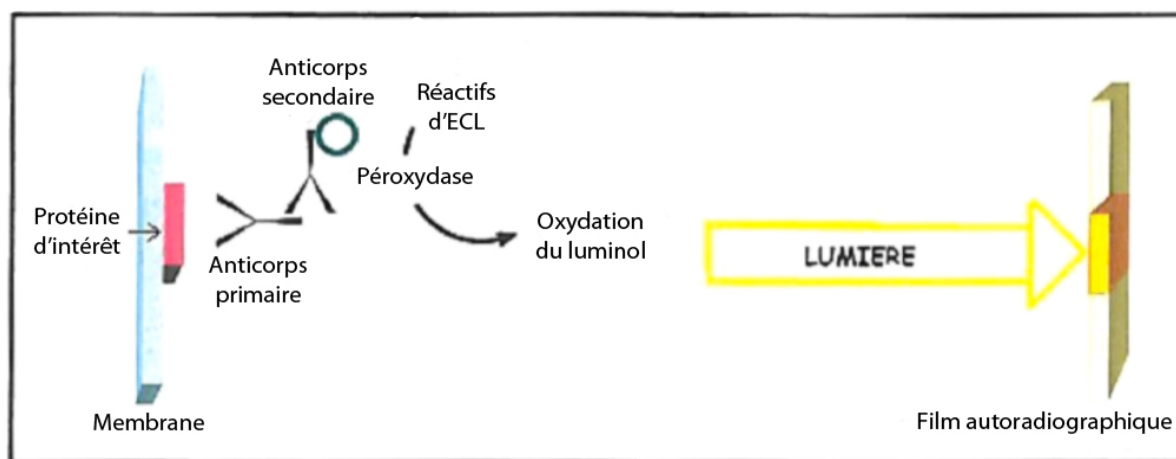


Figure 12 : Schéma de principe de l'ECL

Résultats

1. Chronologie d'apparition des nœuds de Ranvier sur les neurones hippocampaux

a. Neurones d'hippocampe en culture

Afin de déterminer la chronologie d'assemblage des nœuds, nous avons utilisé des cultures primaires de neurones d'hippocampe mixtes, c.a.d. qui contiennent également des cellules gliales (astrocytes et oligodendrocytes). Ces cultures sont constituées de neurones pyramidaux glutamatergiques exprimant la Ca^{2+} /calmoduline-dépendante protéine kinase II (CaMKII^+) ($75\% \pm 5\%$ des neurones), et d'interneurones caractérisés par la production du neurotransmetteur g-aminobutyric acid (GABA) et identifiés par l'expression de l'isoforme de 67-kDa de la glutamate décarboxylase (GAD67^+) ($24.5\% \pm 3.9\%$ des neurones). Après immunomarquage des cellules à Div17, on visualise sur l'ensemble des neurones une accumulation des canaux Na_v colocalisés avec la Nfasc et l'AnkG au niveau du segment axonal initial (AIS) (figure 13). De plus, le long des axones des neurones GABAergiques, on visualise des clusters de molécules nodales colocalisées (Na_v , Nfasc et AnkG), qui sont espacés de façon régulière (figure 13a, 13c, 13d, 13e). Cette agrégation est observée en l'absence de myéline, comme indiqué par l'immunomarquage de la protéine PLP qui est négatif (figure 13a, 13c, 13d). Ces structures formées avant la myélinisation ont donc été appelées des « pré-nœuds ». En revanche, on n'observe pas de pré-nœuds le long des axones des neurones pyramidaux mais une expression diffuse et faible des canaux Na_v , de la Nfasc et de l'AnkG (figure 13b).

Le pourcentage d'axones hippocampaux (identifiés par la présence d'un AIS) avec des pré-nœuds parmi l'ensemble des axones augmente en fonction du temps de culture de $4.1\% \pm 3.1\%$ à Div14 à $15.8\% \pm 3.5\%$ et $17.1\% \pm 7.1\%$ à Div17 et 21, respectivement. Nous avons également observé que le nombre de pré-nœuds par axone augmente entre Div14 et 21.

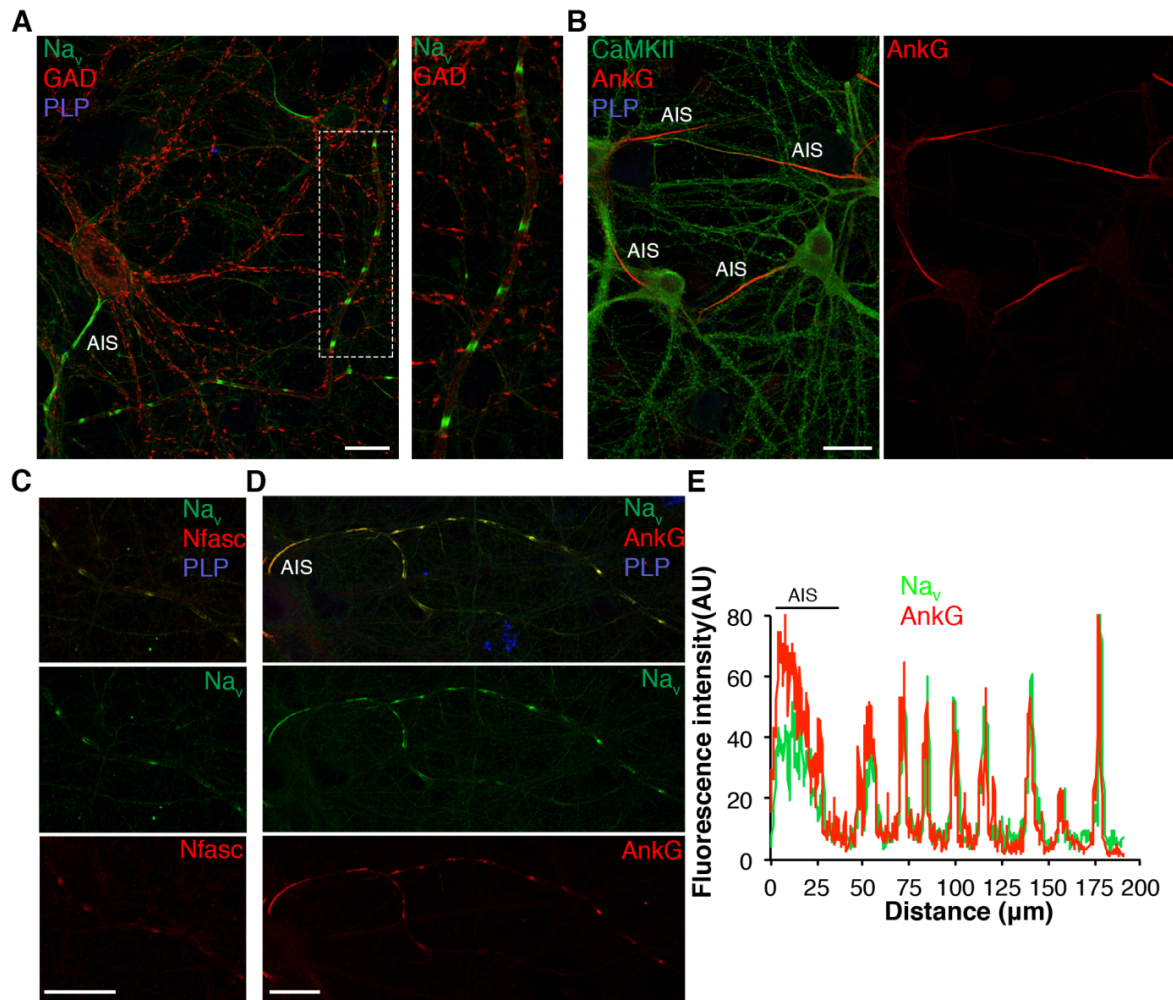


Figure 13 : Les prénœuds sont formés avant la myélinisation sur les neurones GABAergiques hippocampaux en culture. Immunomarquages de cultures mixtes de neurones d'hippocampe à Div17. Les axones sont identifiés par la présence d'un segment initial axonal (AIS) enrichi en AnkG, Na_v et Nfasc. (A) Aggrégats de canaux Na_v (en vert) en l'absence de myéline (PLP⁻; en bleu) le long d'un axone d'un neurone GABAergique (GAD67⁺; en rouge), (B) Contraste avec l'absence de clusters prénodaux (AnkG, en rouge) sur des axones de neurones pyramidaux (CaMKII⁺; en vert). Agrégations de canaux Na_v (en vert) colocalisés avec (C) Nfasc186 (Nfasc) et (D) AnkG (profil d'intensité en E) le long d'un axone non myélinisé (PLP⁻; en bleu). (barre d'échelle: 25 μm).

Le long des axones avec prénœuds, l'expression diffuse de la protéine Caspr indique que les structures paranodales ne sont pas encore formées à Div17 (figure 14a). En revanche, des immunomarquages sur des cultures maintenues de Div24 à 28 en présence de milieu favorisant le processus de myélinisation, permettent de mettre en évidence des clusters de canaux Na_v, encadrés par des clusters de molécules Caspr, formant soit des hémicœuds, soit des nœuds à l'extrémité de segments myélinisés (PLP⁺) (figure 14b). La myéline est observée sur des axones GABAergiques et pyramidaux, mais contrairement aux neurones

GABAergiques, l'agrégation des molécules nodales sur les axones pyramidaux est observé de manière concomitante au dépôt de myéline.

b. Neurones d'hippocampe au cours du développement *in vivo*

Nous avons recherché la présence de préncœuds *in vivo* sur des neurones GABAergiques en réalisant des immunomarquages sur des coupes de cerveau de rats « vesicular GABA transporter (VGAT)-venus » et de souris knockin GAD67-GFP. Nous avons dans un premier temps montré que chez la souris et le rat adultes, des neurones GABAergiques (GFP⁺) sont myélinisés (figure 15a, b), comme cela avait été précédemment rapporté (Jinno et al., 2007; Meier et al., 2004).

Nous avons ensuite évalué la présence de préncœuds à différents stades développementaux, avant et au tout début de la myélinisation de la région hippocampique. Nous avons pu observer sur quelques axones GABAergiques non myélinisés des clusters de canaux Na_v et AnkG à P12 et P13 (figure 15c, d, e). Ces clusters sont formés sans accumulation de la protéine Caspr, donc en l'absence de paranœuds. Ces résultats montrent que la formation de préncœuds peut se produire avant la myélinisation *in vivo*.

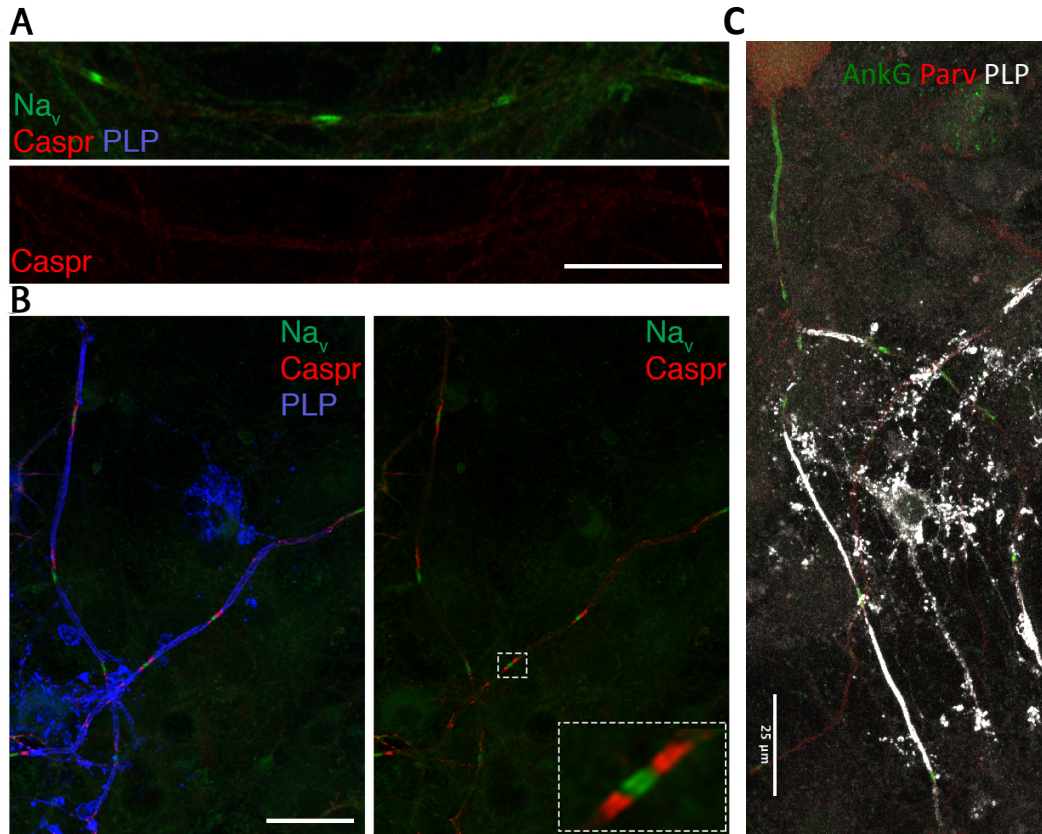


Figure 14 : Les prénœuds sont formés sur des neurones GABAergiques qui peuvent être myélinisés. (A) Immunomarquages de cultures mixtes de neurones d'hippocampe à Div17. Les agrégats de canaux Na_v sont observés en absence d'agrégation de Caspr (en rouge) et en l'absence de myéline (PLP⁺; en bleu). (B-C) Immunomarquages de cultures mixtes de neurones d'hippocampe à Div24. (B) On observe des axones myélinisés (PLP⁺; en bleu) avec des nœuds (Na_v, en vert) et des paranœuds (Caspr, en rouge). Le zoom d'un nœud de Ranvier mature encadré par des paranœuds est montré. (C) On observe un neurone GABAergique (Parvalbumine, (Parv)⁺, en rouge) myélinisé (PLP⁺, en blanc) avec un AIS et des nœuds de Ranvier (AnkG⁺, en vert). On peut visualiser le soma d'un oligodendrocyte myélinisant au centre (PLP⁺) (barre d'échelle : 25 μm).

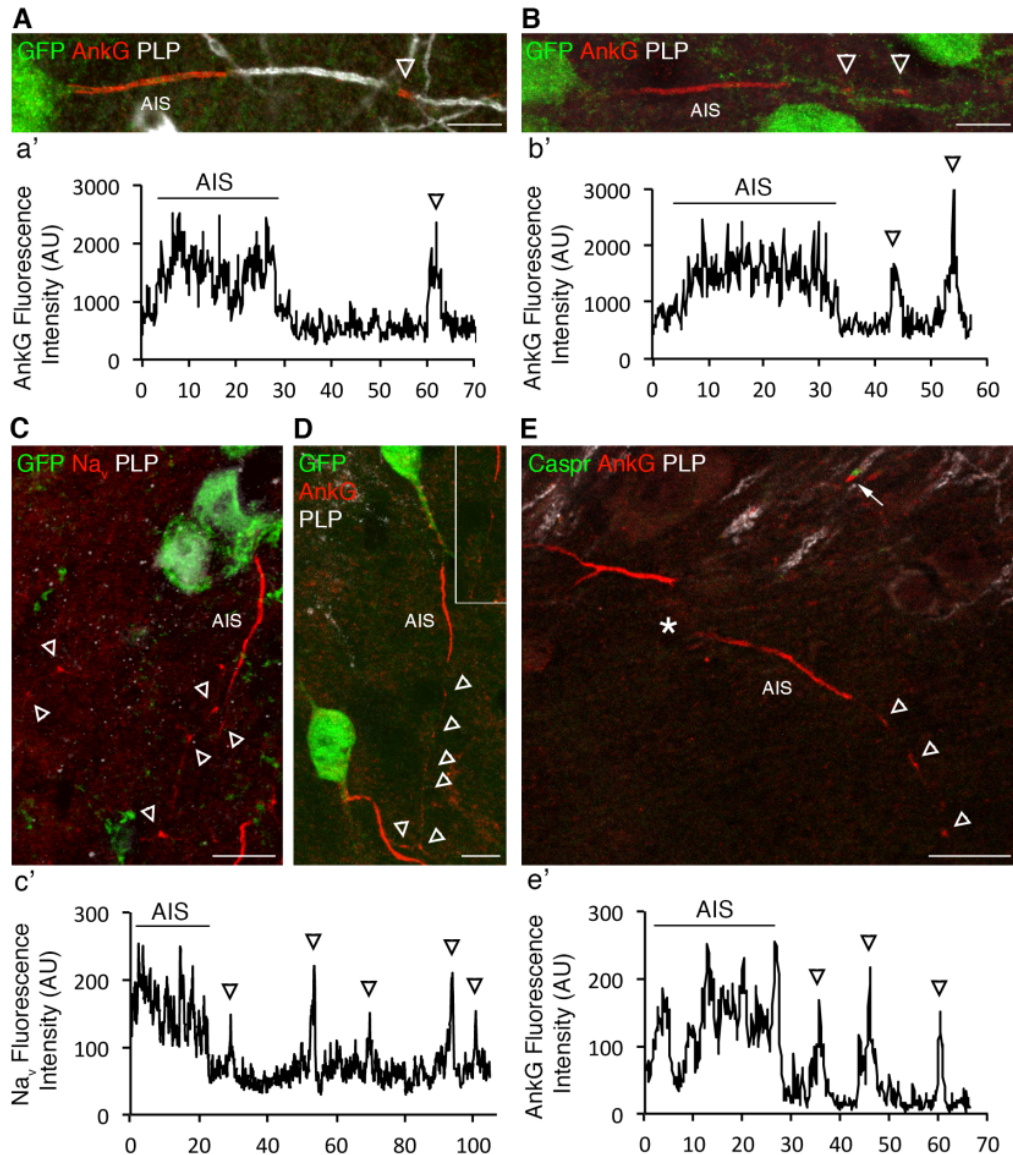


Figure 15: Les prénœuds sont détectés *in vivo* durant le développement post-natal chez la souris et le rat. (A-B) Les immunomarquages de coupes sagittales d'hippocampe de rat VGAT-venus à P13 montrent la présence d'AnkG nodale (en rouge) sur l'axone myélinisé (PLP⁺, en blanc) d'un neurone GABAergique (GFP⁺, vert) sur l'image A. Des clusters d'AnkG (en rouge) sont observés en l'absence de myéline (PLP⁻) le long de l'axone d'un neurone GABAergique (GFP⁺, en vert) sur l'image B. (barre d'échelle: 10 μ m). Les profils d'intensité correspondent à l'expression de l'AnkG dans les fibres (A') myélinisée et (B') non-myélinisée. Les flèches indiquent les agrégats axonaux d'AnkG. (C-D) Les immunomarquages de coupes sagittales d'hippocampe de souris GAD-GFP à P12 montrent la présence d'agrégats de (C) canaux Nav et (D) AnkG (en rouge) (flèches) en l'absence de myéline (PLP⁻) sur des axones de neurones GABAergiques (GFP⁺, en vert) (barre d'échelle: 10 μ m). (E) L'immun marquage d'hippocampe de souris GAD-GFP à P12 montre que Caspr (en vert) n'est pas agrégé autour des prénœuds (AnkG⁺, en rouge) avant la myélinisation (flèches). Par contre, sur la même image, Caspr est agrégé et borde un nœud (flèche) en présence de myéline (PLP⁺, en blanc). *Corps cellulaire (barre d'échelle : 20 μ m). (C' et E') Profils d'intensité correspondant au (C) marquage Nav et (D) AnkG montrant des pics d'intensité correspondant aux prénœuds (flèches).

2. L'assemblage de prénoeuds est induit par des signaux oligodendrogliaux

a. Effet du milieu conditionné d'oligodendrocytes (MCO)

Afin de caractériser le rôle des cellules gliales dans la formation des prénoeuds, nous avons utilisé des cultures de neurones purifiés, obtenues par ajout d'un traitement anti-mitotique, empêchant la multiplication des cellules gliales (absence d'oligodendrocytes et moins de 5% d'astrocytes). Les cellules gliales ont été obtenues à partir de cortex de rats P2 et mises en culture (cf matériel/méthodes p25). Les oligodendrocytes sont cultivés en milieu Bottenstein-Sato avec PDGF pendant 48h pour permettre leur prolifération, puis le milieu est remplacé et les cellules sont incubées 48h avec un milieu utilisé pour les cultures de neurones afin de produire le milieu conditionné d'oligodendrocytes (MCO). Son activité est testée sur des cultures de neurones purifiés. Nous avons constaté que dans les cultures de neurones purifiés fixées à Div21 l'AIS est formé (figure 16a) mais il y a très peu d'axones avec prénoeuds, soit $1,1\pm 0,7\%$ des axones totaux. En revanche, en ajoutant du MCO sur les cultures de neurones purifiés, on visualise une formation des prénoeuds sur $11,9\pm 3,9\%$ des axones totaux (figure 16b, c, d). Comme dans les cultures mixtes, les prénoeuds sont restreints aux neurones GABAergiques (figure 16c) et sont présents sur $45\pm 5\%$ des neurones GAD67⁺. Ces résultats montrent qu'un ou plusieurs facteurs oligodendrocytaires sont requis pour former des prénoeuds. Le marquage des neurofilaments phosphorylés le long des axones avec prénoeuds suggère également qu'il faut que les neurones atteignent un certain stade de maturation pour former des prénoeuds (figure 16d).

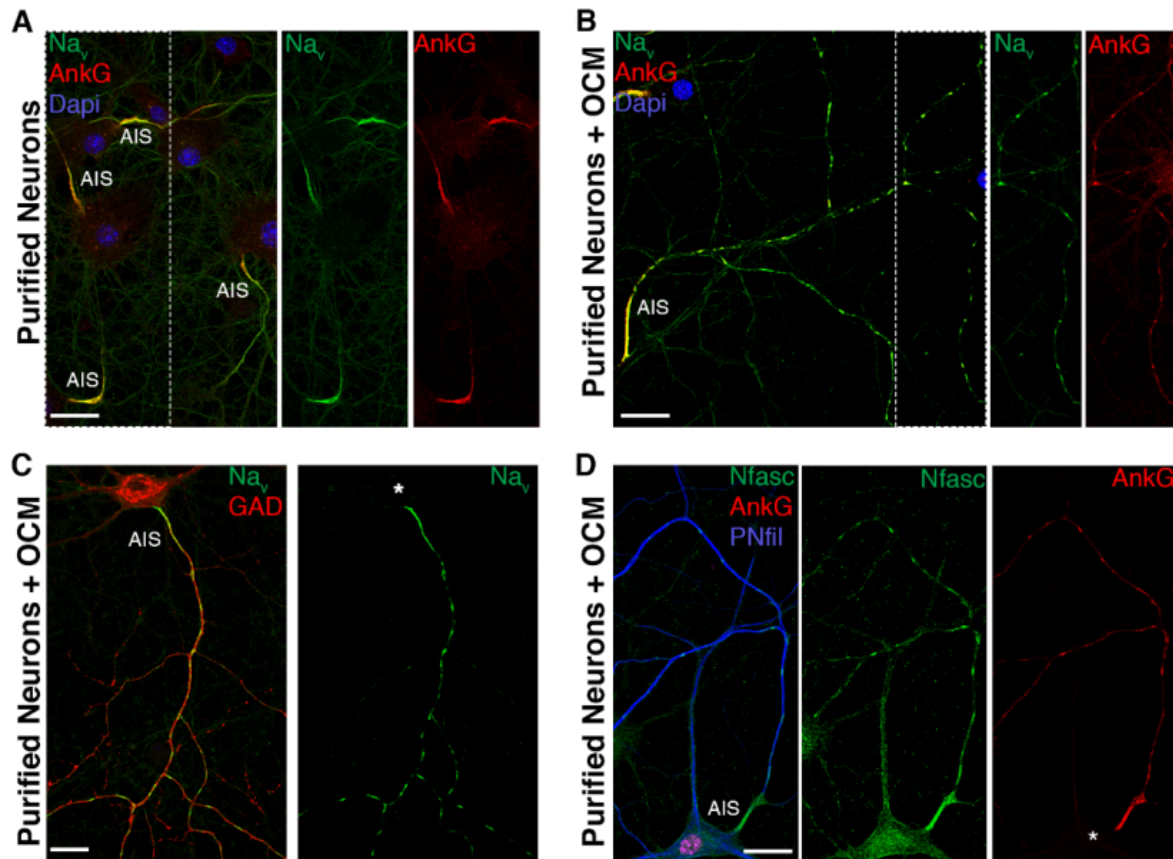


Figure 16 : Un facteur oligodendroglial sécrété promeut l'agrégation des protéines nodales. Immunomarquage de cultures de neurones d'hippocampe purifiés, fixés à 17 Div en (A) absence ou (B-D) présence de MCO. (A-D) L'AIS est détecté dans toutes les conditions, mais (B, D) les agrégats de canaux Na_v (B, en vert), AnkG (en rouge) et Nfasc (D, en vert) sont seulement observés en présence de MCO. (C) Prénœuds (Na_v^+ , en vert) formés sur un neurone GABAergique ($GAD67^+$, en rouge) dans des cultures traitées avec du MCO. (D) Les corps cellulaires et les neurites sont marqués avec un Ac spécifique des neurofilaments phosphorylés (PNfil (Smi31); en bleu) (barre d'échelle ; 25 μm).

b. Phénotype des oligodendrocytes produisant le MCO et activité

Le phénotype des oligodendrocytes produisant le MCO ainsi que la pureté des cultures ont été caractérisés par immunomarquage avec des marqueurs de différenciation oligodendrocytaire (NG2, O4, GalC, PLP), un marqueur d'astrocytes (GFAP) et un autre marqueur pour la microglie (CD11b).

Afin de déterminer si le stade de maturation des oligodendrocytes impacte l'activité du MCO, nous avons cultivé différentes populations d'oligodendrocytes, en traitant les cultures avec des facteurs capable d'inhiber ou promouvoir la différenciation. En ajoutant la rapamycine (10nM ou 100nM) ou en maintenant le PDGF dans les cultures, nous avons obtenus principalement des OPC et

oligodendrocytes immatures (c.a.d. cellules NG2⁺ et NG2⁺GalC⁺ ≥85%, cellules GalC⁺NG2⁻ ≤15%) (figure 17A).

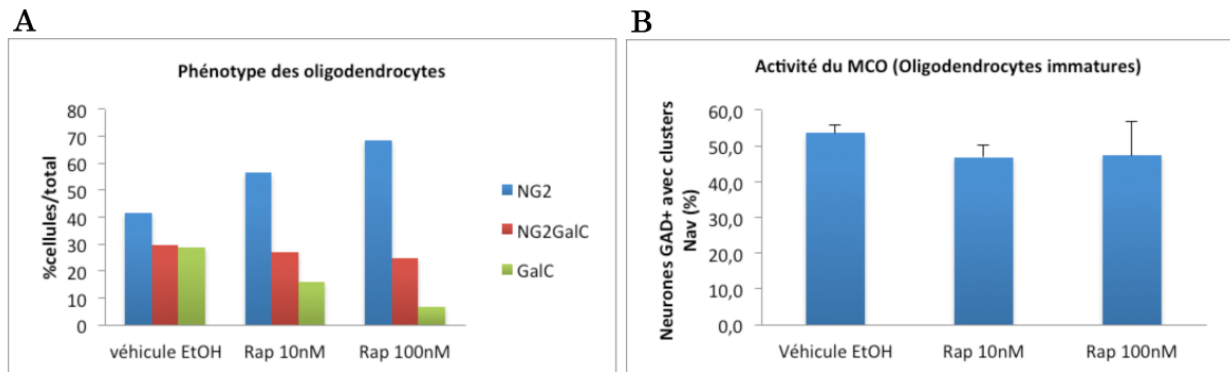


Figure 17 : Détermination des populations d'oligodendrocytes produits (A) Phénotype des oligodendrocytes traités avec la Rapamycine, entre 350 à 500 cellules comptées par condition. (B) Activité des MCOs produits par les oligodendrocytes traités et ajoutés aux neurones purifiés en culture. % de neurones GAD⁺ avec agrégats Nav. Moyenne et écart type pour trois différents MCOs. Véhicule EtOH, traitement contrôle avec le solvant de la rapamycine ; Rap 10nM, traitement des oligodendrocytes avec 10nM de rapamycine ; Rap 100nM, traitement des oligodendrocytes avec 100nM de rapamycine.

A contrario, en ajoutant l'hormone T3 qui favorise la différenciation, le pourcentage d'oligodendrocytes matures GalC⁺ est supérieur, mais il y a toujours une population mixte avec des cellules immatures. Pour obtenir une culture d'oligodendrocytes matures PLP⁺, nous avons effectué un tri au FACS à partir de cerveaux de souris transgéniques PLP-GFP⁺. Nous n'avons pas observé de différence significative dans l'activité des différents MCOs, et en concluons que le(s) facteur(s) pro-agrégants peuvent être produits aussi bien par des oligodendrocytes différenciés qu'immatures (figure 17B). Notons qu'un effet pro-agrégant, néanmoins d'amplitude réduite, est également détecté après addition de milieu conditionné d'astrocytes (ACM) (11.7% ± 2.1% des neurones GAD67⁺).

c. Cinétique d'agrégation des canaux sodium après ajout du MCO à différents temps de culture

Rappelons qu'en culture mixte, les préneûds sont bien détectés à partir de Div15 (30% de neurones GABA avec préneûds), et augmentent de manière significative entre Div15 et Div17 (46% de neurones GABA avec préneûds) (*, p=0,0294), avec un effet plateau à Div21 (52% de neurones GABA avec

préneurons). Afin de caractériser la cinétique d'activité du MCO, j'ai ajouté le milieu conditionné à différents temps de culture des neurones (Div3, 6, 9, 13 et 15) et arrêté les cultures à différents temps (Div15, 17 et 21) (figure 18).

Premièrement, on constate que le nombre de neurones avec préneurons est significativement réduit dans les cultures de neurones purifiés avec MCO en comparaison avec les cultures mixtes au même temps de fixation. En effet, lorsque qu'on ajoute le MCO à Div3 aux neurones purifiés et qu'on fixe à Div15, seuls 15% des neurones ont des préneurons (*, $p=0,0195$), à Div17 30% (*, $p=0,0189$), et à Div21 36% (*, $p=0,0189$). Notons que dans les cultures avec MCO, il y a aussi une augmentation significative de la formation des préneurons entre Div15 et Div17 (*, $p=0,0117$). De plus, le nombre de neurones avec préneurons est équivalent en culture mixte à Div15 à celui en culture avec MCO à Div17. Ces résultats suggèrent qu'un seuil de maturation neuronale pourrait être requis pour former des préneurons. Ce seuil pourrait être retardé pour les neurones purifiés car ils ne reçoivent pas de support trophique astrocytaire.

L'ajout de MCO à Div3 par rapport à Div6 montre une différence significative quand on fixe à Div15 (*, $p=0,0333$), mais donne des résultats comparables quand on fixe Div17 et Div21. En revanche, lorsque le milieu est ajouté à Div9 ou plus tardivement la réduction du nombre de neurones avec préneurons est significative comparée à l'ajout à Div3, à tous les temps de fixation. De plus, lorsqu'on ajoute le MCO très tardivement (Div13 ou 15), le nombre de neurones avec préneurons atteint seulement 12% au maximum à Div21 (soit 3 fois moins que si le MCO est ajouté à Div3).

En conclusion, l'ensemble de ces résultats suggère qu'un temps de maturation neuronale est requis pour la formation des préneurons et que cette maturation pourrait être retardée/altérée en l'absence de MCO. De plus, le MCO ne semble pas induire une agrégation directe des canaux Na_v car un délai est requis pour observer son effet. Nous avons cherché à valider plus clairement ces premières conclusions en utilisant des approches expérimentales complémentaires.

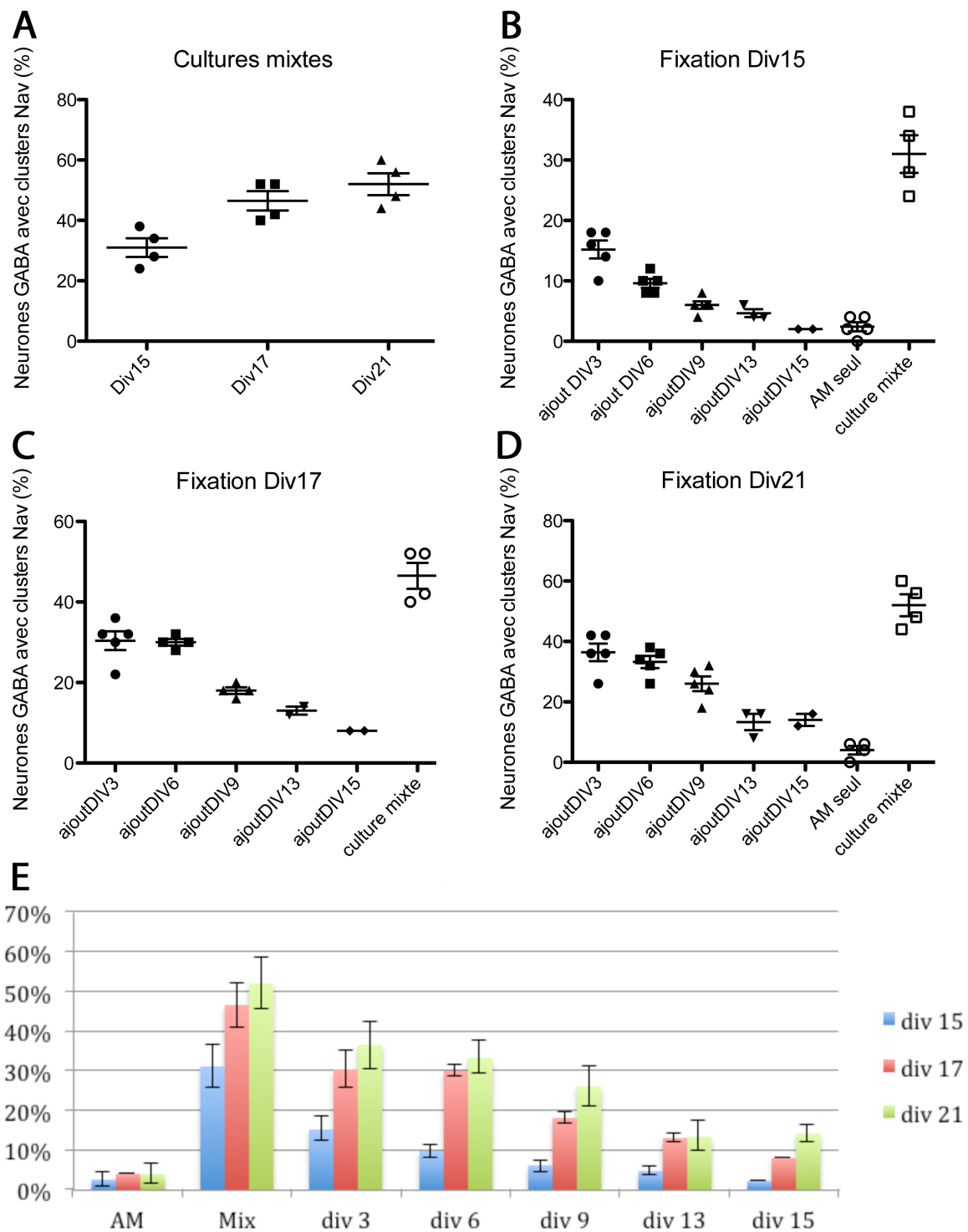


Figure 18 : Cinétique d'ajout du MCO. (A) Fixation des cultures mixtes à différents temps. (B-D) Activité du MCO ajouté sur des cultures de neurones purifiés à différents temps et fixés à différents temps (E) graphe récapitulatif des pourcentages d'activité. Moyenne de 3 expériences indépendantes réalisées en duplicats.

3. Caractérisation des propriétés biochimiques du MCO

- a. Le(s) facteur(s) responsable(s) de l'activité d'agrégation est (sont) de nature protéique.

Ce(s) facteur(s) sécrété par les oligodendrocytes est une protéine car son activité est détruite par un chauffage de 30min à 70°C ou un traitement par la trypsine. Notons que l'activité du MCO est stable jusqu'à au moins 3 mois à 4°C.

- b. Fractionnement

Différentes techniques de fractionnement ont été appliquées pour caractériser les propriétés biochimiques du (des) facteur(s) proagrégeant(s).

J'ai fractionné tout d'abord le MCO par centrifugation sur des filtres séparant les molécules en fonction de leur masse moléculaire (10K, 30K ou 50K, 100K). Nous avons analysé l'activité du milieu concentré au dessus du filtre, et du milieu qui est passé au travers. Ces expériences ont été reproduites par les biochimistes de Vertex qui ont collaboré avec nous pour réaliser l'étude protéomique du MCO.

Nous avons observé que la fraction de MCO contenant les protéines <30kD n'a pas d'activité. Les fractions >50kD ou >100kD ont une activité similaire au MCO non fractionné. Ceci pourrait suggérer que la masse moléculaire de la ou des protéines d'intérêt est >100kD. Notons que la migration sur gel d'acrylamide des différentes fractions indique que la taille observée des protéines ne correspond pas complètement à celle attendue, par exemple après centrifugation sur filtre de 100K, des protéines de 50kD sont retenues. De plus la présence de sérum albumine en quantité importante dans le milieu est visible sur gel (figure 19) et pourrait former des complexes avec d'autres protéines de masse moléculaire plus petites. En raison de l'absence d'activité dans la fraction traversant le filtre 30K, nous avons pu utiliser ce type de filtre pour concentrer le MCO brut ou les fractions en sortie de colonne.

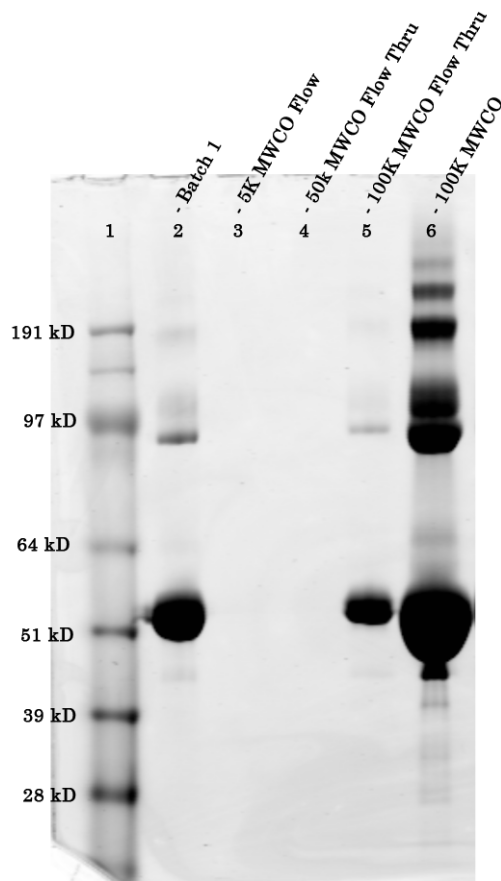


Figure 19 : Visualisation des protéines totales après fractionnement en fonction du poids moléculaire et migration sur gel (1) Marqueur de poids moléculaire (2) Milieu total (3) éluât des protéines inférieures à 5KDa, (4) éluât des protéines inférieures à 50KDa, (5) éluât des protéines inférieures à 100KDa (6) protéines supérieures à 100KDa.

D'autre part, le MCO a été déposé sur différentes résines (échange de cation, échange d'anion, C18RP et HILIC) pour analyser la sortie de colonne. Nous avons observé que le milieu passé au travers d'une colonne d'échange d'anions ou sur C18 RP perdait complètement son activité, et que le milieu passé au travers d'une colonne d'échange de cations ou HILIC présente une réduction de 40 à 50% de son activité. Cela suggère que la (les) protéine(s) sont retenues dans la colonne d'échange d'anions.

Nous avons poursuivi l'étude en étudiant les différentes fractions de MCO éluées de la colonne d'échange d'anions en espérant pouvoir faire un premier enrichissement de la ou des protéines ayant une activité. J'ai produit du MCO en grande quantité (50ml par analyse) et trois séries de fractions m'ont été renvoyées (A1 à 12, B12 à 1, C1 à 5) correspondant à l'ajout successif de trois

tampons d'élution différents pour décrocher les protéines de la colonne, voir le chromatogramme figure 20.

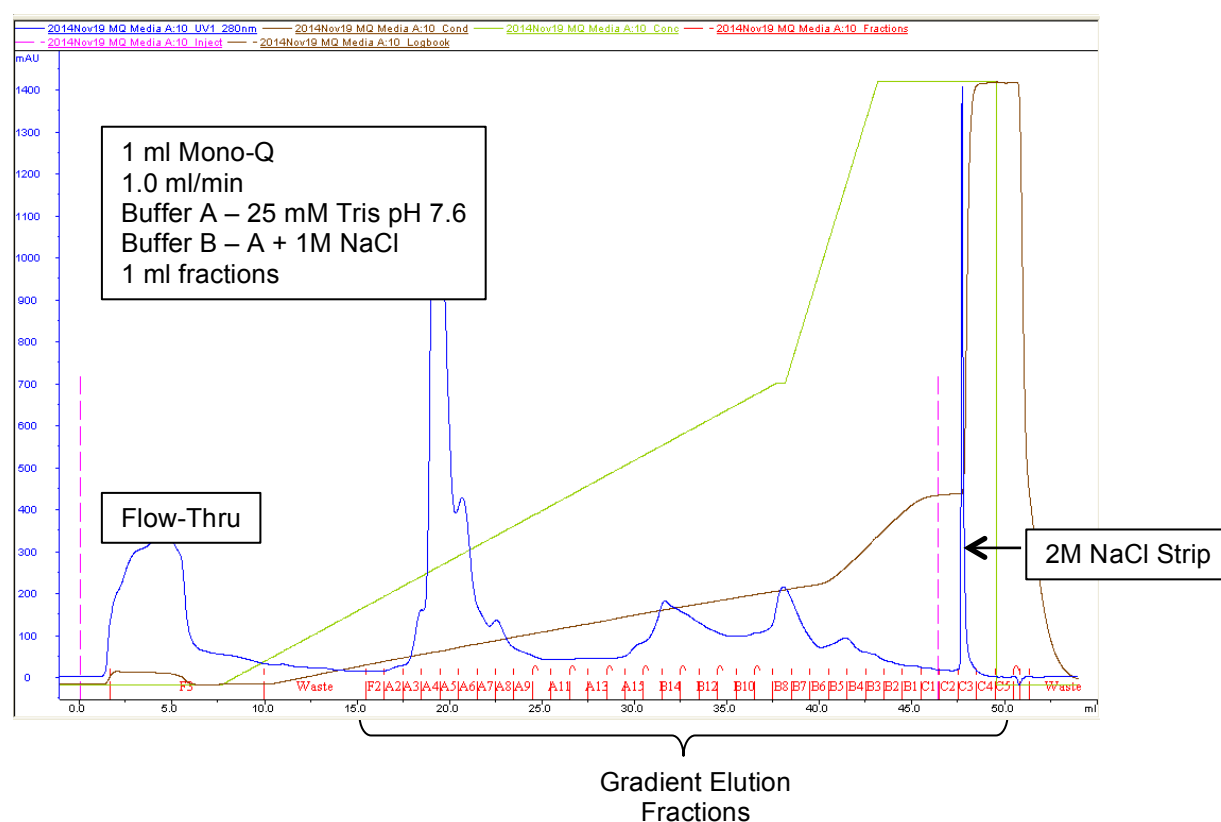


Figure 20 : Chromatogramme de fractionnement du MCO. L'élution de la colonne d'échange se fait à 1ml/min. Chaque fraction correspond à 1min d'élution. La courbe bleu correspond aux pics de protéines détectées par le chromatogramme.

J'ai testé leur activité sur culture de neurones purifiés et identifié des fractions ayant une activité pro-agrégeante des canaux Na_v (figure 21). Sur toutes les expériences les fractions actives sont retrouvées à chaque fois dans la même région du chromatogramme. Notons que l'activité maximale observée dans une fraction active correspond à 70% de l'activité du MCO total. En parallèle, j'ai également testé du milieu contrôle (non conditionné) ayant subi les mêmes étapes de fractionnement pour vérifier que l'enrichissement d'une protéine du milieu de culture ne produit pas une activité agrégeante (figure 21).

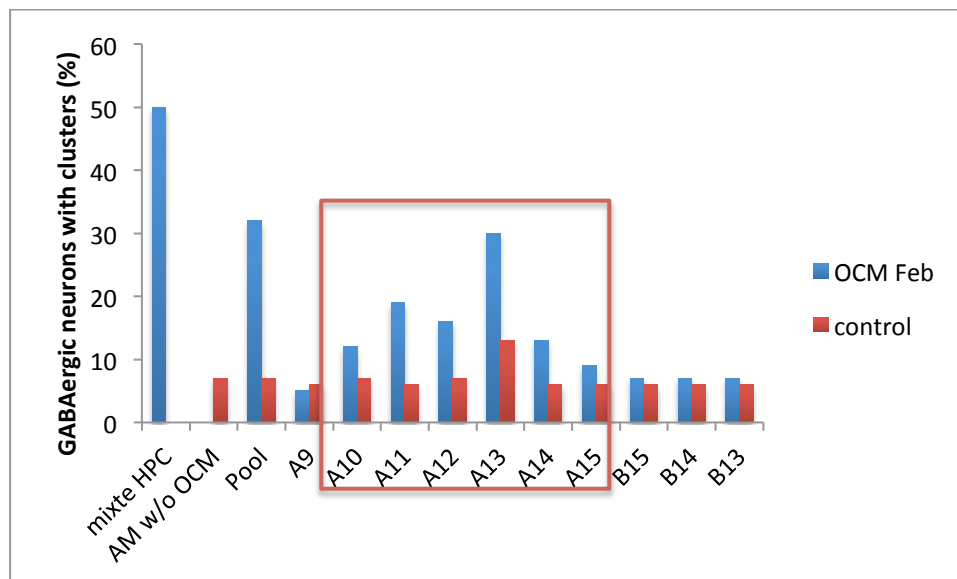


Figure 21 : Activité des différentes fractions ajoutées à des cultures de neurones purifiés à Div3, et révélée par immunomarquage des canaux Na_v après fixation à Div17 (pourcentage de neurones de la population GABA qui forment des préneuds). En bleu (media A) correspondant au MCO fractionné, en rouge (media B) correspondant au milieu contrôle fractionné. Les fractions A10 à 15 (cadre rouge) ont été analysées en spectrométrie de masse.

c. Exosomes

J'ai également testé si l'activité pouvait être associée à des vésicules sécrétées de type exosomes. Pour cela, le MCO a été ultracentrifugé (UC) 1h à 20000 tours/min ce qui permet de culoter des particules de taille ≥ 100 nm. Nous avons testé l'activité du MCO avant UC, du surnageant post-UC et du culot repris dans 500 μ l de milieu neurobasal. Nous n'avons pas observé d'activité dans le culot alors que le MCO et le surnageant post-UC avait une activité. Nous en concluons que l'activité n'est probablement pas liée à des exosomes.

4. Analyse protéomique

Afin d'identifier des protéines potentiellement pro-agrégantes dans le MCO, nous avons poursuivi ce projet par une approche protéomique.

Dans un premier temps, pour ne pas masquer des protéines en faible quantité, nous avons produit du MCO en remplaçant le supplément B27 par du N2 dilué au 1/300^e qui contient moins de facteurs additifs et pas de BSA (cf matériel et

méthode) et nous avons vérifié l'activité du MCO. Puis, deux approches ont été utilisées par les biochimistes de Vertex. Dans les deux cas, j'ai produit les milieux conditionnés et vérifié leur activité.

a. Analyse protéomique des fractions actives du MCO

La première approche est basée sur l'analyse des protéines contenues dans les fractions actives éluées de la colonne d'échange d'anions. Les fractions actives de MCO ont été rassemblées (2 expériences) ou traitées individuellement (une expérience) ; une digestion par la trypsine a été faite pour l'analyse en spectrométrie de masse (LC-mass spec) afin de générer des listes de protéines. Les analyses de trois différents MCO ont été faites.

b. Analyse protéomique du MCO par QuaNCAT

La deuxième approche est basée sur la technique QuanTCAT qui permet de visualiser l'enrichissement différentiel de protéines néo-synthétisées dans le MCO et un milieu contrôle (c.a.d. avec une activité pro-agrégeante réduite), (Eichelbaum et al., 2012). J'ai préparé du MCO et des milieux contrôle en incubant les oligodendrocytes et les astrocytes ou neurones purifiés avec du milieu neurobasal sans méthionine, arginine, lysine auquel j'ai ajouté la L-azidohomoalanine (AHA) remplaçant la méthionine et l'arginine et la lysine couplées avec différents isotopes (cf matériel et méthodes p32). J'ai déterminé les concentrations optimales pour préserver la viabilité cellulaire ainsi que l'activité des milieux, le milieu conditionné d'astrocyte (MCA) et le milieu conditionné de neurones (MCN), montrant respectivement 10 à 14% et 6% de neurones GABAergiques avec préneûds, comparé à 34% détecté dans le MCO.

Après digestion par la trypsine, l'analyse des peptides par spectrométrie de masse (LC/MS/MS) a été réalisée par Vertex.

Ainsi, nous avons obtenu des listes de protéines enrichies dans le MCO par rapport à un milieu à très faible activité agrégante.

c. Différents critères d'analyse

L'ensemble des séquences peptidiques permet d'établir une liste de protéines (access number Uniprot) et différents critères sont appliqués pour l'analyse quantitative, afin d'indiquer la fiabilité du résultat et l'abondance de la protéine. Les différents paramètres dont nous disposons pour chaque protéine sont, la portion de séquence couverte par tous les peptides identifiés pour une même protéine (Σ Coverage), le nombre de peptides différents identifiés rattachés à l'identification d'une même protéine ($\Sigma\#$ Unique Peptides), le nombre total de peptides identifiés ($\Sigma\#$ Peptides), et leur abondance (Peptide Spectral Match, $\Sigma\#$ PSMs). Plus le nombre de peptides identifiés est élevé, plus l'identification de la protéine est robuste. Nous avons éliminé toutes les protéines pour lesquels un seul peptide a été identifié car la probabilité de faux positif est forte dans ce cas. Un filtre a également été utilisé pour enlever toutes les protéines potentiellement contaminantes à partir d'une base de données des contaminants (résidus de sérum bovin).

d. Résultats obtenus pour les fractions actives

Environ trois cents protéines ont été identifiées dans les deux séries de fractions actives (2 expériences). La moitié des protéines sont communes aux deux séries. La troisième analyse a été faite sur 6 fractions individuellement, on peut ainsi comparer une fraction avec le maximum d'activité (fraction 13) à une fraction avec très peu d'activité (fraction 15) (figure 21). Sur la figure 22, le nombre de protéines dans chaque fraction ainsi que les intersections entre les différentes fractions sont représentés.

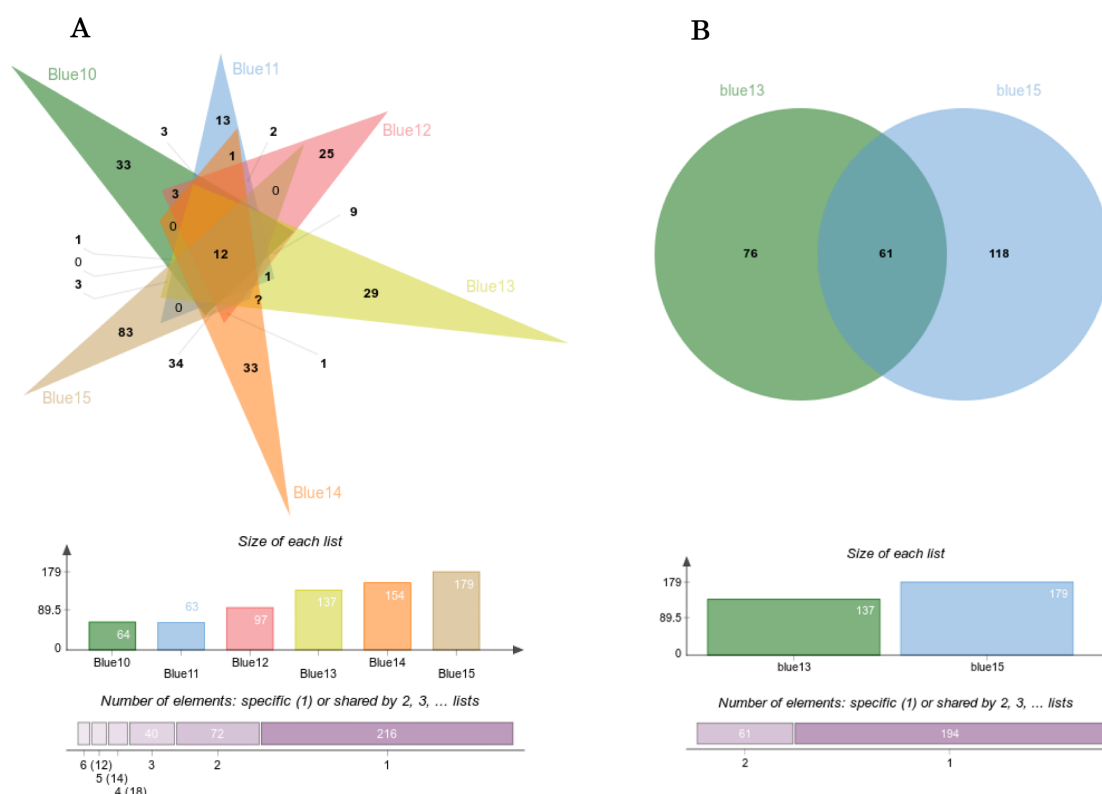


Figure 22 : Représentation schématique des intersections des protéines (A) des différentes fractions analysées et (B) de la fraction 13 (la plus active) et 15 (non active).

e. Résultats de la comparaison MCO/MCA et MCN

La comparaison d'un MCO actif avec un MCO inactif aurait été souhaitable pour limiter les différences et permettre une sélection d'un nombre restreint de candidats. Cela n'a pas été possible car les oligodendrocytes à différents stades de différenciation produisent tous un MCO avec une activité. Nous avons donc comparé le MCO avec du milieu conditionné d'astrocytes ou de neurones (neurones GABAergic avec clusters : MCO - ~33%, MCA - ~12%, MCN - ~6%). Trois couples MCO/MCA et deux couples MCO/MCN ont été analysés. Environ mille protéines ont été identifiées pour chaque comparaison. Le but est d'identifier des changements spécifiques communs aux différentes analyses comparatives.

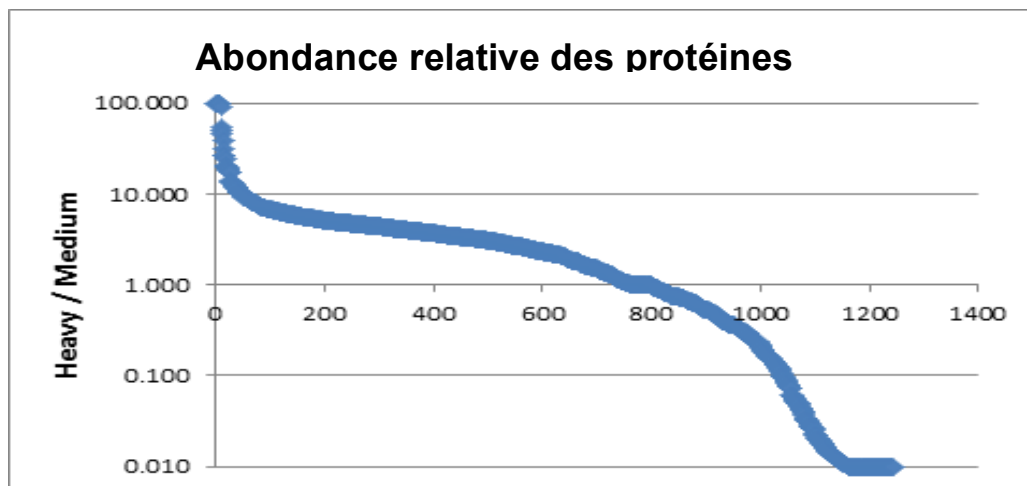


Figure 23 : Graphique représentant l'abondance des protéines dans le MCO(heavy) par rapport au MCA(medium).

Une analyse quantitative d'un batch MCO (heavy)/MCA (medium) est présentée figure 23. Parmi les 1078 protéines identifiées, 571 sont au moins 2 fois plus abondantes dans le MCO et 281 sont au moins deux fois plus abondantes dans le MCA. On constate qu'il y a beaucoup de différences entre ces deux milieux ce qui rend difficile une sélection de candidats sur le seul critère d'abondance.

De plus, nous avons observé encore plus de différences entre MCO et MCN.

5. Sélection de protéines candidates et Validation

a. Choix des candidats

A partir de ces différentes analyses protéomiques, nous avons retenu trois candidats : la contactine-1, la tenascine R et le phosphacan car ces protéines sont exprimées au niveau des nœuds de Ranvier dans le SNC. Leur présence dans les différentes analyses est récapitulée figure 24.

1) Analyse des fractions du MCO : a) analyse du pool des fractions active du MCO-nov. b) analyse du pool des fractions actives du MCO-déc. c) analyse des fractions individuelles du MCO-mars					
		<u>Σ coverage</u>	<u>Σ # Uniques Peptides</u>	<u>Σ # Peptides</u>	<u>Σ # PSM</u>
Contactin-1	Pool OCM-nov	9	5	5	16
	OCM-mars A13	11,56	6	6	26
Phosphacan	Pools	0	0	0	0
	OCM-mars A13	0,62	1	1	4

2) Analyse par la méthode <u>QuaNCAT</u>															
	<u>Σ # Uniques Peptides</u>					<u>Σ # PSM</u>					<u>Rapport Heavy/Inter</u>				
	OCM- ACM Batch1	OCM- ACM Batch2	OCM- ACM Batch3	OCM- NCM Batch1	OCM- NCM Batch2	OCM- ACM Batch1	OCM- ACM Batch2	OCM- ACM Batch3	OCM- NCM Batch1	OCM- NCM Batch2	OCM- ACM Batch1	OCM- ACM Batch2	OCM- ACM Batch3	OCM- NCM Batch1	OCM- NCM Batch2
Contactin-1	22	20	8	19	16	171	126	41	133	74	1,3	1,1	0,8	11,9	11
Tenascin-R	24	19	nt	25	27	198	81	nt	196	125	1,2	2,7	nt	100	100
Phosphacan	18	13	14	15	18	270	148	116	247	301	1,6	0,6	0,2	21,7	51,2

Figure 24 : Indice de présence des protéines candidates dans les différents milieux analysés. 1) Analyse faite sur les fractions actives. Σ coverage : pourcentage de la séquence protéique identifié ; Σ # Uniques peptides : nombres de peptides uniques identifiés pour la protéine ; Σ # Peptides : nombres de peptides totaux identifiés ; Σ # PSM : indicateur d'abondance de la protéine. 2) Analyse des milieux pour le QuaNCAT.

b. Vérification de l'expression – western blot et immunoprécipitation

Nous avons vérifié la présence de ces protéines candidates dans le MCO par western blot. Nous avons tout d'abord recherché la présence de contactine. Nous avons observé une bande de la taille attendue dans le lysat d'oligodendrocytes mais un signal très faible dans le milieu conditionné. Nous avons fait également une immunoprécipitation du MCO avec des Ac anti-Contactine et dans ce cas avons observé un signal de forte intensité (figure 25). Nous avons ainsi obtenu un MCO déplété de la contactine dont nous avons testé l'activité. L'analyse de la tenascinR et du phosphacan est en cours.

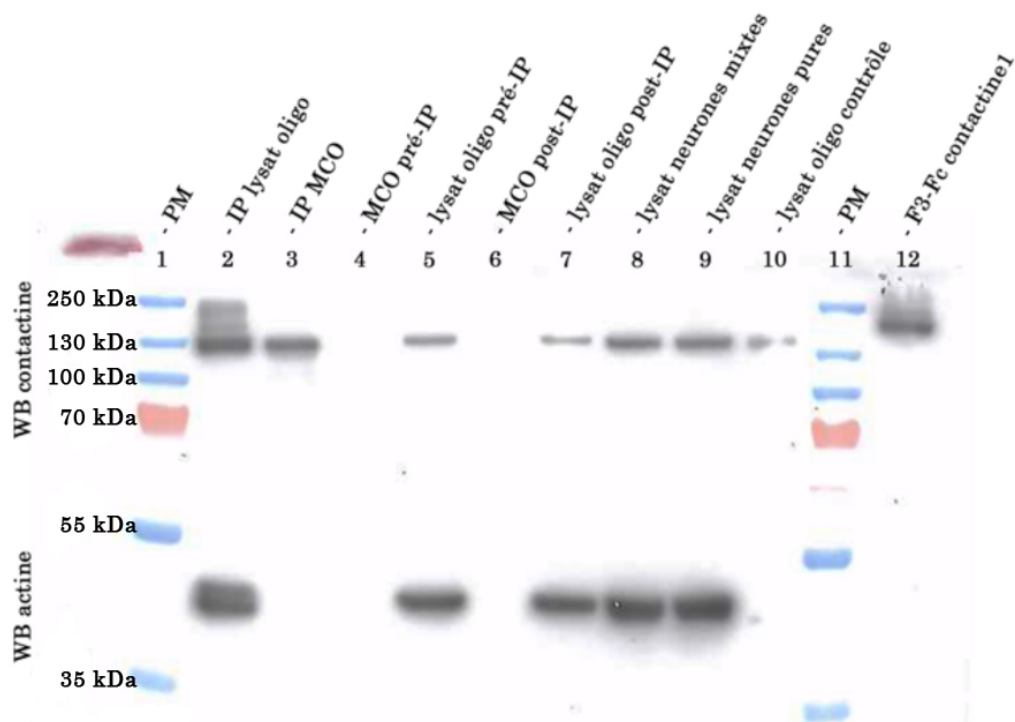


Figure 25 : Western Blot après immunoprécipitation de la contactine1. Révélation de la contactine1 et de l'actine. (1 et 11) marqueurs de poids moléculaires, (2) IP d'un lysat d'oligodendrocytes, (3) IP d'un MCO, (4) MCO avant IP, (5) lysat d'oligodendrocytes avant IP, (6) MCO après IP, (7) lysat d'oligodendrocytes après IP, (8) lysat de neurones mixtes, (9) lysat de neurones purifiés, (10) lysat d'oligodendrocytes contrôle, (12) Contactine-1 recombinante couplée au fragment Fc.

c. Déplétion du MCO par IP

Nous avons obtenu par l'immunoprécipitation un MCO déplété de la contactine dont nous avons testé l'activité sur des neurones purifiés. Nous avons observé 90% d'activité résiduelle dans le MCO post-IP.

d. Inhibition de la sécrétion par des drogues

La contactine est une protéine à ancrage GPI qui est clivée à la surface par une phospholipase C. Pour inhiber ce clivage, nous avons testé l'ajout de deux inhibiteurs : l'édelfosine et le U73122 dans la culture d'oligodendrocytes, puis récolté les MCOs et mesuré leur activité sur les neurones purifiés. On observe une activité de 61% et 69% par rapport au contrôle (figure 26). Une

immunoprécipitation de ces différents milieux doit être réalisée pour visualiser ou non la contactine.

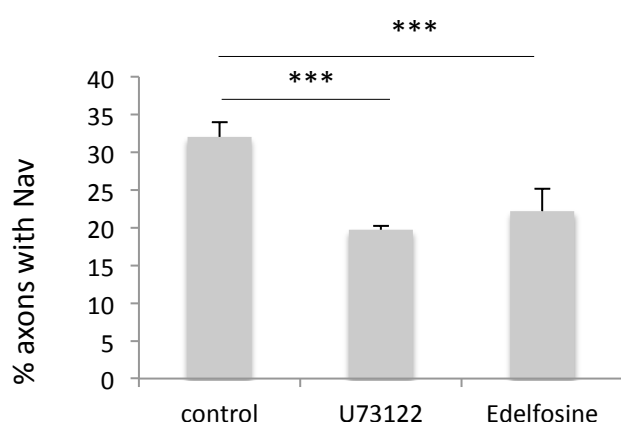


Figure 26 : Quantification de la formation de prénœuds dans des cultures de neurones purifiés après ajout de MCO traité soit par le U73122 (5 μ M) ou par l'Edelfosine (10 μ M).

6. Etude de la régulation de la sécrétion de facteurs pro-agrégants par la signalisation neuronale

Plusieurs travaux ont montré que les OPCs et les oligodendrocytes peuvent être stimulés par des agonistes GABA et glutamatergiques (Butt et al., 2014) ce qui modifie leur capacité de myélinisation. Nous nous sommes demandés si l'activation de ces récepteurs pouvait par ailleurs réguler l'activité pro-agrégante du MCO. Les oligodendrocytes en culture ont donc été traités avec un agoniste des récepteurs GABA A (le muscimol) ainsi que des agonistes glutamatergiques (AMPA et NMDA). Puis, les différents MCOs ont été recueillis et leur activité testée sur des cultures de neurones purifiés.

Les résultats indiquent que le muscimol ajouté aux oligodendrocytes modifie les propriétés du MCO et augmente significativement son activité pro-agrégante (figure 27a). De plus, l'effet des différentes drogues sur la différenciation des oligodendrocytes a été évalué en faisant des immunomarquages NG2, O4 et PLP (figure 27b).

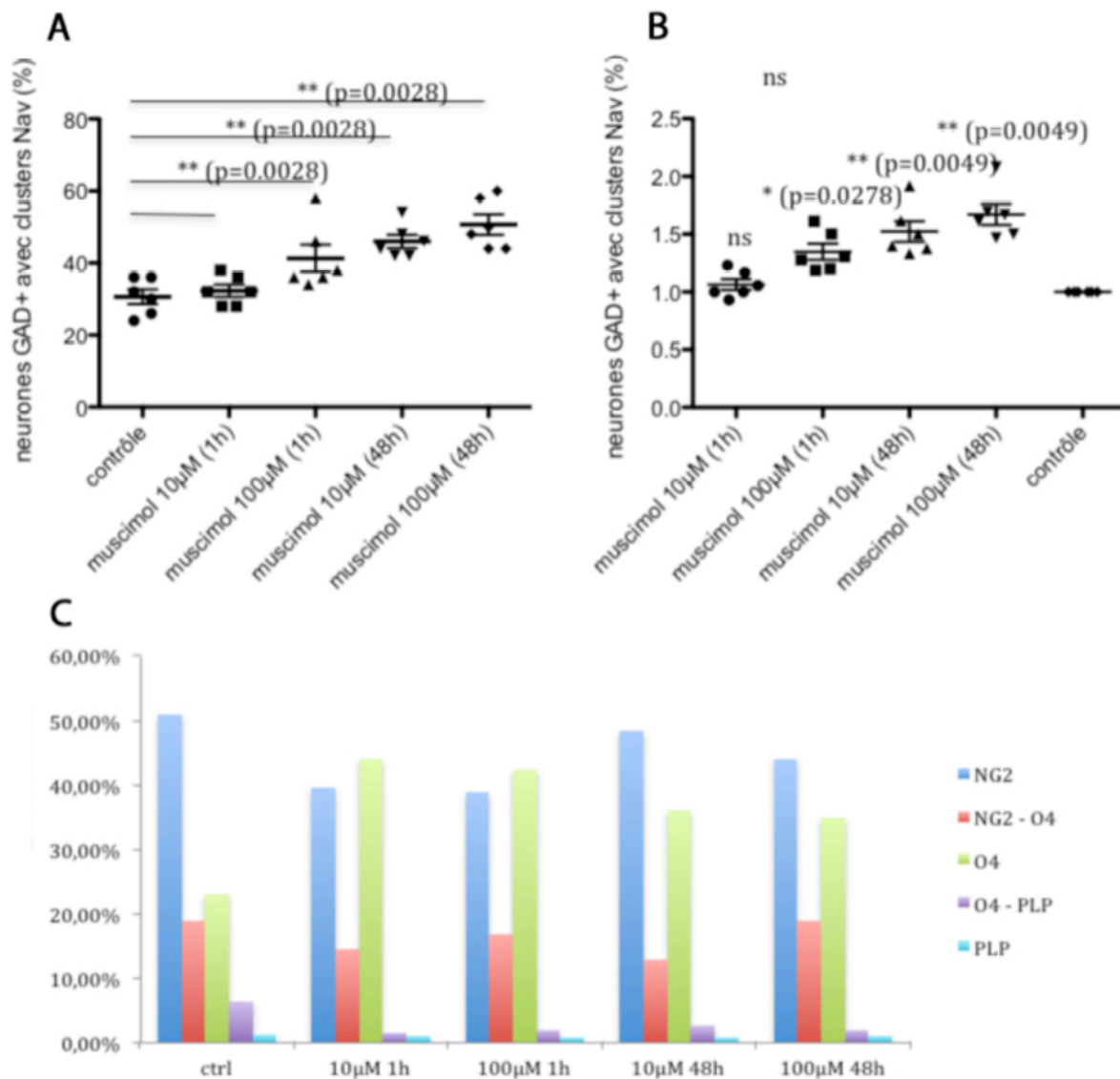


Figure 27 : Quantification de la formation de prénœuds dans une des cultures de neurones purifiés après ajout de MCO traité au muscimol. (A) Pourcentage de neurones GAD67⁺ avec prénœuds dans la population GAD67⁺. (B) Quantification de l'augmentation de la formation de prénœuds après ajout du MCO traité au muscimol par rapport à l'ajout de MCO seul. (C) Profil de maturation des oligodendrocytes traités au muscimol ayant servi à produire les MCO.

En revanche, l'ajout de NMDA ou AMPA n'a pas entraîné de modifications dans l'activité pro-agrégante.

Discussion

1. Visualisation des prénoeuds *in vitro* et *in vivo* dans les neurones GABAergiques avant la myélinisation

Nous avons pu montrer que des agrégats de canaux Na_v colocalisent avec la Nfasc186 et l'ankyrinG et qu'ils sont détectés avant la myélinisation le long de l'axone. Ces structures appelées « prénoeuds » sont observées dans la population de neurones GABAergiques *in vitro* mais également au cours du développement *in vivo*. En revanche, dans les neurones pyramidaux qui constituent la majeure partie des neurones de l'hippocampe, l'apparition des agrégats de protéines nodales coïncide avec la myélinisation et la présence des jonctions paranodales. Ces résultats suggèrent que, en fonction du sous-type neuronal, les mécanismes de formation des noeuds de Ranvier pourraient différer et par conséquent, cela met en évidence la diversité des réponses neuronales durant le développement. De façon intéressante, cette restriction de réponse selon le sous-type neuronal a également été observée quand l'agrégation des molécules nodales est induite dans des cultures de neurones purifiés par l'ajout de MCO, appuyant l'hypothèse que seuls les neurones répondant aux signaux solubles oligodendrocytaires sont capables de former des prénoeuds. Cependant, les facteurs sous-tendant la distinction entre les neurones répondant ou ne répondant pas aux signaux d'agrégation ne sont pas connus. Dans ce contexte, il est important de noter que l'induction de l'agrégation des canaux Na_v par un facteur oligodendrocytaire soluble a déjà été montré par Kaplan et al., 1997, 2001 sur des cultures de cellules de ganglions de la rétine, neurones glutamatergiques, suggérant que ce phénomène d'agrégation n'est pas restreint selon le type de neurotransmetteur. Une autre hypothèse serait que cette formation prénodale pourrait avoir une fonction durant le développement pour établir des connections à longues distances. En effet, ces deux types neuronaux avec prénoeuds sont connus pour avoir des longues projections axonales : les ganglions de la rétine projettent de la rétine jusqu'au colliculus supérieur, et nos résultats suggèrent que la plupart des neurones avec prénoeuds projettent, *in vivo*, de la région CA1 de l'hippocampe, vers des zones plus éloignées comme le septum médian, le subiculum ou encore le cortex rétrospectral (Jinno et al., 2007; Melzer et al., 2012; Picardo et al., 2011).

Enfin, ces agrégats de protéines nodales disparaissent-ils ou fusionnent-ils pour former des nœuds de Ranvier matures lorsque les prolongements d'oligodendrocytes contactent les axones, comme cela a été décrit pour les héminœuds (Custer et al., 2003; Vabnick et al., 1996), reste à déterminer. Effectivement, l'augmentation de l'espace entre les agrégats nodaux après la myélinisation des neurones GABAergiques *in vitro* et *in vivo* suggère qu'un réarrangement spatial a lieu (Freeman et al., 2015).

2. Le rôle des molécules nodales pour la mise en place des prénœuds

Dans le SNC, plusieurs mécanismes sont impliqués dans l'assemblage nodal : l'agrégation de la Nfasc186 par l'interaction avec les protéines de la MEC, la restriction de la diffusion grâce aux jonctions paranodales et la stabilisation des molécules nodales par la cytosquelette. De nombreuses études suggèrent que ces trois mécanismes sont alternatifs ou complémentaires pour l'induction de l'assemblage nodal (Chang and Rasband, 2013; Leterrier et al., 2011). Des contacts axogliaux directs à la barrière paranodale pourraient induire l'agrégation des protéines nodales par la restriction de leur diffusion (Rasband et al., 1999; Susuki et al., 2013). Néanmoins, d'autres études indiquent que lorsque l'assemblage paranodal est diminué par l'inactivation des gènes codant les protéines paranodales (Caspr, contactine ou Nfasc155) ou les protéines de la myéline, le temps de développement et le nombre de nœuds semble normal, suggérant que la formation des jonctions paranodales peut être suffisante mais non nécessaire pour l'assemblage nodal (Bhat et al., 2001; Boyle et al., 2001; Ishibashi et al., 2002; Jenkins and Bennett, 2002; Mathis et al., 2001; Zonta et al., 2008). Récemment, par l'utilisation d'une stratégie génétique, Susuki et al., 2013 ont montré que la perturbation de deux de ces trois mécanismes est nécessaire pour affecter la formation nodale. Nous avons pu montrer que l'agrégation des canaux Na_v peut apparaître sans contact axoglial direct, comme cela a été décrit précédemment (Kaplan et al., 1997, 2001). Nous avons montré également que l'AnkG est requise pour la formation des agrégats des canaux Na_v

et de la Nfasc186 le long des axones non myélinisés. L'ankG, qui crée un lien avec le cytosquelette en établissant des interactions entre le domaine intracellulaire de la Nfasc186 ou les sous-unités α des canaux Nav et la β IV-Spectrine et les moteurs kinésines (Barry et al., 2014; Bennett and Baines, 2001), peut donc initier ou stabiliser l'agrégation des protéines nodales avant la myélinisation.

Il a été montré par le laboratoire que la Nfasc186 n'est pas nécessaire pour la formation des préneuds dans des cultures cellulaires chez la souris *Nfasc*^{-/-} (Freeman et al., 2015). Ce résultat suggère que la Nfasc186 jouerait un rôle dans les phases tardives de l'assemblage nodal plutôt que dans la phase précoce. De plus chez la souris *NrCAM*^{-/-}, nous avons pu observer la formation de préneuds en culture (données non publiées). Toutefois l'absence d'expression d'une de ces molécules d'adhésion (Nfasc186 ou NrCAM) pourrait être compensée par la présence de l'autre. Pour répondre à cette question, il serait intéressant de regarder chez la souris double mutante *Nfasc*^{-/-} *NrCAM*^{-/-} si les neurones GABAergiques sont capables de former des préneuds. De plus, la contactine, molécule d'adhésion interagissant en cis avec Caspr au niveau des paranœuds, est également présente aux nœuds dans le SNC (Çolakoğlu et al., 2014). Afin de déterminer si la contactine neuronale était requise, des miRNA ont été transfectés dans les cultures mixtes de neurones d'hippocampes. Nous avons observé la formation de préneuds dans les cellules exprimant les miRNA-contactine (données récentes non publiées), indiquant que la contactine neuronale n'est pas nécessaire.

3. Effet de la maturation neuronale sur la capacité à former des préneuds

Nous avons observé que la formation de préneuds dans des cultures mixtes ou sur des neurones purifiés en présence de MCO est quantifiable à partir de 14 jours *in vitro* et augmente de manière significative à Div17. Par conséquent, nous avons émis l'hypothèse que cet effet d'agrégation aurait un lien avec la maturation ou la survie neuronale (Du and Dreyfus, 2002). Cette

hypothèse est soutenue par le fait que ces agrégats sont pour la plupart détectés *in vitro* sur les axones de large diamètre avec des neurofilaments phosphorylés, un marqueur de la maturation neuronale, et *in vivo*, nous avons trouvé ces préneuds chez des souris et rats à P12 et P13 et non chez des animaux plus jeunes. De plus, *in vitro*, nous montrons que dans des cultures de neurones purifiés il faut un temps de contact minimum de 10 jours entre le MCO et les neurones GABAergiques pour voir la formation de préneuds, suggérant qu'un seuil de maturation neuronale pourrait être requis pour la formation de préneuds et que le MCO pourrait participer à cette maturation. Nous avons ajouté différents facteurs de croissance ou maturation (BDNF, GDNF, CNTF, LIF, NGF) à des cultures de neurones purifiés mais ces facteurs qui induisent bien une maturation axonale ne sont pas suffisants pour induire l'agrégation des canaux sodiques. D'autres facteurs ayant un effet sur la maturation pourraient être impliqués.

Ce délai suggère également qu'une synthèse protéique est requise ou induite par le MCO. Des travaux récents du laboratoire montrent que le cycloheximide (inhibiteur de la traduction) ajouté à Div6 ou 8 aux cultures de neurones purifiés en présence de MCO inhibe l'agrégation de Na_v alors que son ajout plus tardif à Div14 n'a pas d'effet. Nous en concluons qu'une synthèse protéique est nécessaire jusqu'à Div8, soit pour augmenter la quantité de protéines nodales qui vont former les préneuds, soit pour la synthèse d'autres facteurs participant à la maturation.

4. Un (des) facteur(s) oligodendrocytaire soluble induit l'agrégation prénodale

Nos résultats sur les neurones purifiés reprennent des données précédentes de Kaplan et coll. montrant qu'un (des) facteurs protéiques sécrété(s) par les oligodendrocytes, immatures ou différenciés, induisent l'agrégation des protéines nodales (Kaplan et al., 1997, 2001). Nous avons pu identifier que ce(s) facteur(s) sont des protéines dont la masse moléculaire est supérieure à 30kDa

mais une activité est conservée pour des fractions supérieures à 100kDa, alors que les travaux de Kaplan et al., 2001 montrent que l'activité est située entre 30 et 50kDa. Ce(s) facteur(s) restent non encore identifié(s) et notre objectif est de résoudre cette question.

Dans le SNP, la gliomédine exprimée par les cellules de Schwann est connue pour induire l'agrégation nodale (Eshed et al., 2005). Clivée à partir de la membrane cellulaire, la gliomédine interagit avec une forme soluble de NrCAM et ce complexe induit l'agrégation de la Nfasc186 axonale, induisant ensuite le recrutement de Na_v et de l'ankyrinG. Cependant, aucune expression de gliomédine dans le SNC n'a été montrée, nous avons vérifié que la gliomédine n'est pas détectable dans les cultures d'oligodendrocytes au niveau des prénoeuds.

Les diverses protéines de la MEC enrichies aux nœuds dans le SNC (versican, brevican, tenascine R, phosphacan) forment un complexe chargé négativement et une barrière de diffusion retenant les ions Na^+ à proximité des nœuds et participent à la maintenance de ces nœuds (Bekku et al., 2009; Dours-Zimmermann et al., 2009; Susuki et al., 2013). Nous avons mis en évidence l'expression de tenascine R et brevican aux prénoeuds dans les cultures de neurones d'hippocampe ainsi que dans les oligodendrocytes en culture. Leur implication dans l'induction de l'assemblage prénodal reste à déterminer.

5. Identification de molécules candidates

Afin d'identifier des molécules candidates, nous avons choisi d'identifier les protéines présentes dans le MCO par analyse protéomique. Notre première approche a consisté à réduire la quantité de protéines à analyser, en sélectionnant les fractions actives du MCO, fractions résultant de l'élution d'une colonne d'échange d'anion retenant toute l'activité. Cette approche s'est révélée fructueuse car nous avons pu isoler des fractions actives de manière reproductible et les analyser en protéomique. Nos résultats nous ont permis notamment de mettre en évidence la présence de la Contactine-1 (ou F3), molécule de la superfamille des immunoglobulines à ancrage GPI de 130kDa,

connue pour interagir potentiellement avec différents ligands au niveau des nœuds notamment la sous-unité $\beta 1$ des canaux sodiques (Kazarinova-Noyes et al., 2001; Ranscht, 1988). Les sous-unités β augmentent l'expression fonctionnelle des sous-unités alpha et ont aussi des propriétés de molécules d'adhésion. Il a été montré que la contactine peut être clivée, et que sa forme soluble peut promouvoir la croissance des neurites (Durbec et al., 1992). La contactine est exprimée par différentes populations de neurones et contribue à la formation des connections neuronales. Elle est également exprimée par les oligodendrocytes *in vitro* et *in vivo*. Des expériences réalisées sur des souris *contactin*^{-/-} ont montré qu'elle participe à l'organisation des structures nodales (Çolakoğlu et al., 2014). Nous avons donc recherché un rôle potentiel de la contactine sécrétée par les oligodendrocytes. Nous avons vérifié son expression dans le MCO par IP/WB. Puis nous avons testé l'activité du MCO post-IP donc potentiellement déplété de la contactine. Après déplétion de la contactine-1 du MCO nous observons encore une activité importante du MCO. On peut envisager que la déplétion post-IP n'était pas complète et qu'il restait suffisamment de contactine pour induire une activité. Il faudrait procéder à plusieurs IP successives pour optimiser la déplétion. D'autre part, l'inhibition du clivage de l'ancrage GPI par un inhibiteur de phospholipase C montre une diminution significative de l'activité du MCO. De plus, des essais sont en cours avec ajout de la protéine recombinante sur les neurones purifiés. Nous pourrions également regarder chez la souris *contactin-1*^{-/-} (Berglund et al., 1999) la capacité des neurones GABAergiques à former des prénœuds.

Nous avons également mis en évidence la présence de phosphacan, protéine de la famille des chondroïtine sulfate protéoglycans, qui peut interagir avec les protéines de la MEC, les CAMs ainsi qu'avec la contactine-1 (Peles et al., 1995). Des études complémentaires sont à mener pour voir si le phosphacan a un rôle associé à la contactine-1 pour l'induction de la formation des prénœuds.

Par ailleurs, une deuxième approche (QuaNCAT) comparant MCO et MCA ou MCN a mis en évidence la forte expression de la tenascine-R dans le MCO,

comparativement aux autres milieux. La tenascine-R, protéine de la MEC, est connue dans le SNC pour la stabilisation des nœuds de Ranvier et pour se lier à la contactine-1 (Anlar and Gunel-Ozcan, 2012). Il serait intéressant de regarder l'activité du MCO après immunoprécipitation de la tenascine-R et également après double immunoprécipitation de la contactine-1 et de la tenascine-R, ainsi que de tester l'ajout combiné de ces protéines recombinantes aux neurones purifiés.

6. La sécrétion des facteurs pro-agrégants est régulée par la signalisation neuronale

Il a été montré que les OPCs expriment des récepteurs pour plusieurs neurotransmetteurs et que la libération de GABA par les interneurons induit une activation des récepteurs GABA A dans les OPCs hippocampiques (Lin and Bergles, 2004; Vélez-Fort et al., 2012). De plus, des travaux récents suggèrent que le GABA peut réguler le développement des cellules NG2⁺ du cervelet (Zonouzi et al., 2015).

Nous avons pu montrer qu'en traitant les oligodendrocytes en culture avec un agoniste des récepteurs GABA A, nous augmentons la sécrétion dans le MCO de(s) protéine(s) pro-agrégantes. Cependant, cet effet semble limité aux interactions avec les neurones GABAergiques car les oligodendrocytes ne répondent pas aux agonistes glutamatergiques (AMPA et NMDA). Ces données suggèrent une communication cellulaire entre les oligodendrocytes et les neurones GABAergiques qui a pour effet d'augmenter la sécrétion de protéines pro-agrégantes et pourraient également favoriser la maturation des oligodendrocytes pour la myélinisation.

Bibliographie

- Amor, V., Feinberg, K., Eshed-Eisenbach, Y., Vainshtein, A., Frechter, S., Grumet, M., Rosenbluth, J., and Peles, E. (2014). Long-Term Maintenance of Na⁺ Channels at Nodes of Ranvier Depends on Glial Contact Mediated by Gliomedin and NrCAM. *J. Neurosci.* *34*, 5089–5098.
- Anlar, B., and Gunel-Ozcan, A. (2012). Tenascin-R: Role in the central nervous system. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *44*, 1385–1389.
- Back, S.A., Tuohy, T.M.F., Chen, H., Wallingford, N., Craig, A., Struve, J., Luo, N.L., Banine, F., Liu, Y., Chang, A., et al. (2005). Hyaluronan accumulates in demyelinated lesions and inhibits oligodendrocyte progenitor maturation. *Nat. Med.* *11*, 966–972.
- Banker, G.A., and Cowan, W.M. (1977). Rat hippocampal neurons in dispersed cell culture. *Brain Res.* *126*, 397–342.
- Barbin, G., Aigrot, M.S., Charles, P., Foucher, A., Grumet, M., Schachner, M., Zalc, B., and Lubetzki, C. (2004). Axonal cell-adhesion molecule L1 in CNS myelination. *Neuron Glia Biol.* *1*, 65–72.
- Barres, B.A., Lazar, M.A., and Raff, M.C. (1994). A novel role for thyroid hormone, glucocorticoids and retinoic acid in timing oligodendrocyte development. *Dev. Camb. Engl.* *120*, 1097–1108.
- Barry, J., Gu, Y., Jukkola, P., O'Neill, B., Gu, H., Mohler, P.J., Rajamani, K.T., and Gu, C. (2014). Ankyrin-G Directly Binds to Kinesin-1 to Transport Voltage-Gated Na⁺ Channels into Axons. *Dev. Cell* *28*, 117–131.
- Bekku, Y., Rauch, U., Ninomiya, Y., and Oohashi, T. (2009). Brevican distinctively assembles extracellular components at the large diameter nodes of Ranvier in the CNS. *J. Neurochem.* *108*, 1266–1276.
- Bekku, Y., Vargová, L., Goto, Y., Vorísek, I., Dmytrenko, L., Narasaki, M., Ohtsuka, A., Fässler, R., Ninomiya, Y., Syková, E., et al. (2010). Brall: Its Role in Diffusion Barrier Formation and Conduction Velocity in the CNS. *J. Neurosci.* *30*, 3113–3123.
- Bennett, V., and Baines, A.J. (2001). Spectrin and ankyrin-based pathways: metazoan inventions for integrating cells into tissues. *Physiol. Rev.* *81*, 1353–1392.
- Bennett, V., and Lorenzo, D.N. (2013). Spectrin- and ankyrin-based membrane domains and the evolution of vertebrates. *Curr. Top. Membr.* *72*, 1–37.
- Berglund, E.O., Murai, K.K., Fredette, B., Sekerková, G., Marturano, B., Weber, L., Mugnaini, E., and Ranscht, B. (1999). Ataxia and abnormal cerebellar microorganization in mice with ablated contactin gene expression. *Neuron* *24*, 739–750.
- Bhat, M.A., Rios, J.C., Lu, Y., Garcia-Fresco, G.P., Ching, W., St Martin, M., Li, J., Einheber, S., Chesler, M., Rosenbluth, J., et al. (2001a). Axon-glia interactions and the domain organization of myelinated axons requires neurexin IV/Caspr/Paranodin. *Neuron* *30*, 369–383.
- Bhat, M.A., Rios, J.C., Lu, Y., Garcia-Fresco, G.P., Ching, W., St Martin, M., Li, J., Einheber, S., Chesler, M., Rosenbluth, J., et al. (2001b). Axon-glia interactions and the domain organization of myelinated axons requires neurexin IV/Caspr/Paranodin. *Neuron* *30*, 369–383.
- Bosio, A., Binczek, E., and Stoffel, W. (1996). Functional breakdown of the lipid bilayer of the myelin membrane in central and peripheral nervous system by disrupted galactocerebroside synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *93*, 13280–13285.
- Boyle, M.E., Berglund, E.O., Murai, K.K., Weber, L., Peles, E., and Ranscht, B. (2001). Contactin orchestrates assembly of the septate-like junctions at the paranode in myelinated peripheral nerve. *Neuron* *30*, 385–397.
- Buffington, S.A., and Rasband, M.N. (2013). Na⁺ channel-dependent recruitment of Navβ4 to axon initial segments and nodes of Ranvier. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *33*, 6191–6202.

- Bunge, M.B., Bunge, R.P., and Pappas, G.D. (1962). Electron microscopic demonstration of connections between glia and myelin sheaths in the developing mammalian central nervous system. *J. Cell Biol.* *12*, 448–453.
- Butt, A.M., Fern, R.F., and Matute, C. (2014). Neurotransmitter signaling in white matter. *Glia* *62*, 1762–1779.
- Buttermore, E.D., Dupree, J.L., Cheng, J., An, X., Tessarollo, L., and Bhat, M.A. (2011). The cytoskeletal adaptor protein band 4.1B is required for the maintenance of paranodal axoglial septate junctions in myelinated axons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *31*, 8013–8024.
- 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., et al. (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.
- Catterall, W.A. (2012). Voltage-gated sodium channels at 60: structure, function and pathophysiology. *J. Physiol.* *590*, 2577–2589.
- Chang, K.-J., and Rasband, M.N. (2013). Excitable domains of myelinated nerves: axon initial segments and nodes of Ranvier. *Curr. Top. Membr.* *72*, 159–192.
- Chang, K.-J., Zollinger, D.R., Susuki, K., Sherman, D.L., Makara, M.A., Brophy, P.J., Cooper, E.C., Bennett, V., Mohler, P.J., and Rasband, M.N. (2014). Glial ankyrins facilitate paranodal axoglial junction assembly. *Nat. Neurosci.* *17*, 1673–1681.
- Charles, P., Hernandez, M.P., Stankoff, B., Aigrot, M.S., Colin, C., Rougon, G., Zalc, B., and Lubetzki, C. (2000). Negative regulation of central nervous system myelination by polysialylated-neural cell adhesion molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 7585–7590.
- Charles, P., Tait, S., Faivre-Sarrailh, C., Barbin, G., Gunn-Moore, F., Denisenko-Nehrbass, N., Guennoc, A.-M., Girault, J.-A., Brophy, P.J., and Lubetzki, C. (2002). Neurofascin is a glial receptor for the paranodin/Caspr-contactin axonal complex at the axoglial junction. *Curr. Biol. CB* *12*, 217–220.
- Cheng, L., Esch, F.S., Marchionni, M.A., and Mudge, A.W. (1998). Control of Schwann cell survival and proliferation: autocrine factors and neuregulins. *Mol. Cell. Neurosci.* *12*, 141–156.
- Chunling Chen, V.B. (2003). Reduced sodium channel density, altered voltage dependence of inactivation, and increased susceptibility to seizures in mice lacking sodium channel $\beta 2$ -subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 17072–17077.
- Cifuentes-Diaz, C., Chareyre, F., Garcia, M., Devaux, J., Carnaud, M., Levasseur, G., Niwa-Kawakita, M., Harroch, S., Girault, J.-A., Giovannini, M., et al. (2011). Protein 4.1B Contributes to the Organization of Peripheral Myelinated Axons. *PLOS ONE* *6*, e25043.
- Coetzee, T., Fujita, N., Dupree, J., Shi, R., Blight, A., Suzuki, K., Suzuki, K., and Popko, B. (1996). Myelination in the absence of galactocerebroside and sulfatide: normal structure with abnormal function and regional instability. *Cell* *86*, 209–219.
- Çolakoğlu, G., Bergstrom-Tyrberg, U., Berglund, E.O., and Ranscht, B. (2014). Contactin-1 regulates myelination and nodal/paranodal domain organization in the central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, E394–E403.
- Colombelli, C., Palmisano, M., Eshed-Eisenbach, Y., Zambroni, D., Pavoni, E., Ferri, C., Saccucci, S., Nicole, S., Soininen, R., McKee, K.K., et al. (2015). Perlecan is recruited by dystroglycan to nodes of Ranvier and binds the clustering molecule gliomedin. *J. Cell Biol.* *208*, 313–329.
- Coman, I., Aigrot, M.S., Seilhean, D., Reynolds, R., Girault, J.A., Zalc, B., and Lubetzki, C. (2006). Nodal, paranodal and juxtaparanodal axonal proteins during demyelination and remyelination in multiple sclerosis. *Brain* *129*, 3186–3195.

- Craner, M.J., Newcombe, J., Black, J.A., Hartle, C., Cuzner, M.L., and Waxman, S.G. (2004). Molecular changes in neurons in multiple sclerosis: altered axonal expression of Nav1.2 and Nav1.6 sodium channels and Na⁺/Ca²⁺ exchanger. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 8168–8173.
- Custer, A.W., Kazarinova-Noyes, K., Sakurai, T., Xu, X., Simon, W., Grumet, M., and Shrager, P. (2003). The Role of the Ankyrin-Binding Protein NrCAM in Node of Ranvier Formation. *J. Neurosci.* *23*, 10032–10039.
- Czopka, T., Ffrench-Constant, C., and 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.
- Davis, A.D., Weatherby, T.M., Hartline, D.K., and Lenz, P.H. (1999). Myelin-like sheaths in copepod axons. *Nature* *398*, 571.
- Davis, J.Q., Lambert, S., and Bennett, V. (1996). Molecular composition of the node of Ranvier: identification of ankyrin-binding cell adhesion molecules neurofascin (mucin+/third FNIII domain-) and NrCAM at nodal axon segments. *J. Cell Biol.* *135*, 1355–1367.
- Del Rio-Hortega, P. (2012). Are the glia with very few processes homologous with Schwann cells? by Pío del Río-Hortega. 1922. *Clin. Neuropathol.* *31*, 460–462.
- Demerens, C., Stankoff, B., Logak, M., Anglade, P., Allinquant, B., Couraud, F., Zalc, B., and Lubetzki, C. (1996). Induction of myelination in the central nervous system by electrical activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *93*, 9887–9892.
- Desmazières, A., Sol-Foulon, N., and Lubetzki, C. (2012). Changes at the nodal and perinodal axonal domains: a basis for multiple sclerosis pathology? *Mult. Scler. J.* *18*, 133–137.
- Desmazieres, A., Zonta, B., Zhang, A., Wu, L.-M.N., Sherman, D.L., and Brophy, P.J. (2014). Differential Stability of PNS and CNS Nodal Complexes When Neuronal Neurofascin Is Lost. *J. Neurosci.* *34*, 5083–5088.
- Dours-Zimmermann, M.T., Maurer, K., Rauch, U., Stoffel, W., Fässler, R., and Zimmermann, D.R. (2009). Versican V2 Assembles the Extracellular Matrix Surrounding the Nodes of Ranvier in the CNS. *J. Neurosci.* *29*, 7731–7742.
- Du, Y., and Dreyfus, C.F. (2002). Oligodendrocytes as providers of growth factors. *J. Neurosci. Res.* *68*, 647–654.
- Dugas, J.C., Tai, Y.C., Speed, T.P., Ngai, J., and Barres, B.A. (2006). Functional genomic analysis of oligodendrocyte differentiation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *26*, 10967–10983.
- Dupree, J.L., Coetzee, T., Blight, A., Suzuki, K., and Popko, B. (1998). Myelin galactolipids are essential for proper node of Ranvier formation in the CNS. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *18*, 1642–1649.
- Durbec, P., Gennarini, G., Goridis, C., and Rougon, G. (1992). A soluble form of the F3 neuronal cell adhesion molecule promotes neurite outgrowth. *J. Cell Biol.* *117*, 877–887.
- Dzhashiashvili, Y., Zhang, Y., Galinska, J., Lam, I., Grumet, M., and Salzer, J.L. (2007). Nodes of Ranvier and axon initial segments are ankyrin G-dependent domains that assemble by distinct mechanisms. *J. Cell Biol.* *177*, 857–870.
- Eichelbaum, K., Winter, M., Diaz, M.B., Herzig, S., and Krijgsveld, J. (2012a). Selective enrichment of newly synthesized proteins for quantitative secretome analysis. *Nat. Biotechnol.* *30*, 984–990.
- Eichelbaum, K., Winter, M., Diaz, M.B., Herzig, S., and Krijgsveld, J. (2012b). Selective enrichment of newly synthesized proteins for quantitative secretome analysis. *Nat. Biotechnol.* *30*, 984–990.
- Einheber, S., Maurel, P., Meng, X., Rubin, M., Lam, I., Mohandas, N., An, X., Shrager, P., Kissil, J., and Salzer, J.L. (2013). The 4.1B cytoskeletal protein regulates the domain organization and sheath thickness of myelinated axons. *Glia* *61*, 240–253.

- Eshed, Y., Feinberg, K., Poliak, S., Sabanay, H., Sarig-Nadir, O., Spiegel, I., Bermingham Jr., J.R., and Peles, E. (2005a). Gliomedin Mediates Schwann Cell-Axon Interaction and the Molecular Assembly of the Nodes of Ranvier. *Neuron* **47**, 215–229.
- Eshed, Y., Feinberg, K., Poliak, S., Sabanay, H., Sarig-Nadir, O., Spiegel, I., Bermingham Jr., J.R., and Peles, E. (2005b). Gliomedin Mediates Schwann Cell-Axon Interaction and the Molecular Assembly of the Nodes of Ranvier. *Neuron* **47**, 215–229.
- Eshed, Y., Feinberg, K., Carey, D.J., and Peles, E. (2007). Secreted gliomedin is a perinodal matrix component of peripheral nerves. *J. Cell Biol.* **177**, 551–562.
- Feinberg, K., Eshed-Eisenbach, Y., Frechter, S., Amor, V., Salomon, D., Sabanay, H., Dupree, J.L., Grumet, M., Brophy, P.J., Shrager, P., et al. (2010). A glial signal consisting of Gliomedin and NrCAM clusters axonal Na⁺ channels during the formation of nodes of Ranvier. *Neuron* **65**, 490–502.
- Ffrench-Constant, C. (1986). Molecular specialization of astrocyte processes at nodes of Ranvier in rat optic nerve. *J. Cell Biol.* **102**, 844–852.
- Freeman, S.A., Desmazières, A., Simonnet, J., Gatta, M., Pfeiffer, F., Aigrot, M.S., Rappeneau, Q., Guerreiro, S., Michel, P.P., Yanagawa, Y., et al. (2015). Acceleration of conduction velocity linked to clustering of nodal components precedes myelination. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 201419099.
- Gallo, V., Zhou, J.M., McBain, C.J., Wright, P., Knutson, P.L., and Armstrong, R.C. (1996). Oligodendrocyte progenitor cell proliferation and lineage progression are regulated by glutamate receptor-mediated K⁺ channel block. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **16**, 2659–2670.
- Garbay, B., Heape, A.M., Sargueil, F., and Cassagne, C. (2000). Myelin synthesis in the peripheral nervous system. *Prog. Neurobiol.* **61**, 267–304.
- Garbern, J.Y., Yool, D.A., Moore, G.J., Wilds, I.B., Faulk, M.W., Klugmann, M., Nave, K.-A., Siermans, E.A., van der Knaap, M.S., Bird, T.D., et al. (2002). Patients lacking the major CNS myelin protein, proteolipid protein 1, develop length-dependent axonal degeneration in the absence of demyelination and inflammation. *Brain J. Neurol.* **125**, 551–561.
- Genoud, S., Lappe-Siefke, C., Goebbels, S., Radtke, F., Aguet, M., Scherer, S.S., Suter, U., Nave, K.-A., and Mantei, N. (2002). Notch1 control of oligodendrocyte differentiation in the spinal cord. *J. Cell Biol.* **158**, 709–718.
- Gokhan, S., Marin-Husstege, M., Yung, S.Y., Fontanez, D., Casaccia-Bonnel, P., and Mehler, M.F. (2005). Combinatorial profiles of oligodendrocyte-selective classes of transcriptional regulators differentially modulate myelin basic protein gene expression. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **25**, 8311–8321.
- Gordon, A., Adamsky, K., Vainshtein, A., Frechter, S., Dupree, J.L., Rosenbluth, J., and Peles, E. (2014). Caspr and Caspr2 Are Required for Both Radial and Longitudinal Organization of Myelinated Axons. *J. Neurosci.* **34**, 14820–14826.
- Griffiths, I., Klugmann, M., Anderson, T., Yool, D., Thomson, C., Schwab, M.H., Schneider, A., Zimmermann, F., McCulloch, M., Nadon, N., et al. (1998). Axonal swellings and degeneration in mice lacking the major proteolipid of myelin. *Science* **280**, 1610–1613.
- Gudz, T.I., Komuro, H., and Macklin, W.B. (2006). Glutamate stimulates oligodendrocyte progenitor migration mediated via an α 5 integrin/myelin proteolipid protein complex. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **26**, 2458–2466.
- He, Y., Sandoval, J., and Casaccia-Bonnel, P. (2007). Events at the transition between cell cycle exit and oligodendrocyte progenitor differentiation: the role of HDAC and YY1. *Neuron Glia Biol.* **3**, 221–231.
- Hines, J.H., Ravanelli, A.M., Schwandt, R., Scott, E.K., and Appel, B. (2015). Neuronal activity biases axon selection for myelination in vivo. *Nat. Neurosci.* **18**, 683–689.

- Hirahara, Y., Matsuda, K.I., Yamada, H., Saitou, A., Morisaki, S., Takanami, K., Boggs, J.M., and Kawata, M. (2013). G protein-coupled receptor 30 contributes to improved remyelination after cuprizone-induced demyelination. *Glia* *61*, 420–431.
- Ho, T.S.-Y., Zollinger, D.R., Chang, K.-J., Xu, M., Cooper, E.C., Stankewich, M.C., Bennett, V., and Rasband, M.N. (2014). A HIERARCHY OF ANKYRIN/SPECTRIN COMPLEXES CLUSTERS SODIUM CHANNELS AT NODES OF RANVIER. *Nat. Neurosci.* *17*, 1664–1672.
- Honke, K., Hirahara, Y., Dupree, J., Suzuki, K., Popko, B., Fukushima, K., Fukushima, J., Nagasawa, T., Yoshida, N., Wada, Y., et al. (2002). Paranodal junction formation and spermatogenesis require sulfoglycolipids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 4227–4232.
- Horresh, I., Bar, V., Kissil, J.L., and Peles, E. (2010). Organization of myelinated axons by Caspr and Caspr2 requires the cytoskeletal adapter protein 4.1B. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *30*, 2480–2489.
- Howden, A.J.M., Geoghegan, V., Katsch, K., Efstathiou, G., Bhushan, B., Boutureira, O., Thomas, B., Trudgian, D.C., Kessler, B.M., Dieterich, D.C., et al. (2013a). QuaNCAT: quantitating proteome dynamics in primary cells. *Nat. Methods* *10*, 343–346.
- Howden, A.J.M., Geoghegan, V., Katsch, K., Efstathiou, G., Bhushan, B., Boutureira, O., Thomas, B., Trudgian, D.C., Kessler, B.M., Dieterich, D.C., et al. (2013b). QuaNCAT: quantitating proteome dynamics in primary cells. *Nat. Methods* *10*, 343–346.
- Ishibashi, T., Dupree, J.L., Ikenaka, K., Hirahara, Y., Honke, K., Peles, E., Popko, B., Suzuki, K., Nishino, H., and Baba, H. (2002). A Myelin Galactolipid, Sulfatide, Is Essential for Maintenance of Ion Channels on Myelinated Axon But Not Essential for Initial Cluster Formation. *J. Neurosci.* *22*, 6507–6514.
- Ishibashi, T., Dakin, K.A., Stevens, B., Lee, P.R., Kozlov, S.V., Stewart, C.L., and Fields, R.D. (2006). Astrocytes promote myelination in response to electrical impulses. *Neuron* *49*, 823–832.
- Jenkins, S.M., and Bennett, V. (2002). Developing nodes of Ranvier are defined by ankyrin-G clustering and are independent of paranodal axoglial adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *99*, 2303–2308.
- Jenkins, P.M., Kim, N., Jones, S.L., Tseng, W.C., Svitkina, T.M., Yin, H.H., and Bennett, V. (2015). Giant ankyrin-G: A critical innovation in vertebrate evolution of fast and integrated neuronal signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *112*, 957–964.
- Jepson, S., Vought, B., Gross, C.H., Gan, L., Austen, D., Frantz, J.D., Zwahlen, J., Lowe, D., Markland, W., and Krauss, R. (2012). LINGO-1, a transmembrane signaling protein, inhibits oligodendrocyte differentiation and myelination through intercellular self-interactions. *J. Biol. Chem.* *287*, 22184–22195.
- Jinno, S., Klausberger, T., Marton, L.F., Dalezios, Y., Roberts, J.D.B., Fuentealba, P., Bushong, E.A., Henze, D., Buzsáki, G., and Somogyi, P. (2007). Neuronal Diversity in GABAergic Long-Range Projections from the Hippocampus. *J. Neurosci.* *27*, 8790–8804.
- Kaplan, M.R., Meyer-Franke, A., Lambert, S., Bennett, V., Duncan, I.D., Levinson, S.R., and Barres, B.A. (1997). Induction of sodium channel clustering by oligodendrocytes. *Nature* *386*, 724–728.
- Kaplan, M.R., Cho, M.H., Ullian, E.M., Isom, L.L., Levinson, S.R., and Barres, B.A. (2001). Differential control of clustering of the sodium channels Na(v)1.2 and Na(v)1.6 at developing CNS nodes of Ranvier. *Neuron* *30*, 105–119.
- Kazarinova-Noyes, K., Malhotra, J.D., McEwen, D.P., Mattei, L.N., Berglund, E.O., Ranscht, B., Levinson, S.R., Schachner, M., Shrager, P., Isom, L.L., et al. (2001a). Contactin Associates with Na⁺ Channels and Increases Their Functional Expression. *J. Neurosci.* *21*, 7517–7525.
- Kazarinova-Noyes, K., Malhotra, J.D., McEwen, D.P., Mattei, L.N., Berglund, E.O., Ranscht, B., Levinson, S.R., Schachner, M., Shrager, P., Isom, L.L., et al. (2001b). Contactin associates with Na⁺ channels and increases their functional expression. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *21*, 7517–7525.

- Kukley, M., Capetillo-Zarate, E., and Dietrich, D. (2007). Vesicular glutamate release from axons in white matter. *Nat. Neurosci.* *10*, 311–320.
- Küspert, M., Hammer, A., Bösl, M.R., and Wegner, M. (2011). Olig2 regulates Sox10 expression in oligodendrocyte precursors through an evolutionary conserved distal enhancer. *Nucleic Acids Res.* *39*, 1280–1293.
- Lai, H.C., and Jan, L.Y. (2006). The distribution and targeting of neuronal voltage-gated ion channels. *Nat. Rev. Neurosci.* *7*, 548–562.
- Lappe-Siefke, C., Goebbels, S., Gravel, M., Nicksch, E., Lee, J., Braun, P.E., Griffiths, I.R., and Nave, K.-A. (2003). Disruption of *Cnp1* uncouples oligodendroglial functions in axonal support and myelination. *Nat. Genet.* *33*, 366–374.
- Lee, D.-H., Kubera, K., Rosenthal, B., Kaltschmidt, B., Kaltschmidt, C., Gold, R., and Linker, R.A. (2012). Neuronal NF- κ B ablation does not influence neuro-axonal degeneration in experimental autoimmune demyelination. *J. Neuroimmunol.* *246*, 38–42.
- Lee, S., Chong, S.Y.C., Tuck, S.J., Corey, J.M., and Chan, J.R. (2013). A rapid and reproducible assay for modeling myelination by oligodendrocytes using engineered nanofibers. *Nat. Protoc.* *8*, 771–782.
- Lee, X., Yang, Z., Shao, Z., Rosenberg, S.S., Levesque, M., Pepinsky, R.B., Qiu, M., Miller, R.H., Chan, J.R., and Mi, S. (2007). NGF regulates the expression of axonal LINGO-1 to inhibit oligodendrocyte differentiation and myelination. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *27*, 220–225.
- Leterrier, C., Brachet, A., Dargent, B., and Vacher, H. (2011). Determinants of voltage-gated sodium channel clustering in neurons. *Semin. Cell Dev. Biol.* *22*, 171–177.
- Lin, S., and Bergles, D.E. (2004). Synaptic signaling between GABAergic interneurons and oligodendrocyte precursor cells in the hippocampus. *Nat. Neurosci.* *7*, 24–32.
- Lustig, M., Zanazzi, G., Sakurai, T., Blanco, C., Levinson, S.R., Lambert, S., Grumet, M., and Salzer, J.L. (2001). Nr-CAM and neurofascin interactions regulate ankyrin G and sodium channel clustering at the node of Ranvier. *Curr. Biol.* *11*, 1864–1869.
- Marcus, J., Honigbaum, S., Shroff, S., Honke, K., Rosenbluth, J., and Dupree, J.L. (2006). Sulfatide is essential for the maintenance of CNS myelin and axon structure. *Glia* *53*, 372–381.
- Mathis, C., Denisenko-Nehrbass, N., Girault, J.A., and Borrelli, E. (2001). Essential role of oligodendrocytes in the formation and maintenance of central nervous system nodal regions. *Dev. Camb. Engl.* *128*, 4881–4890.
- McCarthy, K.D., and Vellis, J. de (1980). Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *J. Cell Biol.* *85*, 890–902.
- McEwen, D.P., and Isom, L.L. (2004). Heterophilic interactions of sodium channel β 1 subunits with axonal and glial cell adhesion molecules. *J. Biol. Chem.* *279*, 52744–52752.
- Meier, S., Bräuer, A.U., Heimrich, B., Nitsch, R., and Savaskan, N.E. (2004). Myelination in the hippocampus during development and following lesion. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *61*, 1082–1094.
- Melzer, S., Michael, M., Caputi, A., Eliava, M., Fuchs, E.C., Whittington, M.A., and Monyer, H. (2012). Long-range-projecting GABAergic neurons modulate inhibition in hippocampus and entorhinal cortex. *Science* *335*, 1506–1510.
- Menegoz, M., Gaspar, P., Le Bert, M., Galvez, T., Burgaya, F., Palfrey, C., Ezan, P., Arnos, F., and Girault, J.A. (1997). Paranodin, a glycoprotein of neuronal paranodal membranes. *Neuron* *19*, 319–331.
- Mensch, S., Baraban, M., Almeida, R., Czopka, T., Ausborn, J., El Manira, A., and Lyons, D.A. (2015). Synaptic vesicle release regulates myelin sheath number of individual oligodendrocytes in vivo. *Nat. Neurosci.* *18*, 628–630.

- Mi, S., Miller, R.H., Lee, X., Scott, M.L., Shulag-Morskaya, S., Shao, Z., Chang, J., Thill, G., Levesque, M., Zhang, M., et al. (2005). LINGO-1 negatively regulates myelination by oligodendrocytes. *Nat. Neurosci.* *8*, 745–751.
- Moré, M.I., Kirsch, F.P., and Rathjen, F.G. (2001). Targeted ablation of NrCAM or ankyrin-B results in disorganized lens fibers leading to cataract formation. *J. Cell Biol.* *154*, 187–196.
- Morell, P., and Quarles, R.H. (1999). Myelin Formation, Structure and Biochemistry.
- Morell, P., and Radin, N.S. (1969). Synthesis of cerebroside by brain from uridine diphosphate galactose and ceramide containing hydroxy fatty acid. *Biochemistry (Mosc.)* *8*, 506–512.
- Nakatani, H., Martin, E., Hassani, H., Clavairolly, A., Maire, C.L., Viadieu, A., Kerninon, C., Delmasure, A., Frah, M., Weber, M., et al. (2013). *Ascl1/Mash1* promotes brain oligodendrogenesis during myelination and remyelination. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *33*, 9752–9768.
- Nielsen, J.A., Berndt, J.A., Hudson, L.D., and Armstrong, R.C. (2004). Myelin transcription factor 1 (Myt1) modulates the proliferation and differentiation of oligodendrocyte lineage cells. *Mol. Cell. Neurosci.* *25*, 111–123.
- Ogawa, Y., Schafer, D.P., Horresh, I., Bar, V., Hales, K., Yang, Y., Susuki, K., Peles, E., Stankewich, M.C., and Rasband, M.N. (2006). Spectrins and AnkyrinB Constitute a Specialized Paranodal Cytoskeleton. *J. Neurosci.* *26*, 5230–5239.
- O'Malley, H.A., and Isom, L.L. (2015). Sodium channel β subunits: emerging targets in channelopathies. *Annu. Rev. Physiol.* *77*, 481–504.
- Oohashi, T., Hirakawa, S., Bekku, Y., Rauch, U., Zimmermann, D.R., Su, W.-D., Ohtsuka, A., Murakami, T., and Ninomiya, Y. (2002). Bral1, a brain-specific link protein, colocalizing with the versican V2 isoform at the nodes of Ranvier in developing and adult mouse central nervous systems. *Mol. Cell. Neurosci.* *19*, 43–57.
- Patton, D.E., Isom, L.L., Catterall, W.A., and Goldin, A.L. (1994). The adult rat brain beta 1 subunit modifies activation and inactivation gating of multiple sodium channel alpha subunits. *J. Biol. Chem.* *269*, 17649–17655.
- Peles, E., Nativ, M., Campbell, P.L., Sakurai, T., Martinez, R., Lev, S., Clary, D.O., Schilling, J., Barnea, G., Plowman, G.D., et al. (1995). The carbonic anhydrase domain of receptor tyrosine phosphatase beta is a functional ligand for the axonal cell recognition molecule contactin. *Cell* *82*, 251–260.
- Peles, E., Nativ, M., Lustig, M., Grumet, M., Schilling, J., Martinez, R., Plowman, G.D., and Schlessinger, J. (1997). Identification of a novel contactin-associated transmembrane receptor with multiple domains implicated in protein-protein interactions. *EMBO J.* *16*, 978–988.
- Piaton, G., Gould, R.M., and Lubetzki, C. (2010). Axon-oligodendrocyte interactions during developmental myelination, demyelination and repair. *J. Neurochem.* *114*, 1243–1260.
- Picardo, M.A., Guigue, P., Bonifazi, P., Batista-Brito, R., Allene, C., Ribas, A., Fishell, G., Baude, A., and Cossart, R. (2011). Pioneer GABA cells comprise a subpopulation of hub neurons in the developing hippocampus. *Neuron* *71*, 695–709.
- Poliak, S., and Peles, E. (2003). The local differentiation of myelinated axons at nodes of Ranvier. *Nat. Rev. Neurosci.* *4*, 968–980.
- Privat, A., Jacque, C., Bourre, J.M., Dupouey, P., and Baumann, N. (1979). Absence of the major dense line in myelin of the mutant mouse “shiverer.” *Neurosci. Lett.* *12*, 107–112.
- Ranscht, B. (1988). Sequence of contactin, a 130-kD glycoprotein concentrated in areas of interneuronal contact, defines a new member of the immunoglobulin supergene family in the nervous system. *J. Cell Biol.* *107*, 1561–1573.

- Rasband, M.N., Peles, E., Trimmer, J.S., Levinson, S.R., Lux, S.E., and Shrager, P. (1999). Dependence of Nodal Sodium Channel Clustering on Paranodal Axoglial Contact in the Developing CNS. *J. Neurosci.* *19*, 7516–7528.
- Rasband, M.N., Tayler, J., Kaga, Y., Yang, Y., Lappe-Siefke, C., Nave, K.-A., and Bansal, R. (2005). CNP is required for maintenance of axon–glia interactions at nodes of Ranvier in the CNS. *Glia* *50*, 86–90.
- Ratcliffe, C.F., Westenbroek, R.E., Curtis, R., and Catterall, W.A. (2001). Sodium channel $\beta 1$ and $\beta 3$ subunits associate with neurofascin through their extracellular immunoglobulin-like domain. *J. Cell Biol.* *154*, 427–434.
- Rios, J.C., Melendez-Vasquez, C.V., Einheber, S., Lustig, M., Grumet, M., Hemperly, J., Peles, E., and Salzer, J.L. (2000). Contactin-Associated Protein (Caspr) and Contactin Form a Complex That Is Targeted to the Paranodal Junctions during Myelination. *J. Neurosci.* *20*, 8354–8364.
- Rios, J.C., Rubin, M., Martin, M.S., Downey, R.T., Einheber, S., Rosenbluth, J., Levinson, S.R., Bhat, M., and Salzer, J.L. (2003). Paranodal Interactions Regulate Expression of Sodium Channel Subtypes and Provide a Diffusion Barrier for the Node of Ranvier. *J. Neurosci.* *23*, 7001–7011.
- Roy, K., Murtie, J.C., El-Khodori, B.F., Edgar, N., Sardi, S.P., Hooks, B.M., Benoit-Marand, M., Chen, C., Moore, H., O'Donnell, P., et al. (2007). Loss of erbB signaling in oligodendrocytes alters myelin and dopaminergic function, a potential mechanism for neuropsychiatric disorders. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 8131–8136.
- Saito, F., Moore, S.A., Barresi, R., Henry, M.D., Messing, A., Ross-Barta, S.E., Cohn, R.D., Williamson, R.A., Sluka, K.A., Sherman, D.L., et al. (2003). Unique role of dystroglycan in peripheral nerve myelination, nodal structure, and sodium channel stabilization. *Neuron* *38*, 747–758.
- Salzer, J.L. (2003). Polarized domains of myelinated axons. *Neuron* *40*, 297–318.
- Schwarz, J.R., Glassmeier, G., Cooper, E.C., Kao, T.-C., Nodera, H., Tabuena, D., Kaji, R., and Bostock, H. (2006). KCNQ channels mediate IKs, a slow K⁺ current regulating excitability in the rat node of Ranvier. *J. Physiol.* *573*, 17–34.
- Sherman, D.L., and Brophy, P.J. (2005a). Mechanisms of axon ensheathment and myelin growth. *Nat. Rev. Neurosci.* *6*, 683–690.
- Sherman, D.L., and Brophy, P.J. (2005b). Mechanisms of axon ensheathment and myelin growth. *Nat. Rev. Neurosci.* *6*, 683–690.
- Sherman, D.L., Tait, S., Melrose, S., Johnson, R., Zonta, B., Court, F.A., Macklin, W.B., Meek, S., Smith, A.J.H., Cottrell, D.F., et al. (2005). Neurofascins Are Required to Establish Axonal Domains for Saltatory Conduction. *Neuron* *48*, 737–742.
- Siebert, J.R., and Osterhout, D.J. (2011). The inhibitory effects of chondroitin sulfate proteoglycans on oligodendrocytes. *J. Neurochem.* *119*, 176–188.
- Simons, M., and Trajkovic, K. (2006). Neuron–glia communication in the control of oligodendrocyte function and myelin biogenesis. *J. Cell Sci.* *119*, 4381–4389.
- Sohn, J., Natale, J., Chew, L.-J., Belachew, S., Cheng, Y., Aguirre, A., Lytle, J., Nait-Oumesmar, B., Kerninon, C., Kanai-Azuma, M., et al. (2006). Identification of Sox17 as a transcription factor that regulates oligodendrocyte development. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *26*, 9722–9735.
- Stankoff, B., Aigrot, M.-S., Noël, F., Wattilliaux, A., Zalc, B., and Lubetzki, C. (2002). Ciliary neurotrophic factor (CNTF) enhances myelin formation: a novel role for CNTF and CNTF-related molecules. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *22*, 9221–9227.
- Susuki, K., and Rasband, M.N. (2008). Molecular mechanisms of node of Ranvier formation. *Curr. Opin. Cell Biol.* *20*, 616–623.

- Susuki, K., Chang, K.-J., Zollinger, D.R., Liu, Y., Ogawa, Y., Eshed-Eisenbach, Y., Dours-Zimmermann, M.T., Oses-Prieto, J.A., Burlingame, A.L., Seidenbecher, C.I., et al. (2013). Three Mechanisms Assemble Central Nervous System Nodes of Ranvier. *Neuron* **78**, 469–482.
- Tait, S., Gunn-Moore, F., Collinson, J.M., Huang, J., Lubetzki, C., Pedraza, L., Sherman, D.L., Colman, D.R., and Brophy, P.J. (2000). An Oligodendrocyte Cell Adhesion Molecule at the Site of Assembly of the Paranodal Axo-Glial Junction. *J. Cell Biol.* **150**, 657–666.
- Tamamaki, N., Yanagawa, Y., Tomioka, R., Miyazaki, J.-I., Obata, K., and Kaneko, T. (2003). Green fluorescent protein expression and colocalization with calretinin, parvalbumin, and somatostatin in the GAD67-GFP knock-in mouse. *J. Comp. Neurol.* **467**, 60–79.
- Tóth, K., Freund, T.F., and Miles, R. (1997). Disinhibition of rat hippocampal pyramidal cells by GABAergic afferents from the septum. *J. Physiol.* **500**, 463–474.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **76**, 4350–4354.
- Traka, M., Goutebroze, L., Denisenko, N., Bessa, M., Nifli, A., Havaki, S., Iwakura, Y., Fukamauchi, F., Watanabe, K., Soliven, B., et al. (2003). Association of TAG-1 with Caspr2 is essential for the molecular organization of juxtaparanodal regions of myelinated fibers. *J. Cell Biol.* **162**, 1161–1172.
- Trimmer, J.S. (2015). Subcellular localization of K⁺ channels in mammalian brain neurons: remarkable precision in the midst of extraordinary complexity. *Neuron* **85**, 238–256.
- Turbic, A., Leong, S.Y., and Turnley, A.M. (2011). Chemokines and inflammatory mediators interact to regulate adult murine neural precursor cell proliferation, survival and differentiation. *PloS One* **6**, e25406.
- Uematsu, M., Hirai, Y., Karube, F., Ebihara, S., Kato, M., Abe, K., Obata, K., Yoshida, S., Hirabayashi, M., Yanagawa, Y., et al. (2008). Quantitative chemical composition of cortical GABAergic neurons revealed in transgenic venus-expressing rats. *Cereb. Cortex N. Y. N 1991* **18**, 315–330.
- Vabnick, I., Novaković, S.D., Levinson, S.R., Schachner, M., and Shrager, P. (1996). The Clustering of Axonal Sodium Channels during Development of the Peripheral Nervous System. *J. Neurosci.* **16**, 4914–4922.
- Vélez-Fort, M., Audinat, E., and Angulo, M.C. (2012). Central Role of GABA in Neuron–Glia Interactions. *The Neuroscientist* **18**, 237–250.
- Wake, H., Lee, P.R., and Fields, R.D. (2011). Control of local protein synthesis and initial events in myelination by action potentials. *Science* **333**, 1647–1651.
- Wang, S., Sdrulla, A.D., diSibio, G., Bush, G., Nofziger, D., Hicks, C., Weinmaster, G., and Barres, B.A. (1998). Notch receptor activation inhibits oligodendrocyte differentiation. *Neuron* **21**, 63–75.
- Watkins, T.A., Emery, B., Mulinyawe, S., and Barres, B.A. (2008). Distinct stages of myelination regulated by gamma-secretase and astrocytes in a rapidly myelinating CNS coculture system. *Neuron* **60**, 555–569.
- Waxman, S.G., and Bennett, M.V.L. (1972). Relative Conduction Velocities of Small Myelinated and Non-myelinated Fibres in the Central Nervous System. *Nature* **238**, 217–219.
- Waxman, S.G., and Ritchie, J.M. (1993). Molecular dissection of the myelinated axon. *Ann. Neurol.* **33**, 121–136.
- Weber, P., Bartsch, U., Rasband, M.N., Czaniera, R., Lang, Y., Bluethmann, H., Margolis, R.U., Levinson, S.R., Shrager, P., Montag, D., et al. (1999). Mice Deficient for Tenascin-R Display Alterations of the Extracellular Matrix and Decreased Axonal Conduction Velocities in the CNS. *J. Neurosci.* **19**, 4245–4262.

- Xiao, J., Kilpatrick, T.J., and Murray, S.S. (2009). The role of neurotrophins in the regulation of myelin development. *Neurosignals* *17*, 265–276.
- Xiao, Z.-C., Ragsdale, D.S., Malhotra, J.D., Mattei, L.N., Braun, P.E., Schachner, M., and Isom, L.L. (1999). Tenascin-R Is a Functional Modulator of Sodium Channel β Subunits. *J. Biol. Chem.* *274*, 26511–26517.
- Yang, Y., Ogawa, Y., Hedstrom, K.L., and Rasband, M.N. (2007). β IV spectrin is recruited to axon initial segments and nodes of Ranvier by ankyrinG. *J. Cell Biol.* *176*, 509–519.
- Yuen, T.J., Johnson, K.R., Miron, V.E., Zhao, C., Quandt, J., Harrisingh, M.C., Swire, M., Williams, A., McFarland, H.F., Franklin, R.J.M., et al. (2013). Identification of endothelin 2 as an inflammatory factor that promotes central nervous system remyelination. *Brain J. Neurol.* *136*, 1035–1047.
- Zalc, B., Goujet, D., and Colman, D. (2008). The origin of the myelination program in vertebrates. *Curr. Biol. CB* *18*, R511–R512.
- Zhang, A., Desmazieres, A., Zonta, B., Melrose, S., Campbell, G., Mahad, D., Li, Q., Sherman, D.L., Reynolds, R., and Brophy, P.J. (2015). Neurofascin 140 Is an Embryonic Neuronal Neurofascin Isoform That Promotes the Assembly of the Node of Ranvier. *J. Neurosci.* *35*, 2246–2254.
- Zhang, C., Susuki, K., Zollinger, D.R., Dupree, J.L., and Rasband, M.N. (2013). Membrane domain organization of myelinated axons requires β II spectrin. *J. Cell Biol.* *203*, 437–443.
- Zhang, Y., Bekku, Y., Dzhashiashvili, Y., Armenti, S., Meng, X., Sasaki, Y., Milbrandt, J., and Salzer, J.L. (2012). Assembly and maintenance of nodes of Ranvier rely on distinct sources of proteins and targeting mechanisms. *Neuron* *73*, 92–107.
- Zhou, Q., and Anderson, D.J. (2002). The bHLH transcription factors OLIG2 and OLIG1 couple neuronal and glial subtype specification. *Cell* *109*, 61–73.
- Zolova, O.E., and Wight, P.A. (2011). YY1 negatively regulates mouse myelin proteolipid protein (Plp1) gene expression in oligodendroglial cells. *ASN Neuro* *3*.
- Zonouzi, M., Scafidi, J., Li, P., McEllin, B., Edwards, J., Dupree, J.L., Harvey, L., Sun, D., Hübner, C.A., Cull-Candy, S.G., et al. (2015). GABAergic regulation of cerebellar NG2-cell development is altered in perinatal white matter injury. *Nat. Neurosci.* *18*, 674–682.
- Zonta, B., Tait, S., Melrose, S., Anderson, H., Harroch, S., Higginson, J., Sherman, D.L., and Brophy, P.J. (2008). Glial and neuronal isoforms of Neurofascin have distinct roles in the assembly of nodes of Ranvier in the central nervous system. *J. Cell Biol.* *181*, 1169–1177.

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES
Sciences de la Vie et de la Terre

ETUDE DU ROLE DES OLIGODENDROCYTES DANS LES
MECANISMES DE FORMATION DES NŒUDS DE RANVIER

Quentin RAPPENEAU

Une des dernières étapes de l'évolution du système nerveux chez les vertébrés est la myélinisation des axones des neurones. Ce processus permet une augmentation importante de la vitesse de conduction de l'influx nerveux. Dans le système nerveux central (SNC), la myéline qui est produite par les oligodendrocytes s'enroule de façon discontinue le long des axones, interrompue par des petits domaines enrichis en canaux sodium voltage dépendants (Na_v), les nœuds de Ranvier. Les mécanismes qui régissent l'agrégation des protéines constitutives des nœuds de Ranvier restent très mal connus. La sclérose en plaques, maladie auto-immune inflammatoire du SNC, provoque des lésions démyélinisantes associées à une dispersion des molécules nodales. Lors de la remyélinisation, la réapparition de ces domaines semble être à la fois très précoce, et essentielle pour une remyélinisation efficace. Nous souhaitons améliorer la compréhension de ces mécanismes, lors du développement et de la remyélinisation, dans l'objectif d'optimiser le développement de stratégies thérapeutiques de réparation myélinique. En utilisant une approche *in vitro* basée sur des cultures de neurones d'hippocampe et de cellules gliales, nous avons pu observer une agrégation des molécules nodales avant la mise en place de la myéline. Ces structures appelées « prénœuds », sont formées grâce à un (des) facteur(s) sécrété(s) par les oligodendrocytes dans le milieu conditionné (MCO). L'objectif de ce travail était de poursuivre l'étude des propriétés du MCO et d'identifier des molécules candidates sécrétées, capables d'induire l'agrégation nodale. Nous avons pu fractionner le MCO et obtenir une analyse protéomique des fractions actives. Mes travaux mettent en évidence la Contactine-1, la Tenascine-R ou encore le Phosphacan comme molécules candidates permettant la formation des prénœuds. La validation de l'activité de ces molécules est poursuivie actuellement au laboratoire.

Mots clés : nœuds de Ranvier, myéline, oligodendrocytes, canaux Na_v