

Université de Montréal

**La perturbation du locus *Nr2f1-K12* entraîne une
différenciation gliale précoce dans un nouveau modèle
murin de mégacôlon aganglionnaire**

Caractérisation de la lignée transgénique Spot

par

Chloé My Anh Nguyen

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade de M. Sc.
en Sciences Biomédicales
option Générale

Août 2015

© Nguyen, 2015

RÉSUMÉ

La maladie de Hirschsprung est une affection congénitale de la motilité intestinale caractérisée par un segment aganglionnaire dans le côlon terminal. Un criblage génétique par mutation insertionnelle aléatoire chez la souris nous a permis d'identifier la lignée transgénique Spot dont les homozygotes souffrent de mégacôlon aganglionnaire. L'analyse d'intestins d'embryons mutants a révélé une baisse de prolifération et un délai de migration des cellules de la crête neurale entériques (CCNe) progénitrices dus à leur différenciation gliale précoce, entraînant un défaut de colonisation de l'intestin et une aganglionose du côlon. Le séquençage du génome Spot indique que le transgène s'est inséré à l'intérieur du locus *K12-Nr2f1* sur le chromosome 13, une région dépourvue de gènes préalablement associés à la maladie, perturbant également une séquence non-codante très conservée dans l'évolution. *K12* est un gène d'ARN long non codant (ARNlnc) et antisens du gène *Nr2f1*, lui-même impliqué dans la gliogénèse du système nerveux central. Le séquençage du transcriptome des CCN a montré une surexpression de *Nr2f1* et des formes courtes de *K12* chez Spot et des essais luciférase ont révélé l'activité répressive de l'élément conservé. Nous avons observé l'expression de *K12* dans les CCNe et sa localisation subcellulaire dans des zones transcriptionnellement actives du noyau. Avec l'émergence des ARNlnc régulateurs, ces données nous permettent de pointer deux nouveaux gènes candidats associés à une différenciation gliale prématurée du SNE menant au mégacôlon aganglionnaire, en supposant que la régulation de *Nr2f1* se fait par son antisens, *K12*.

Mots-clés : ARN long non-codant, génétique, gliogénèse, Hirschsprung, système nerveux entérique, souris.

ABSTRACT

Hirschsprung disease is a congenital intestinal motility disorder characterized by an aganglionic segment in the distal colon. A genetic screen performed via random insertional mutagenesis in mice allowed identifying the Spot line, whose homozygotes suffer from an aganglionic megacolon. The analysis of mutant embryonic intestines revealed a decreased proliferation rate and a delay in migration of the enteric neural crest cell (eNCC) progenitors, secondary to their early glial differentiation, resulting in failure to properly colonize the intestine. Sequencing of the Spot genome indicated that the transgene was inserted into the *K12-Nr2f1* locus on chromosome 13, a region devoid of genes associated with the disease, and disrupted in addition a highly conserved non-coding sequence. *K12* is an uncharacterized long non-coding RNA (LncRNA) gene antisense to the *Nr2f1* gene, which is involved in gliogenesis in the central nervous system. Sequencing of the eNCC transcriptome revealed an overexpression of *Nr2f1* and short forms of *K12* in Spot, and luciferase assays showed repressive activity of the conserved element. We observed the expression of *K12* in the eNCC and its subcellular localization in transcriptionally active zones of the nucleus. With the recent emergence of LncRNA regulators and supposing that the regulation of *Nr2f1* is done by its antisense *K12*, these data allowed us identifying two new candidate genes associated with a premature glial differentiation leading to aganglionic megacolon.

Keywords: Enteric nervous system, genetics, gliogenesis, Hirschsprung, long non-coding RNA, mice.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	I
ABSTRACT	II
TABLE DES MATIÈRES	III
LISTE DES TABLEAUX	VII
LISTE DES FIGURES	VIII
LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS	X
REMERCIEMENTS	XIV
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION	15
CONNAISSANCES ACTUELLES	16
1.1. Le système nerveux entérique	16
1.1.1. Structure et fonctions du système nerveux entérique	16
1.1.2. Origine et développement du système nerveux entérique	19
La crête neurale et les cellules de la crête neurale pré-entériques	19
Les cellules de la crête neurale entériques	22
Les différents processus cellulaires mis en place dans le développement du système nerveux entérique	25
▪ Migration des progéniteurs	25
▪ Prolifération, mort et survie des progéniteurs	25
▪ Différenciation des progéniteurs	26
Différenciation neuronale	27
Différenciation gliale	30
_____	32
Les différentes molécules et voies de signalisation impliquées dans le développement du système nerveux entérique	33
▪ La voie de signalisation GDNF / RET	33
▪ La voie de signalisation EDN3 / EDNRB	35

▪	Le facteur de transcription Sox10 _____	36
▪	Adhésion cellule-cellule et interactions avec la matrice extracellulaire _____	38
	Adhésion cellule-cellule des cellules de la crête neurale entériques entre elles _____	38
	Adhésion des cellules de la crête neurale entériques avec la matrice-extracellulaire _____	38
1.1.3.	Pathologies associées au système nerveux entérique _____	39
	Neuropathies entériques _____	39
	La maladie de Hirschsprung _____	39
▪	Caractéristiques cliniques et traitement de la maladie _____	39
▪	Classification de la maladie _____	41
▪	Épidémiologie de la maladie _____	43
▪	Etiologie de la maladie _____	44
▪	Nouveaux modèles de souris transgéniques pour la maladie _____	44
	La lignée transgénique Spot _____	45
1.2.	Le gène <i>NR2F1</i> , membre de la super famille des récepteurs nucléaires _____	49
	Les récepteurs nucléaires _____	49
	Les membres des récepteurs nucléaires de la sous-famille 2 : <i>Nr2f1</i> et <i>Nr2f2</i> _____	50
1.3.	Les ARN longs non codants _____	53
	Biogénèse des ARN longs non codants _____	54
▪	Modification de la chromatine guidée par les ARN longs non codants _____	56
	Action en trans _____	57
	Action en cis _____	57
▪	Régulation transcriptionnelle par les ARN longs non codants _____	58
CHAPITRE 2 : HYPOTHESES _____		60
CHAPITRE 3 : OBJECTIFS ET APPROCHE GENERALE _____		61
2.1.	Quelle est l'origine embryonnaire du défaut de formation du système nerveux entérique chez Spot? _____	61
	<u>Objectif #1</u> : Caractériser le défaut embryonnaire du système nerveux entérique chez Spot _____	61

▪	Fluorescence endogène <i>Gata4</i> -RFP : Défaut de colonisation et migration chez Spot	61
▪	Immunomarquages : Différenciation, prolifération et mort cellulaires chez Spot	61
2.2.	Quelles sont les causes génétiques du défaut de formation du système nerveux entérique chez Spot?	62
	<u>Objectif #2</u> : Identifier les gènes candidats responsables du phénotype Spot	62
▪	Séquençage du génome : Localisation de l'insertion transgénique	62
▪	Séquençage du transcriptome : Mise en évidence des gènes candidats	62
▪	RT-PCR : Confirmation des profils d'expression des gènes candidats	62
▪	Essais luciférase : Évaluation de l'activité transcriptionnelle de l'élément conservé sur le locus <i>Nr2f1-K12</i>	62
▪	Souris transgéniques : Surexpression des gènes candidats dans des modèles murins et validation des gènes candidats	63
2.3.	<i>K12</i> , un gène d'ARN long non codant régulateur impliqué dans la formation du système nerveux entérique?	64
	<u>Objectif #3</u> : Définir le profil de <i>K12</i> dont rien n'est connu présentement	64
▪	RT-PCR : Les différents isoformes de <i>K12</i> et leur expression dans les CCN	64
▪	Système MS2-YFP : Localisation subcellulaire de <i>K12</i>	64
CHAPITRE 4 : MATERIEL ET METHODES		65
	Souris	65
▪	Lignée transgénique Spot	66
▪	Lignées transgéniques <i>Nr2f1</i> et <i>K12-F6R4*</i>	66
		66
	Génotypage par PCR	67
▪	Spot	67
▪	<i>Nr2f1</i> et <i>K12-F6R4*</i>	68
	Séquençages du génome et du transcriptome	70
	RT-PCR semi-quantitatives	71
▪	Confirmation du RNAseq	71
▪	Clonage des <i>K12</i>	74

Essais luciférase _____	74
Système MS2-YFP _____	75
Immunobuvardage _____	76
Statistiques _____	77
CHAPITRE 5 : RESULTATS _____	78
5.1. Quelle est l'origine embryonnaire du défaut de formation du système nerveux entérique chez Spot? _____	78
5.1.1. Migration et colonisation des CCNe durant le développement _____	78
5.1.2. Différenciation des CCNe au stade embryonnaire e15.5 _____	81
5.1.3. Différenciation des CCNe au stade embryonnaire e13.5 _____	84
5.1.4. Expression des marqueurs gliaux dans les CCNe au stade embryonnaire e12.5 _____	85
5.1.5. Différenciation neuronale des CCNe au stade embryonnaire e12.5 _____	86
5.1.6. Prolifération des CCNe au stade embryonnaire e12.5 _____	88
5.1.7. Mort/survie des CCNe au stade embryonnaire e12.5 _____	89
5.2. Quelles sont les causes génétiques du défaut de formation du système nerveux entérique chez Spot? _____	90
5.2.1. Localisation génomique du transgène Tyrosinase chez Spot _____	90
5.2.2. Dérégulation de certains gènes importants dans les CCNe des embryons Spot _____	91
5.2.3. Activité transcriptionnelle de l'élément conservé sur le locus <i>Nr2f1-K12</i> _____	94
5.2.4. La surexpression des gènes candidats dans des modèles murins permet-elle de retrouver le phénotype des souris Spot? _____	96
5.3. <i>K12</i> , un gène d'ARN long non codant régulateur impliqué dans la formation du système nerveux entérique? _____	100
5.3.1. Prédiction sur Ensembl _____	100
5.3.2. Clonage des différentes isoformes de <i>K12</i> _____	100
5.3.3. Localisation subcellulaire de <i>K12</i> _____	107
CHAPITRE 6 : DISCUSSION _____	110
CONCLUSION _____	118
BIBLIOGRAPHIE _____	119

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I.I: Classification des neuropathies entériques.	40
Tableau IV.I: Oligos utilisés pour les génotypages contrôle et mutant Spot.....	66
Tableau IV.II: Oligos utilisés pour les génotypages des embryons transgéniques pour la surexpression de <i>Nr2f1</i> et <i>K12-F6R4*</i>	68
Tableau VI.III: Anticorps utilisés pour les expériences d'immunofluorescence.	69
Tableau IV.IV: Oligos utilisés pour les RT-PCR de <i>Nr2f1</i> et des différentes formes de <i>K12</i>	72
Tableau IV.V: Oligos utilisés pour la RT-PCR de l'EC2.5.	75
Tableau V.I : D'après le séquençage du transcriptome, les différents marqueurs gliaux connus sont surexprimés chez Spot à e12.5.	85
Tableau V.II : D'après le séquençage du transcriptome, le gène <i>Nr2f1</i> et les formes courtes de <i>K12</i> sont surexprimés chez Spot, tandis que les formes longues de <i>K12</i> sont perdues.....	91
Tableau V.III : D'après le séquençage du transcriptome, les principaux gènes déjà associés à la maladie de HRSC restent plutôt stables.	93

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 : Structure du système nerveux entérique.	18
Figure 1.2 : Morphogénèse de la crête neurale et réseau de gènes régulateurs.....	20
Figure 1.3 : Migration des différentes populations de cellules de la crête neurale dans l’embryon	22
Figure 1.4 : Colonisation de l’intestin par les cellules de la crête neurale entériques	24
Figure 1.5 : Différents sous-types neuronaux qui composent le système nerveux entérique.....	29
Figure 1.6 : Différents sous-types de cellules gliales qui composent le tractus digestif	32
Figure 1.7 : GDNF/RET et EDN3/EDNRB, deux voies de signalisation majeures dans le développement du SNE.....	36
Figure 1.8 : Voies de signalisation et facteurs de transcription impliqués dans le développement du SNE	37
Figure 1.9 : Aganglionose dans la maladie de Hirschsprung	42
Figure 1.10 : Génération de la lignée transgénique Spot par mutation insertionnelle aléatoire.....	46
Figure 1.11 : Phénotype des souris Spot adultes.....	48
Figure 1.12 : Structure conservée des récepteurs nucléaires.	50
Figure 1.13 : Proportion d’ADN non-codant par rapport à l’ADN génomique total dans différents organismes.....	54
Figure 1.14 : Cycle de vie d’un ARN	55
Figure 1.15 : Organisation génomique du locus <i>Pax6</i> : transcrits codants et non codants	56
Figure 1.16 : Différents mécanismes de régulation de la transcription par les ARN longs non-codants.....	59
Figure 4.1 : Stratégies de génotypages contrôle et mutant Spot	67
Figure 4.2 : Principe du séquençage « paired-end ».	71
Figure 4.3 : Positions des oligos utilisés pour les différentes expériences de RT-PCR des différentes formes de <i>K12</i>	73
Figure 4.4 : Principe du système MS2-YFP.....	76
Figure 5.1 : Les intestins embryonnaires Spot montrent un retard de migration des CCNe associé à un défaut de colonisation du caecum qui ne sont jamais rattrapés dans le temps	80
Figure 5.2 : Une différenciation gliale précoce des CCNe est à l’origine du défaut de colonisation dans l’intestin Spot.....	82

Figure 5.3 : Une différenciation gliale précoce des CCNe est à l'origine du défaut de colonisation dans l'intestin Spot (schéma à e15.5)	83
Figure 5.4 : Le défaut de différenciation gliale précoce chez Spot est confirmé à e13.5.....	84
Figure 5.5 : La différenciation neuronale n'est pas responsable du défaut de migration des CCNe dans l'intestin embryonnaire Spot	87
Figure 5.6 : Les CCNe prolifèrent moins dans l'intestin embryonnaire Spot.....	88
Figure 5.7 : La mort cellulaire ne semble pas être inhabituelle dans l'intestin embryonnaire Spot.....	89
Figure 5.8 : Le transgène s'est inséré à l'intérieur du locus <i>Nr2f1-K12</i> sur le chromosome 13 chez Spot.	90
Figure 5.9 : Le gène <i>Nr2f1</i> et les formes courtes de <i>K12</i> sont surexprimés chez Spot.....	92
Figure 5.10 : L'insertion transgénique dans le locus <i>Nr2f1-K12</i> a perturbé un élément conservé dans l'évolution qui possède une forte activité répressive	95
Figure 5.11 : La construction Sox10.U3-Hsp68-Nr2f1-IRESeGFP est validée.....	98
Figure 5.12 : La construction Sox10.U3-Hsp68-K12(F6R4*) est validée	99
Figure 5.13 : D'après les prédictions retrouvées sur Ensembl, le gène <i>K12</i> est épissé en différentes isoformes	101
Figure 5.14 : <i>K12</i> est composé d'un premier exon alternatif, qui peut partager sa séquence avec <i>Nr2f1</i>	102
Figure 5.15 : Certaines isoformes longs de <i>K12</i> sont surexprimés dans les CCNe	104
Figure 5.16 : Certaines isoformes courts de <i>K12</i> sont surexprimés dans les CCNe.....	105
Figure 5.17 : Représentation générale du locus <i>Nr2f1-K12</i>	106
Figure 5.18 : <i>K12</i> est localisé dans des régions transcriptionnellement actives du noyau.	108
Figure 5.19 : <i>K12</i> n'est pas localisé dans le nucléole	109
Figure 6.1 : Un modèle pour le facteur de transcription Nr2f1 dans la voie de signalisation Shh et la régulation de la gliogénèse dans le système nerveux entérique	115

LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS

ADN: Acide desoxyribonucléique

AF1 : Domaine d'activation fonctionnelle 1

AF2 : Domaine d'activation fonctionnelle 2

ARN: Acide ribonucléique

ARNm : ARN messenger

ARNnc : ARN non codants

ATC : aganglionose totale du côlon

BFABP: « Brain Fatty Acid Binding Protein »

BMP: « Bone Morphogenic Proteins »

CCN: Cellules de la crête neurale

CCNe: Cellules de la crête neurale entériques

CBP: « CREB Binding Protein »

COUP-TF : « chicken ovalbumin upstream promoter transcription factors »

DHFR : dihydrofolate réductase

DLA : domaine de liaison à l'ADN

DLL : domaine de liaison au ligand

Dlx2: « Distal-Less Homeobox 2 »

Dlx6: « Distal-Less Homeobox 6 antisens »

e: jour embryonnaire

EDN3 : « Endothelin3 »

EDNRB : « Endothelin Receptor B »

ET3: « Endothelin3 »

FGF: « Fibroblast Growth Factor »

FoxD3: « Forkhead Box D3 »

GDNF: « Glial cell–line–Derived Neurotrophic Factor »

Gfap: « Glial fibrillary acidic protein»

GPI α 1: « Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored co-receptor GDNF family receptor α 1 »

Hox : Gène homéotique

HRSC: Hirschsprung

H3K27me3 : triméthylation de la lysine en position 27 de l'histone 3

H3K4me3 : triméthylation de la lysine en position 4 de l'histone 3

IPAN : neurones intrinsèques primaires afférents

K12 : A830082K12Rik

LIF: « Leukemia Inhibition Factor »

ARNlnc : ARN long non codant

MEC: matrice extracellulaire

NTN: « Neurturin »

NR2F : récepteur nucléaire de la sous-famille 2

NR2F1 : récepteur nucléaire de la sous-famille 2 membre 1 (COUP-TF1)

NR2F2 : récepteur nucléaire de la sous-famille 2 membre 2 (COUP-TF2)

P: jour post-natal

Pax3 : « Paired Box 3 »

PGP 9.5 : « Protein Gene Product 9.5 »

Phox2b : « Paired-like homeobox 2b »

p75 NGF-R : «nerve growth factor receptor»

RET: « REarranged during Transfection »

RN : récepteur nucléaire

Shh: « Sonic hedgehog »

SNA : système nerveux autonome

SNC : système nerveux central

SNE : système nerveux entérique

SNP : système nerveux périphérique

Sox10: « SRY (Sex Determining Region Y)-Box 10 »

SW4 : syndrome de Waardenburg de type 4

S100 β : « S100 calcium binding protein β »

TFIID: « Transcription Factor II D »

Tg : transgène

TGI : troubles gastro-intestinaux

TLS : « Translocated in Liposarcoma »

Tyr : Tyrosinase

*Une pensée à tous les enfants
Atteints de la maladie de Hirschsprung
Et à tous ceux qui visent à rendre leur avenir meilleur.*

REMERCIEMENTS

Le 16 Septembre 2012, je posais les pieds pour la première fois sur le sol canadien. Trois ans plus tard, je suis convaincue qu'étudier à Montréal a été une étape indispensable dans mon développement professionnel et dans mon accomplissement personnel. A la veille du dépôt de ce manuscrit, j'écris ces quelques lignes afin d'adresser mes plus sincères pensées aux personnes qui ont fait de cette expérience une réussite mais surtout un vrai bonheur.

Mes remerciements vont :

A Nicolas, qui m'a guidée tout au long de cette aventure. Saches que tu as été le meilleur directeur que j'aurais pu espérer. Merci pour ton accueil, ta confiance et ton écoute.

A Christophe Faure et Karl Bergeron, qui m'ont supportée et conseillée durant ce projet. Merci pour votre collaboration.

A mes collègues de laboratoire, qui ont rendu mon quotidien tellement meilleur et plus particulièrement à ceux qui se reconnaîtront – Daniel, Emilie, Guillaume, Rodolphe et Tatiana, pour ne pas les citer. Vous êtes devenus, plus que de simples collègues, de véritables amis. Vous allez terriblement me manquer.

A Ahmed, Amir, Natalia et Sabri, que j'ai rencontré dans une petite salle d'APP. C'est avec vous que tout a commencé et je compte bien fermer la boucle à vos côtés. Merci les amis.

A Vadim, sans qui je ne serais jamais arrivée où je suis aujourd'hui. Merci pour ton soutien sans faille. Je serai toujours là pour toi.

A mes meilleures amies, Camille et bébé Flora – qui vient de fêter son premier mois—, Chloé, Marie et Morgane, pour leur amitié qui a su traverser non seulement des années, mais aussi un océan. A nos 10 ans et aux 60 prochaines années.

A Mimi, MJS.

A ma sœur, Mélissa, à mes parents, Dung et Isabelle, et à ma chère Nelly, qui m'aiment à leur façon et c'est la meilleure des façons. Merci de me porter à bout de bras. Je vous aime de tout mon cœur.

Ces remerciements ne sont pas classés par ordre d'importance et ceci n'est pas une liste exhaustive. Je m'excuse par avance si j'ai oublié de mentionner quelqu'un, quelque chose, mais je mettrai ça sur le compte de l'émotion...

Chloé

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

Les troubles gastro-intestinaux (TGI) font partie des troubles les plus fréquents en pédiatrie. Ils ont non seulement un taux de morbidité très élevé mais ils affectent aussi grandement la qualité de vie des individus qui en souffrent. Des douleurs abdominales récurrentes et des troubles du transit sont les problèmes centraux des TGI, comme c'est le cas pour la dyspepsie fonctionnelle, la constipation chronique ou encore le syndrome du côlon irritable, l'un des TGI les plus étudiés et qui touche 10 à 20% de la population mondiale (Gwee et al., 2010; Kovacic, 2015; Y. T. Wang et al., 2015).

C'est le système nerveux entérique (SNE) qui contrôle la motilité gastro-intestinale et ce, de manière indépendante du système nerveux central (SNC), bien qu'il soit en constante interaction avec celui-ci (Bergeron et al., 2013; Heanue & Pachnis, 2007; Szyllberg & Marszalek, 2014). Le développement du SNE met en jeu des processus complexes qui impliquent différentes molécules et voies de signalisation majeures. L'orchestration de ces événements est finement contrôlée, permettant ainsi la formation d'un SNE fonctionnel et complet. Les connaissances actuelles indiquent que de nombreuses neuropathies entériques sont dues à un défaut congénital de formation du SNE (Furness, 2012; Sasselli, Pachnis, & Burns, 2012). La maladie de Hirschsprung (HSCR) ou mégacôlon aganglionnaire est la neuropathie entérique la plus connue mais dont l'étiologie et les causes génétiques ne sont que partiellement comprises aujourd'hui (Sasselli et al., 2012).

Avec la caractérisation d'un nouveau modèle de souris transgénique pour le mégacôlon aganglionnaire, mon projet de recherche dans le laboratoire de génétique moléculaire du Dr Pilon vise, de manière générale, une meilleure compréhension des maladies congénitales qui affectent le SNE. Ceci permettra ultimement de faciliter le dépistage, le diagnostic et le traitement des patients atteints de HSCR.

CONNAISSANCES ACTUELLES

Ce premier chapitre est découpé en trois parties distinctes. Dans une première partie, nous abordons le SNE, avec un aperçu général sur sa structure et ses fonctions suivi d'une emphase particulière sur son origine et son développement dans l'embryon et enfin certaines pathologies qui lui sont associées. Dans une deuxième partie, nous dressons un état des connaissances à propos du gène *Nr2f1*. Enfin, une troisième partie est consacrée aux ARN longs non codants et leur potentiel de régulation génique.

1.1. Le système nerveux entérique

1.1.1. Structure et fonctions du système nerveux entérique

L'appareil digestif ou tractus digestif est un ensemble d'organes d'origines endodermique et mésodermique qui commence par la bouche, cavité par laquelle les aliments sont ingérés, et se termine par l'anus, canal par lequel les résidus sont évacués (Chutkan, 2001; Gatta et al., 2012; Newgreen, Dufour, Howard, & Landman, 2013). Entre les deux extrémités de l'appareil digestif, se trouve le tube digestif qui est composé, suivant l'axe antéro-postérieur, par : l'œsophage, l'estomac, le petit intestin ou intestin grêle, le gros intestin ou côlon et le rectum. Il comprend aussi des organes annexes qui interviennent dans la digestion et l'absorption des aliments : le foie, la vésicule biliaire, le pancréas et les glandes salivaires (Gershon, 1998). Dans un souci de simplicité, le terme général intestin est utilisé pour parler de l'appareil digestif. L'intestin diffère des autres organes périphériques puisqu'il contient un système nerveux intrinsèque qui contrôle ses fonctions, le SNE (Bergeron et al., 2013; Furness, 2012). Chez les vertébrés, c'est la partie la plus grande et la plus complexe du système nerveux périphérique et autonome (SNP et SNA). En effet, il a été démontré qu'il contient au moins autant de neurones que la moelle épinière et un réseau de neurotransmetteurs et de neuromodulateurs similaire à celui du SNC (Gershon, 1998; Karaosmanoglu, Aygun, Wade, & Gershon, 1996).

La **figure 1.1** représente la structure du SNE. La paroi intestinale est composée de trois couches principales : la muqueuse, la sous-muqueuse et le muscle. La couche de muscle est composée de deux épaisseurs différentes qui sont parallèles entre-elles mais dont les fibres ont des directions perpendiculaires : le muscle circulaire entoure l'intestin de manière interne tandis que le muscle longitudinal y court à l'extérieur (Bergeron et al., 2013; Heanue & Pachnis, 2007). Le SNE est un réseau interconnecté de neurones et de cellules gliales, groupés en ganglions qui forment deux plexus ganglionnaires principaux, ancrés dans la paroi intestinale. Le plexus myentérique (plexus d'Auerbach), plus externe, se développe en premier au cours de l'embryogénèse et se situe à l'interface entre les deux épaisseurs de muscles circulaire et longitudinal. Le plexus sous-muqueux (plexus de Meissner), se forme plus tardivement et réside au sein de la sous-muqueuse (Furness, 2012).

Concernant les fonctions du SNE, celles-ci sont multiples et variées: le SNE active les réflexes de motilité du tractus digestif, régule les échanges de fluides (eau, électrolytes) à travers l'épithélium de la muqueuse intestinale et contrôle le flux sanguin local, les sécrétions d'acide gastrique et d'hormones intestinales (Heanue & Pachnis, 2007; Sasselli et al., 2012). C'est le plexus myentérique qui exerce majoritairement le contrôle de la motilité du tractus digestif tandis que le plexus sous-muqueux est plutôt impliqué dans les fonctions de régulation des sécrétions et de l'environnement de la lumière intestinale (Bergeron et al., 2013; Hao & Young, 2009; Kenny, Tam, & Garcia-Barcelo, 2010). Ainsi, le SNE permet la digestion mécanique des aliments et liquides ingérés par la bouche en activant des mouvements de segmentation et des mouvements péristaltiques propulsifs du tractus digestif, associée à une digestion chimique par les acides et enzymes contenus dans le suc gastrique (Butler Tjaden & Trainor, 2013; Kenny et al., 2010). En interaction avec le système immunitaire de l'intestin, le SNE a également un rôle majeur dans la reconnaissance et la réponse aux agents pathogènes introduits (Furness, 2012). Autonome, il opère de manière indépendante pour coordonner la motilité de l'intestin, à l'exception de la défécation, contrôlée par le SNC (Furness, 2012).

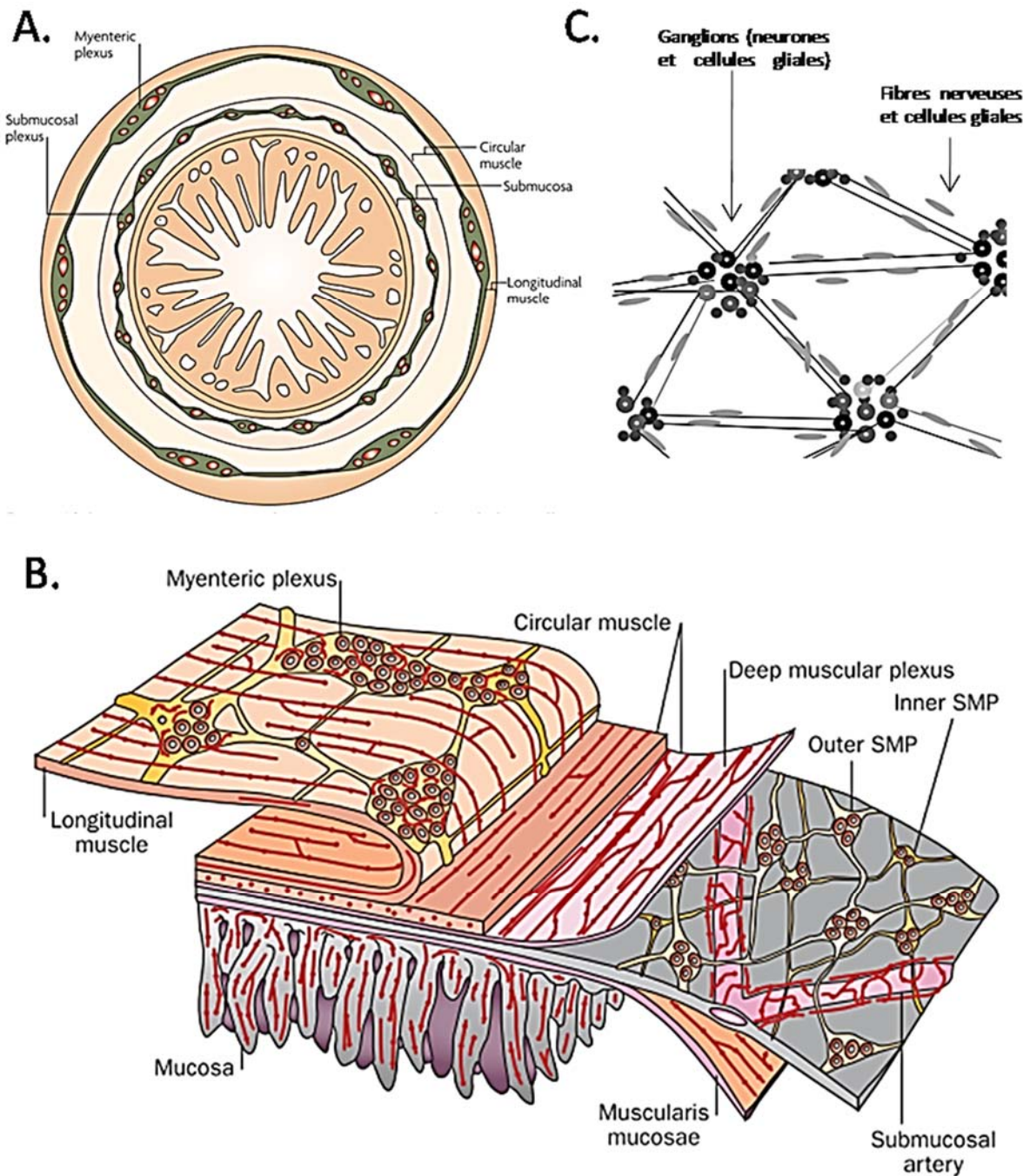


Figure 1.1 : Structure du système nerveux entérique. A et B. Le SNE est formé par deux plexus ganglionnaires principaux : le plexus myentérique, situé entre la couche de muscle longitudinale et la couche de muscle circulaire et le plexus sous-muqueux à l'intérieur de la sous-muqueuse. Adaptée de Heanue & Pachnis, 2007 et Furness, 2012. C. La représentation schématique du réseau ganglionnaire du SNE montre les neurones entourés de cellules gliales pour former les ganglions et les fibres nerveuses également associées à des cellules gliales pour relier les ganglions entre eux. Adaptée de Newgreen, Dufour, Howard & Landman, 2013.

1.1.2. Origine et développement du système nerveux entérique

En 1954, Yntema et Hammond furent les premiers à identifier la crête neurale comme l'origine du SNE. Une ablation de la région vagale de la crête neurale d'embryons aviaires empêchait la formation normale des ganglions entériques le long du tractus digestif. Vingt ans plus tard, en 1973, des expériences de greffe chez l'embryon de poulet permirent à Nicole Le Douarin de cartographier précisément la présence des cellules précurseur du SNE dans la crête neurale. Elle montra que ce sont les cellules de la crête neurale (CCN) qui émigrent de la région vagale – adjacente aux somites 1 à 7 – pour coloniser toute la longueur de l'intestin selon l'axe rostro-caudal et former la majorité du SNE. En outre, elle montra qu'une deuxième population de CCN d'origine sacrée – postérieure au 28^{ème} somite – contribue également à la formation du SNE au niveau du côlon mais dans une bien moindre mesure (Burns & Le Douarin, 2001; Le Douarin & Teillet, 1973).

La crête neurale et les cellules de la crête neurale pré-entériques

Les os du crâne, le cartilage de la face, les pigments de la peau, certaines cellules du cœur, les neurones et cellules gliales qui composent le SNE du tractus digestif ont une chose en commun : ils sont tous dérivés de la crête neurale (Gammill & Bronner-Fraser, 2003). La crête neurale est une population de cellules, présente uniquement chez les vertébrés, qui est souvent appelée la quatrième couche germinale puisqu'elle se forme avec les autres couches germinales et donne naissance à de nombreux types cellulaires et tissulaires (Munoz & Trainor, 2015; Stuhlmeier & Garcia-Castro, 2012). Remarquable population de cellules embryonnaires multipotentes, les CCN contribuent à la formation de pratiquement tous les organes du corps d'un vertébré adulte.

La **figure 1.2 (A)** montre la formation du tube neural et de la crête neurale durant le développement embryonnaire. Dans la première phase du développement neural, le tissu neural est induit dans la couche ectodermale de l'embryon. L'ectoderme est alors divisé en trois parties distinctes : l'ectoderme neural ou plaque neurale, qui donnera naissance au SNC, l'ectoderme non-neural qui formera l'épiderme, et les cellules à l'interface entre

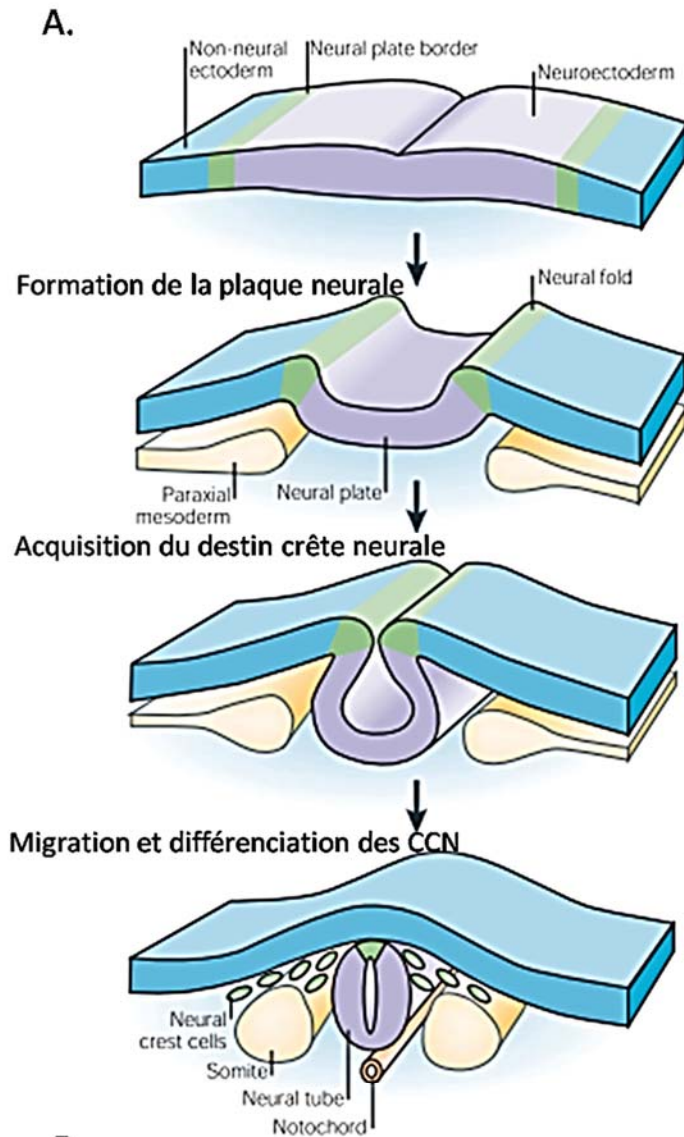
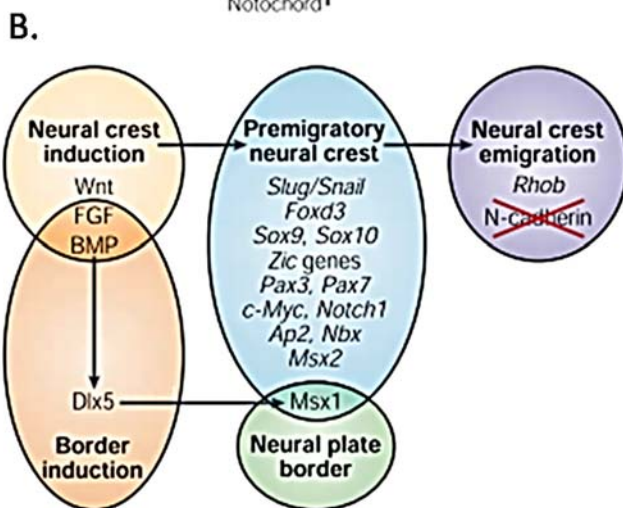


Figure 1.2 : Morphogénèse de la crête neurale et réseau de gènes régulateurs.

Adaptée de Gammill&Bronner-Fraser, 2003.

A. Durant la neurulation, la plaque neurale (violet) est la première à se former. Les bords de la plaque neurale s'élèvent pour former les replis neuraux, induits par une signalisation entre l'ectoderme neural (violet) et l'ectoderme non-neural (bleu) ainsi que du mésoderme paraxial (jaune). La plaque neurale s'enroule sur elle-même et forme le tube neural. Une partie des cellules des bordures de la crête neurale forme le tube neural dorsal et l'autre partie délamine et émigre du tube neural, devenant ainsi les cellules de la crête neurale qui migrent dans tout l'embryon.



B. Les gènes régulateurs de la crête neurale forment un réseau complexe. La crête neurale et les bords de la plaque neurale sont induits séparément par des facteurs sécrétés, dont certains sont communs (FGF et BMP), ayant pour conséquence l'expression de gènes dans les cellules des replis neuraux, les cellules de la crête neurale pré-migratoires. Ceci change l'expression d'autres gènes et mène à l'émigration des cellules de la crête neurale.

l'ectoderme neural et l'ectoderme non-neural, qui sont appelées cellules des bordures de la plaque neurale et qui deviendront la crête neurale (Gammill & Bronner-Fraser, 2003; Stuhlmiller & Garcia-Castro, 2012; Weston & Thiery, 2015). Durant le processus de neurulation, la plaque neurale est la première formée, elle s'invagine ensuite pour former une gouttière qui, une fois fermée, donnera le tube neural. Ce sont les bordures de la plaque neurale qui s'épaississent, forment les replis ou bourrelets neuraux et se rejoignent pour fermer le tube neural. Par la suite, une partie des cellules des bordures de la plaque neurale forme le tube neural dorsal tandis que l'autre partie émigre du tube neural dorsal pour se disperser dans l'embryon, et notamment dans le futur tractus digestif (Ruhrberg & Schwarz, 2010). La crête neurale n'est alors une population définie qu'à partir du moment où les cellules se détachent du tube neural et commencent leur migration. Avant, elles sont souvent appelées CCN pré-migratoires (Stuhlmiller & Garcia-Castro, 2012).

En terme de régulation, c'est une combinaison de signaux intégrés dans un réseau complexe qui induit initialement la formation de la plaque neurale puis, la formation des bordures de la plaque neurale et enfin l'émigration des CCN (**Figure 1.2 B**) (Gammill & Bronner-Fraser, 2003). La formation des cellules précurseur aux bordures de la plaque neurale et de la crête neurale sont induites par des facteurs sécrétés communs – comme les BMP¹et FGF². Deux types de signalisations sont alors mis en jeu : une signalisation qui a lieu entre l'ectoderme neural et l'ectoderme non-neural voisin (Selleck & Bronner-Fraser, 1995; Streit & Stern, 1999) ainsi que des signaux provenant du mésoderme paraxial sous-jacent (Dickinson, Selleck, McMahon, & Bronner-Fraser, 1995; Selleck & Bronner-Fraser, 1995). Ces facteurs sécrétés déclenchent l'expression d'un second lot de gènes dits spécificateurs de la crête neurale – tels que *FoxD3*³ et *Sox10*⁴ – qui contrôlent le comportement de la crête neurale, de la délamination des CCN jusqu'à leur migration et différenciation dans l'embryon (Stuhlmiller & Garcia-Castro, 2012). Ces gènes spécificateurs de la crête neurale induisent notamment l'expression de molécules

¹«Bone Morphogenic Proteins»

²«Fibroblast Growth Factor»

³«Forkhead Box D3»

⁴«SRY (Sex Determining Region Y)-Box 10»

d'adhésion cellulaire et de changement de morphologie cellulaire qui provoquent la délamination des CCN durant un processus connu sous le nom de transition épithélio-mésenchymale. Par la suite, les CCN poursuivent chacune une voie de migration précise, sous l'influence de molécules d'adhésion et signaux de guidance sécrétés, pour finalement se différencier dans une zone et en un type cellulaire cibles (Ruhrberg & Schwarz, 2010). Puisqu'elles commencent leur différenciation pendant leur migration, la question de savoir à quel moment le destin et la spécification des CCN sont scellés reste encore largement controversée et discutée dans de nombreux articles (Dupin & Sommer, 2012; McKinney et al., 2013; Ruhrberg & Schwarz, 2010; Sasselli et al., 2012).

Les cellules de la crête neurale entériques

Les CCN forment une population hétérogène de par leur remarquable potentiel de différenciation. Elles sont classées en sous-populations en fonction de leur origine selon l'axe antéro-postérieur, avec notamment les CCN d'origine vagale et d'origine sacrale qui participent à la formation du SNE (Figure 1.3) (Bergeron et al., 2013).

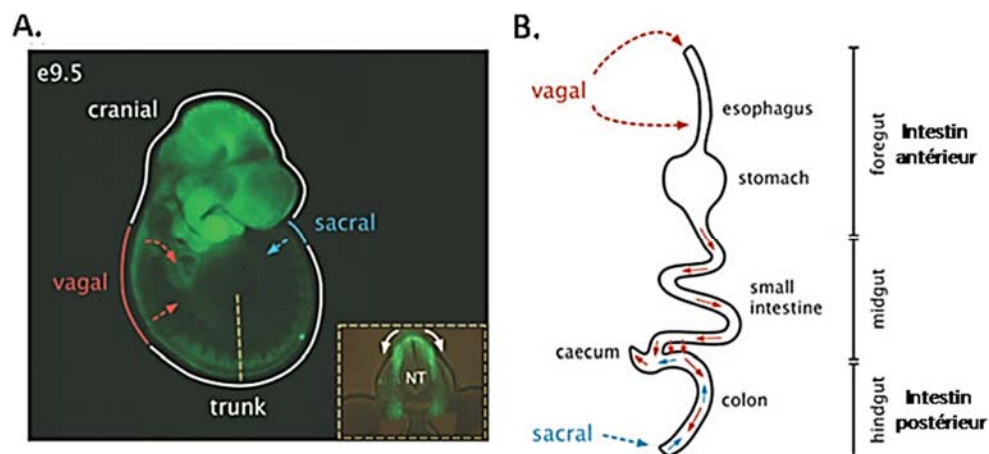


Figure 1.3 : Migration des différentes populations de cellules de la crête neurale dans l'embryon. A. Les doubles transgéniques *Wnt1-Cre::R26R-YFP* présentent des CCN marquées de manière endogène par la YFP. Celles-ci émigrent du tube neural et migrent dans tout l'embryon (flèches blanches) selon des patrons de migration différents en fonction de leur origine : craniale, vagale, troncale et sacrale. B. Le SNE est dérivé des CCN d'origine vagale (rouge) et sacrale (bleu) – dans une moindre mesure. (Bergeron, Silversides, & Pilon, 2013)

La **figure 1.4** représente la migration des CCN depuis le moment où elles se détachent du tube neural jusqu'à leur arrivée dans le côlon. Les CCN d'origine vagale émigrent du tube neural autour du jour embryonnaire 8.5 (e8.5) chez la souris et migrent de manière dorso-ventrale pour atteindre la partie du tractus digestif antérieure qui est le futur œsophage et le futur estomac à e9 ou e9.5 (Anderson, Stewart, & Young, 2006; Sasselli et al., 2012). Plus exactement, les CCN d'origine vagale se dédoublent en deux groupes qui suivent des voies de migration différentes : un groupe antérieur qui contribue à la majorité des CCN entériques (CCNe) et un groupe plus postérieur qui ne représente qu'une petite partie des CCNe (**Figure 1.3**) (Bergeron et al., 2013; Durbec, Larsson-Blomberg, Schuchardt, Costantini, & Pachnis, 1996). C'est à partir de ce moment-là que les CCN sont qualifiées d'entériques puisqu'elles vont migrer dans le mésenchyme intestinal selon l'axe rostro-caudal afin de coloniser, de manière séquentielle, toute la longueur de l'intestin en développement (œsophage, estomac, petit intestin, caecum et côlon) et ainsi contribuer à la formation complète du SNE qui se termine à e14.5 environ. Les CCN d'origine sacrale émigrent du tube neural un jour plus tard que leurs homologues vagues et, migrent de manière ventrale pour d'abord former les ganglions pelviens extrinsèques – adjacents au tractus digestif postérieur – puis, poursuivent leur migration de manière caudo-rostrale dans l'intestin afin de coloniser le futur côlon.

En définitive, ce sont les CCN d'origine vagale, plus invasives, qui constituent la vaste majorité des cellules progénitrices de SNE. Les CCN d'origine sacrale envahissent le côlon quand les CCN vagues y sont présentes. De plus, des expériences d'ablation des CCN vagues ont montré que les CCN sacrales avaient besoin des CCN vagues pour proliférer et ne suffisaient pas à combler un manque de CCNe d'origine vagale pour former un SNE correct (Anderson, Stewart, et al., 2006; Burns & Le Douarin, 2001).

La colonisation complète de l'intestin dure 5 à 6 jours chez la souris, d'e9 à e14.5 environ. Elle a lieu en parallèle avec la croissance et les réarrangements du tissu intestinal (Bergeron et al., 2013; Butler Tjaden & Trainor, 2013; Lake & Heuckeroth, 2013; Sasselli et al., 2012). Cette période de colonisation de l'intestin par les CCNe – relativement longue – correspond aux semaines 4 à 7 chez l'embryon humain (Fu, Lui, Sham, Cheung, & Tam, 2003).

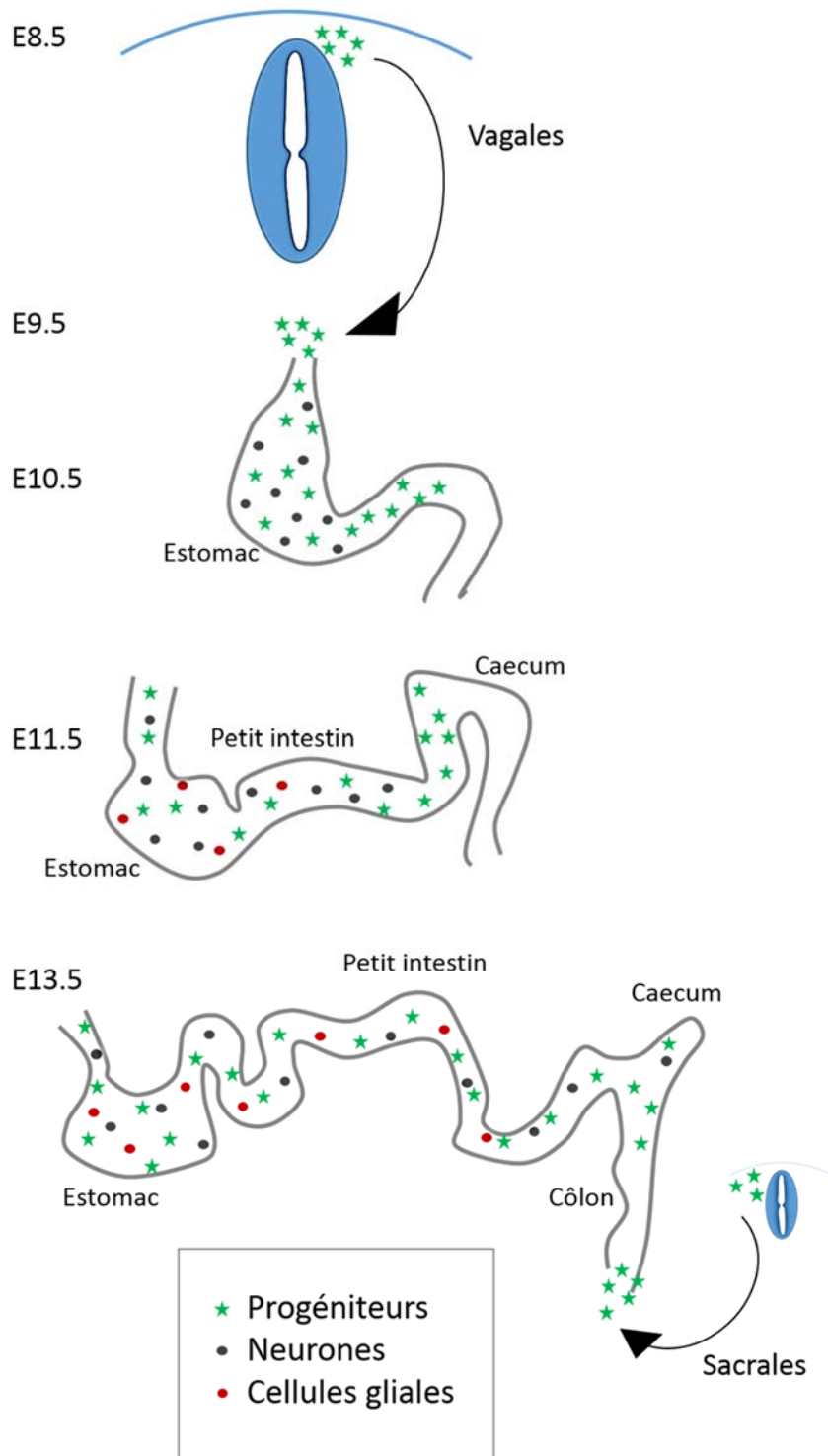


Figure 1.4 : Colonisation de l'intestin par les cellules de la crête neurale entériques. Les CCN d'origine vagale émigrent du tube neural à e8.5 pour atteindre l'œsophage à e9/9.5 et ainsi coloniser la totalité de l'intestin en développement qui se termine normalement à e14.5. Ce sont les CCN vagales qui contribuent à la majorité de la formation du SNE, accompagnées des CCN sacrales dans la portion distale du côlon les derniers jours. Adaptée de Sasselli, Pachnis & Burns, 2012.

Les différents processus cellulaires mis en place dans le développement du système nerveux entérique

Dans la colonisation de l'intestin, les CCNe sont associées à plusieurs processus cellulaires. Au cours de leur migration, les CCNe progénitrices répondent à des signaux de prolifération et de survie leur permettant de coloniser de nouvelles régions de l'intestin, plus postérieures. Au fur et à mesure, certaines d'entre-elles s'arrêtent de proliférer pour se différencier et générer les différents types de neurones et de cellules gliales qui forment les ganglions.

Le développement du SNE est un processus complexe et asynchrone qui requiert une coordination parfaite de ces processus à l'intérieur du tractus digestif : migration, prolifération, survie et différenciation des CCNe progénitrices. Tout événement qui affecte un ou plusieurs de ces processus compromet la formation d'un SNE fonctionnel et peut ainsi mener à la maladie HSCR (Butler Tjaden & Trainor, 2013).

- **Migration des progéniteurs**

Grâce à la microscopie en temps réel, il est possible d'analyser attentivement le mode de migration des CCNe, qui sont marquées de manière endogène par la fluorescence, durant le développement embryonnaire (Kapur, Yost, & Palmiter, 1992; Nowotschin & Hadjantonakis, 2014; Young et al., 1998). Les CCNe qui se trouvent en tête du flux de migration sont interconnectées et forment des chaînes ou bras de migration : elles sont désignées comme le front de migration (Druckenbrod & Epstein, 2007; Young et al., 2004). Les cellules appartenant au front de migration présentent une expansion caudale importante alors que les cellules qui suivent le front ont une expansion plus limitée : c'est le front de migration qui est responsable de la colonisation de l'intestin (Druckenbrod & Epstein, 2007).

- **Prolifération, mort et survie des progéniteurs**

Dès que les CCNe envahissent le tractus digestif, elles prolifèrent activement afin d'amplifier le petit groupe de cellules progénitrices qui doivent coloniser l'intégralité de l'intestin. Le nombre de cellules progénitrices de départ est un facteur important dans la colonisation

rostro-caudale de l'intestin puisque des expériences d'ablation montrent que la colonisation est incomplète si le nombre initial de CCN d'origine vagale est réduit (Yntema & Hammond, 1954).

Le nombre de CCNe est crucial à l'entrée du tractus digestif mais il est aussi essentiel au niveau du front de migration. Les cellules du front de migration montrent un taux de prolifération anormalement bas si elles sont isolées. En effet, les CCNe du front de migration sont responsables de la colonisation de nouvelles régions de l'intestin, plus caudales, alors que les CCNe derrière le front de migration augmentent leur nombre pour coloniser de manière complète la région préalablement envahie par le front (Simpson, Zhang, Mariani, Landman, & Newgreen, 2007; Young, Turner, & Bergner, 2005). Le taux de cellules en prolifération est constant dans toutes les régions du SNE, quelle que soit la position relative du front de migration dans l'intestin.

De plus, des programmes de mort cellulaire contrôlent le nombre de CCN pré-entériques qui arrivent dans le tractus digestif. En effet, si celles-ci prolifèrent activement une fois qu'elles ont pénétré dans l'intestin, leur densité semble également être critique avant leur arrivée. Des expériences *in vivo* d'inhibition des effecteurs apoptotiques – les caspases – dans les CCN pré-entériques d'origine vagale induisent une hyperganglionose et un défaut dans les régions proximales de l'intestin (Lake & Heuckeroth, 2013; Wallace et al., 2009).

- **Différenciation des progéniteurs**

Les CCNe à l'état progéniteur doivent décider de se renouveler ou bien de se différencier, soit en neurone, soit en cellule gliale. Des millions de neurones et de cellules gliales sont présents dans un intestin adulte (Gianino, Grider, Cresswell, Enomoto, & Heuckeroth, 2003) mais une balance entre prolifération et différenciation est indispensable afin de maintenir un groupe de progéniteurs adéquat. Ainsi, durant la colonisation, les processus de différenciation cellulaire fonctionnent de concert avec celui de la prolifération.

Durant la colonisation, la plupart des CCNe caudales sont indifférenciées : elles co-expriment

plusieurs marqueurs tels que Sox10, p75⁵ et Ret⁶ (Barlow, de Graaff, & Pachnis, 2003; Young et al., 1998). Derrière le front de migration, les CCNe sont à différents stades de différenciation et les neurones apparaissent avant les cellules gliales (Young, Bergner, & Muller, 2003).

Différenciation neuronale

La différenciation neuronale est mise en place rapidement après que les CCN d'origine vagale aient envahi le tractus digestif antérieur. À e10.5, 10 à 15% des CCNe ont commencé à se différencier en neurones dans le petit intestin. La différenciation neuronale est accompagnée par une diminution des marqueurs Sox10 et p75, une maintenance de Ret et une apparition de marqueurs pan-neuronaux tels que PGP9.5⁷ et les protéines de liaisons à l'ARN HuC et HuD (HuC/D) (Sato & Heuckeroth, 2008; Young et al., 2003; Young et al., 2005). À ce stade, ces cellules sont destinées à devenir des neurones mais restent des neurones immatures à l'état progéniteur tant qu'elles n'expriment pas un marqueur spécifique à un sous-type neuronal et qu'elles subissent toujours des mitoses (Baetge & Gershon, 1989; Hao & Young, 2009). Ainsi, elles continuent à migrer jusqu'à ce qu'elles se différencient définitivement en différents sous-types neuronaux (Lake & Heuckeroth, 2013).

Initialement, l'histologiste russe Dogiel avait identifié plusieurs sous-types de neurones entériques selon leur morphologie et deux d'entre-eux ont perduré dans le temps : les neurones de type I ont un seul axone long et plusieurs dendrites tandis que les neurones de type II ont plusieurs longs axones (**Figure 1.5**). Dogiel avait déjà suggéré une fonction motrice aux neurones de type I et une fonction sensitive aux neurones de type II (Brehmer, Schrod, & Neuhuber, 1999). Aujourd'hui, cette classification a été affinée en intégrant une combinaison de caractéristiques tels que la morphologie, le code neurochimique, le tissu cible, la longueur et l'orientation des axones.

⁵ p75 NGF-R: «Nerve Growth Factor Receptor»

⁶«REarranged during Transfection»

⁷«Protein Gene Product 9.5»

Finalement, près de vingt différentes sous-populations de neurones ont été identifiées dans le SNE et sont groupées en trois catégories fonctionnelles : les neurones intrinsèques primaires afférents (IPAN) ou neurones sensitifs qui possèdent la morphologie de type II de Dogiel, les interneurones ascendants et descendants, et les neurones moteurs excitateurs et inhibiteurs qui possèdent la morphologie de type I de Dogiel (**Figure 1.5**). Les neurones sensitifs reçoivent des informations qui proviennent de récepteurs dans la muqueuse et dans le muscle en réponse à des stimuli mécaniques, thermiques, osmotiques et chimiques. Les interneurones, comme leur nom l'indique, intègrent les informations envoyées par les neurones sensitifs et les transmettent aux neurones moteurs. Les neurones moteurs excitateurs et inhibiteurs du plexus myentérique interagissent à la fois avec le muscle circulaire et avec le muscle longitudinal afin de gouverner les fonctions du tractus digestif, notamment la motilité (Bergeron et al., 2013; Furness, 2012; Laranjeira & Pachnis, 2009).

D'autre part, les neurones sont souvent définis par le type de neurotransmetteur qu'ils produisent et libèrent. Les neurones dits cholinergiques libèrent de l'acétylcholine au niveau de leurs synapses et ce sont les neurones les plus abondants dans le SNE adulte. Ils assument plusieurs rôles physiologiques mais sont principalement constitués par des neurones sensitifs et des neurones moteurs excitateurs. Bien qu'ils représentent 60% des neurones du SNE adulte, ils travaillent en association avec les neurones non-cholinergiques afin de contrôler les mouvements de motilité du tractus digestif. Le marqueur exprimé par ce type de neurones est la choline acétyl transférase – enzyme synthétique de l'acétylcholine (Erickson et al., 2014; Murphy, Defontgalland, Costa, Brookes, & Wattchow, 2007).

L'assemblage d'un circuit neuronal fonctionnel dans le SNE dépend de la génération des sous-types neuronaux spécifiques avec des projections et connections qui leur sont spécifiques. La façon dont sont générés ces multiples sous-types neuronaux durant le développement soulève une question centrale qui reste obscure en neurobiologie de nos jours. Une meilleure connaissance des mécanismes qui génèrent cette diversité permettrait l'application de thérapies cellulaires pour les neuropathies entériques (Hao & Young, 2009).

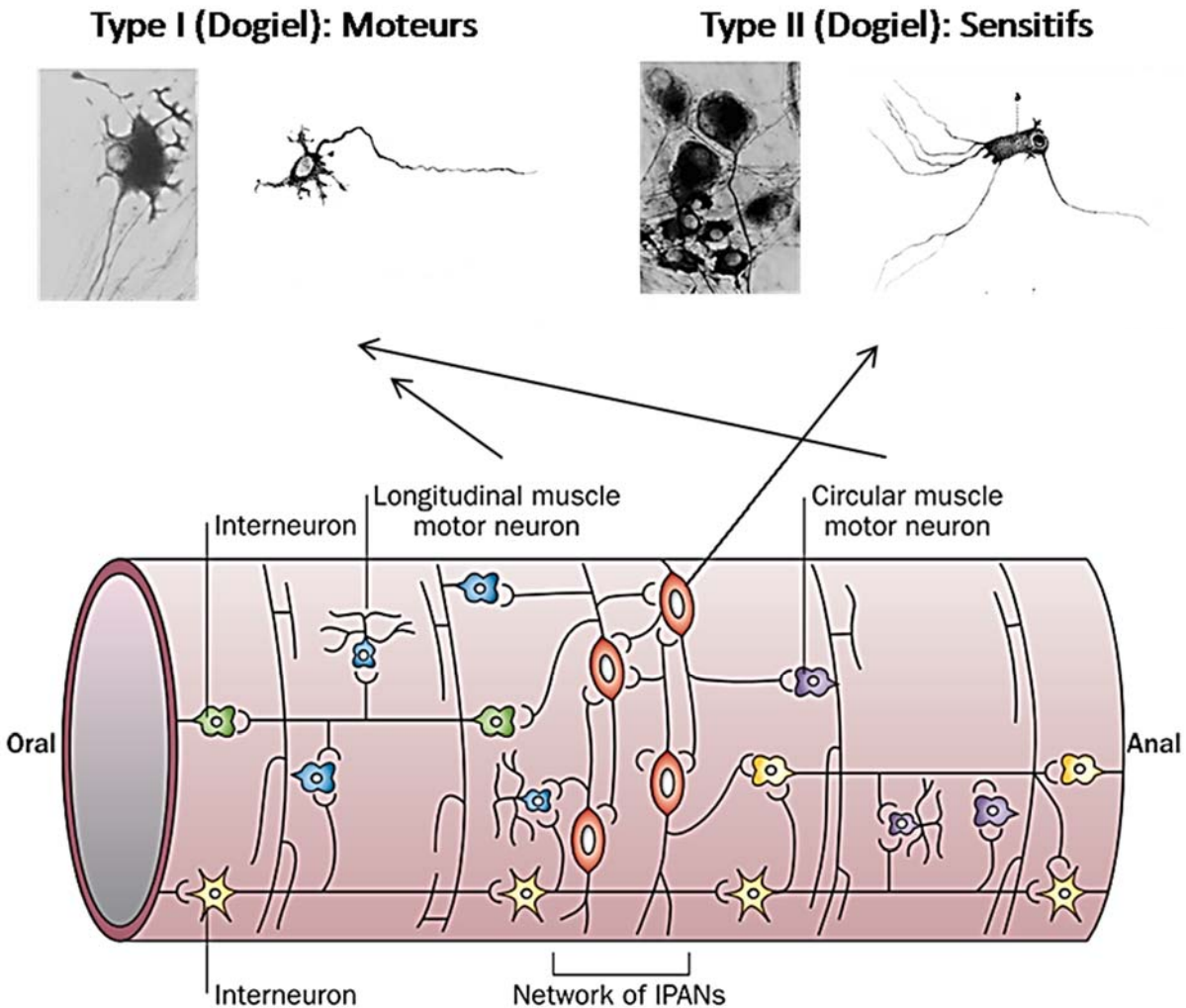


Figure 1.5 : Différents sous-types neuronaux qui composent le système nerveux entérique.

Les neurones entériques sont classés en différents sous-types selon leur fonction et leur morphologie. La classification morphologique de Dogiel identifie les neurones de type I, avec un long axone et plusieurs dendrites, et les neurones de type II, avec plusieurs axones. Il propose une fonction motrice pour les neurones de type I contre une fonction sensitive pour les neurones de type II. C'est un réseau de neurones interconnectés qui compose le SNE et contrôle la motilité de l'intestin. Cette représentation schématique montre les neurones sensitifs (rouge), connectés aux interneurons descendants (jaune) et ascendants (vert) et aux neurones moteurs excitateurs (bleu) et inhibiteurs (violet). Adaptée de Brehmer, 2006; Brehmer, Schrodli & Neuhuber, 1999 et Furness, 2012.

Différenciation gliale

À la suite de l'apparition des progéniteurs neuronaux qui se différencient d'abord, les premiers progéniteurs gliaux sont identifiés dans les régions proximales de l'intestin à partir de e11.5 (Young et al., 2003). À ce stade ils expriment uniquement le marqueur précoce B-FABP⁸ et sont localisés très loin derrière le front de migration : alors que les CCNe ont colonisé le caecum et commencent à envahir les régions post-caecum, les cellules B-FABP+ ne sont retrouvées que dans l'intestin proximal, dans la région post-estomac (Young et al., 2003). L'expression de Sox10 et p75 est également maintenue et, c'est beaucoup plus tard que les marqueurs gliaux S100β⁹ et GFAP¹⁰ apparaissent, à e14.5 et e16.5 respectivement (Rothman, Tennyson, & Gershon, 1986).

Les cellules gliales sont, soit en contact direct avec les différents neurones dans les ganglions nerveux entériques, soit associées avec les fibres nerveuses qui relient les ganglions. Dans le SNE adulte, il y a au moins autant de cellules gliales que de neurones (Hao & Young, 2009). Typiquement, elles sont de petite taille et de forme étoilée. Les cellules gliales peuvent aussi être classées selon leur morphologie puisque celle-ci diffère selon leur localisation (Boesmans, Lasrado, Vanden Berghe, & Pachnis, 2015; Coelho-Aguiar Jde et al., 2015).

Une première classification de Hanani et Reichenbach avait d'abord identifié deux types de cellules gliales dans le SNE (Hanani & Reichenbach, 1994). Les cellules gliales de type I ou type protoplasmique étaient celles qui se trouvent au sein d'un ganglion et qui possèdent une multitude de filaments et de branchements connectés – de manière irrégulière – avec les cellules gliales et neuronales voisines. Les cellules gliales de type II ou type fibreux étaient celles qui sont situées entre les ganglions et qui possèdent des filaments parallèles entre eux et connectées – de manière régulière – aux fibres nerveuses interganglionnaires (**Figure 1.6**) (Boesmans et al., 2015; Coelho-Aguiar Jde et al., 2015).

⁸« Brain Fatty Acid Binding Protein »

⁹ « S100 calcium binding protein β »

¹⁰ « Glial Fibrillary Acidic Protein »

Plus récemment, deux autres classes de cellules gliales ont été identifiées dans la paroi intestinale. Les cellules gliales de type III ou type muqueux sont localisées sous l'épithélium de la muqueuse avec des filaments longs et branchés tandis que les cellules gliales de type IV ou type musculaire sont allongées et courent avec les fibres nerveuses au sein des couches musculaires (**Figure 1.6**) (Gulbransen & Sharkey, 2012).

Tout comme les neurones, les cellules gliales sont essentielles pour l'organisation et la fonction du SNE. En plus de leurs rôles traditionnels de support nutritif, de protection et de soutien pour les neurones, les cellules gliales interviennent dans de nombreuses autres fonctions (Coelho-Aguiar Jde et al., 2015). Les cellules gliales intraganglionnaires et interganglionnaires du SNE sont parfaitement placées pour répondre et moduler l'activité neuronale en régulant la transmission synaptique. Les cellules gliales qui sont dans la muqueuse contrôlent les fonctions de la barrière intestinale en influençant les cellules épithéliales – différenciation, adhésion, migration et prolifération. En revanche, les connaissances concernant les cellules gliales intramusculaires sont plus limitées (Gulbransen & Sharkey, 2012).

En outre, des différences entre l'expression de récepteurs et de canaux suggèrent aussi une hétérogénéité des cellules gliales au sein d'un même ganglion (Costagliola, Van Nassauw, Snyders, Adriaensen, & Timmermans, 2009).

Au même titre que le réseau neuronal, l'assemblage d'un circuit glial fonctionnel dans le SNE mais aussi dans la paroi intestinale durant le développement est un processus essentiel qui passe par la génération de sous-types gliaux spécifiques.

De manière intéressante, une fois que la neurogénèse est complétée dans le SNE, les progéniteurs gliaux qui expriment Sox10 et GFAP régulent à la baisse leur capacité neurogénérative : seule une infime augmentation de neurones est observée dans le SNE adulte. Au contraire, les progéniteurs gliaux qui expriment Sox10 et GFAP conservent leur capacité à générer des cellules gliales chez l'adulte et une activité gliogénique, même si elle est basse, perdue dans le SNE adulte (Joseph et al., 2011; Laranjeira et al., 2011).

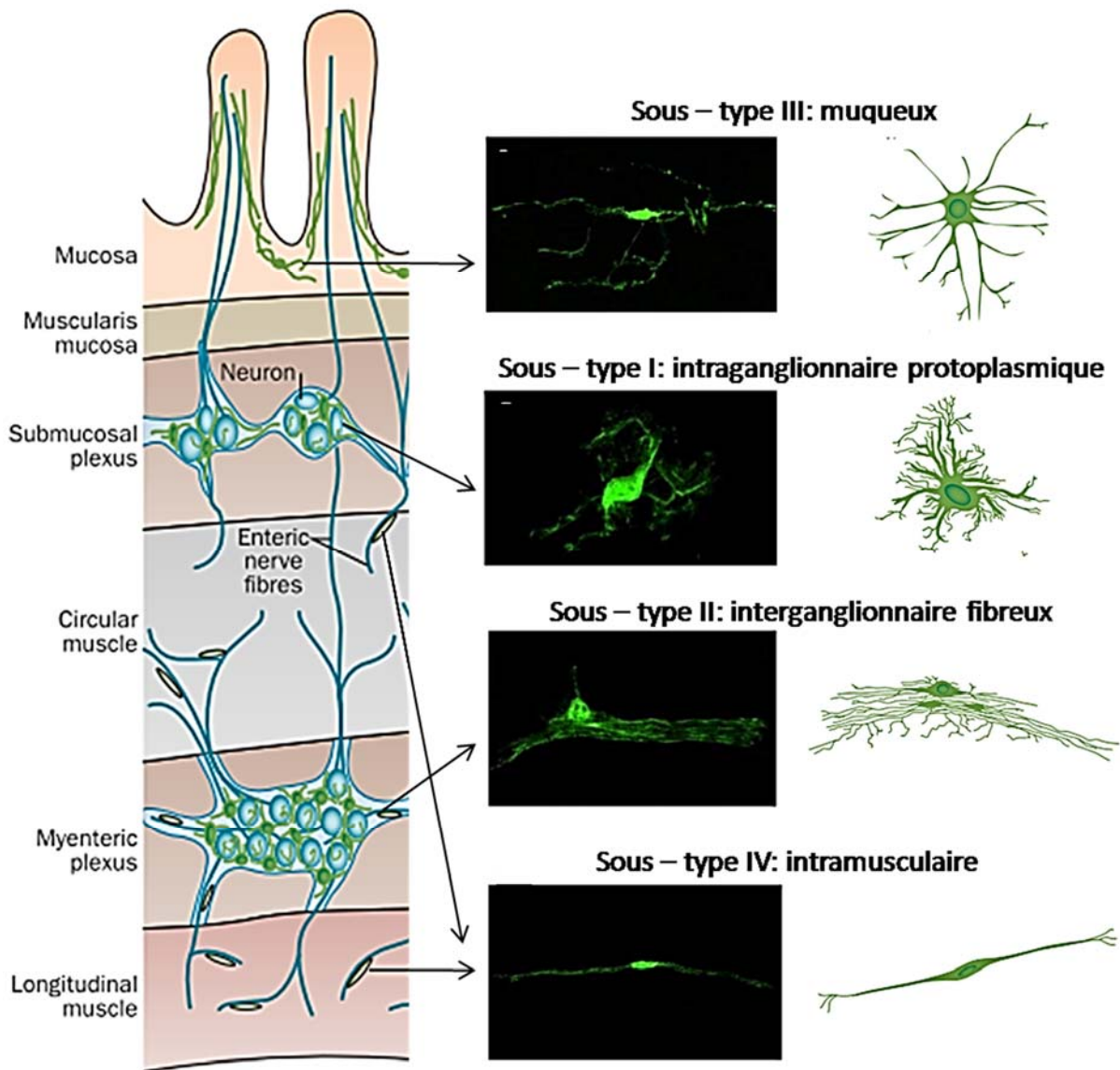


Figure 1.6 : Différents sous-types de cellules gliales qui composent le tractus digestif. Les cellules gliales de l'appareil digestif sont classées en différents sous-types selon leur morphologie et leur localisation dans la paroi intestinale. Les cellules gliales de sous-type I (intraganglionnaire protoplasmique) et II (interganglionnaire fibreux) appartiennent aux plexus myentérique et sous-muqueux du SNE. Les premières possèdent des filaments courts et désorganisés tandis que les deuxièmes ont des filaments longs et parallèles entre eux. Les cellules gliales de type III ou muqueux sont sous-épithéliales, avec des filaments longs et branchés. Les cellules gliales de type IV sont allongées et courent avec les fibres nerveuses à l'intérieur des muscles. Adaptée de Gulbransen & Sharkey, 2012; Boesmans et al., 2015.

Les différentes molécules et voies de signalisation impliquées dans le développement du système nerveux entérique

Pour former un SNE fonctionnel et mature, les CCNe doivent non seulement migrer tout le long de l'intestin, mais aussi largement proliférer, se différencier en un large éventail de classes de neurones et de cellules gliales, survivre, et devenir fonctionnellement actives. Maintenant que la plupart des processus qui ont lieu au cours du développement du SNE ont été établis, il est crucial d'étudier les mécanismes moléculaires qui y sont rattachés, dans des conditions physiologiques et pathologiques, notamment chez les patients atteints par la maladie de HSCR.

Le développement du SNE est contrôlé par des récepteurs de surface cellulaire et leurs ligands, par des facteurs de transcription qui régulent leur expression, par des morphogènes, et par des protéines qui transmettent des signaux de la surface cellulaire jusqu'au cytosquelette et au noyau (Lake & Heuckeroth, 2013; Mundt & Bates, 2010).

- **La voie de signalisation GDNF / RET**

Le proto-oncogène *RET* est considéré comme le gène régulateur prédominant du SNE puisque une mutation hétérozygote dans sa séquence codante, conduisant à une perte de fonction, survient dans 15 à 35% des cas de HSCR sporadiques et 50% des cas familiaux (Brooks, Oostra, & Hofstra, 2005). Des modifications dans ses régions non codantes sont également suspectées d'intervenir dans d'autres cas de HSCR (Emison et al., 2005; Griseri et al., 2007). Les patients hétérozygotes pour une mutation dans *GDNF*¹¹, conduisant à une perte de fonction, ont également été diagnostiqués HSCR (Brooks et al., 2005).

GDNF est une protéine sécrétée qui forme un complexe avec GFR α 1¹² pour ainsi se lier et activer le récepteur transmembranaire tyrosine kinase RET (**Figure 1.7**) (Heanue & Pachnis, 2007). RET s'autophosphoryle et active par la suite une voie de signalisation qui est impliquée

¹¹«Glial cell–line–Derived Neurotrophic Factor»

¹²«Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored co-receptor GDNF family receptor α 1»

dans le développement du SNE et plus exactement dans la migration, la prolifération, la survie et la différenciation neuronale des CCNe (Eng, 1999; Tansey, Baloh, Milbrandt, & Johnson, 2000). RET et son corécepteur GFR α 1 sont présents à la surface des CCNe dès que celles-ci entrent dans le tractus digestif, tandis que GDNF est sécrété par le mésenchyme de l'intestin. La fonction essentielle de ce complexe ligand-récepteur dans le développement du SNE est soulignée par le fait qu'une absence de l'un ou l'autre dans des souris mutantes mène à une aganglionose totale de l'intestin (Pichel et al., 1996a, 1996b; Schuchardt, D'Agati, Larsson-Blomberg, Costantini, & Pachnis, 1994). L'absence de SNE serait due à un défaut combiné de migration, prolifération, survie et différenciation des CCNe.

En effet, des mutations qui inactivent *RET* ont révélé, dans des expériences *in vitro* et *in vivo*, que l'activation du récepteur par un de ses ligands à des stades précoces du développement est indispensable pour la survie de la majeure population des CCNe. En absence de *RET*, les cellules progénitrices subissent une apoptose anormalement importante, ce qui diminue largement la quantité de cellules disponibles pour coloniser l'intestin (Taraviras et al., 1999).

Des expériences *in vivo* ont montré que GDNF agit comme un chémo-attractant pour les CCN d'origine vagale qui suivent un gradient de concentration de GDNF. Son expression dans l'intestin est régulée dans le temps, avec de hauts niveaux d'ARNm initialement dans l'œsophage et l'estomac, puis dans les différentes régions juste avant leur colonisation par les CCNe (Natarajan, Marcos-Gutierrez, Pachnis, & de Graaff, 2002). Ainsi, la présence de GDNF améliore la prolifération et la migration des CCNe (Chalazonitis, Rothman, Chen, & Gershon, 1998; Heuckeroth, Lampe, Johnson, & Milbrandt, 1998; Taraviras et al., 1999).

En outre, d'autres ligands de la famille de GDNF, comme NTN¹³, peuvent se lier et activer le récepteur RET. Ainsi, on retrouve quelques rares patients atteints de HSCR qui possèdent une mutation dans NTN conduisant à l'inactivation de ce gène (Doray et al., 1998).

¹³«Neurturin»

- **La voie de signalisation EDN3 / EDNRB**

La deuxième voie de signalisation connue pour avoir un rôle majeur dans le développement du SNE met en jeu le ligand EDN3¹⁴ ou ET3 et son récepteur couplé aux protéines G, EDNRB¹⁵ (**Figure 1.7**) (Heanue & Pachnis, 2007). Les patients qui possèdent une mutation hétérozygote dans *EDN3* ou *EDNRB* représentent environ 5% des cas de HSCR (Amiel & Lyonnet, 2001).

EDNRB est présent à la surface des CCNe en migration tandis qu'EDN3 est produit par le mésoderme des régions de l'intestin antérieures dans les premières phases de la migration des CCNe et dans les régions postérieures de l'intestin lorsque les CCNe achèvent leur migration. Ce patron d'expression suggère l'importance de cette voie de signalisation dans la régulation du processus de migration (Barlow et al., 2003).

En effet, il a été montré que EDN3 et son récepteur sont capables d'agir sur GDNF *in vitro* afin de réguler la formation des chaînes de migration du front et la migration des CCNe (Barlow et al., 2003; Wu, Chen, Rothman, & Gershon, 1999). En plus de son implication dans la migration cellulaire, la différenciation neuronale est inhibée et la prolifération favorisée en présence de EDN3. Une mutation *in vivo* du gène mène à un délai de colonisation du SNE, associé à une réduction du nombre de progéniteurs et à une différenciation neuronale précoce au niveau du front de migration (Bondurand, Natarajan, Thapar, Atkins, & Pachnis, 2003).

De même que la voie de signalisation GDNF/RET, la voie EDN3/EDNRB est impliquée dans plusieurs processus qui gouvernent le développement du SNE afin de permettre une colonisation normale de l'intestin par les CCNe. De manière intéressante, la voie EDN3/EDNRB est capable d'interagir *in vitro* avec la voie GDNF/RET afin d'augmenter son pouvoir de prolifération (Barlow et al., 2003).

¹⁴«Endothelin3»

¹⁵«Endothelin Receptor B»

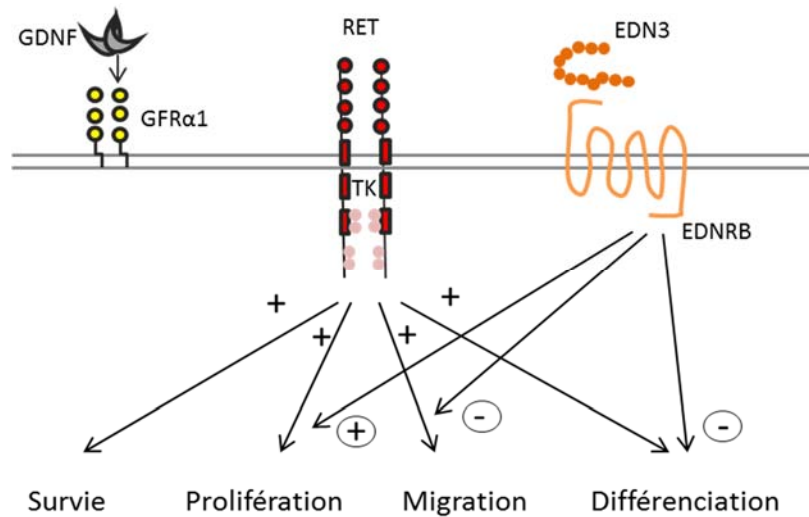


Figure 1.7 : GDNF/RET et EDN3/EDNRB, deux voies de signalisation majeures dans le développement du SNE. Les CCNe expriment RET qui est activé par le complexe GDNF – GFR α 1. Les CCNe expriment également le récepteur EDNRB qui est activé par son ligand EDN3. La voie de signalisation RET améliore survie, prolifération, migration et différenciation cellulaire tandis que la voie EDNRB, si elle maintient la prolifération, inhibe la migration et la différenciation neuronale. Adaptée de Heanue & Pachnis, 2007.

- **Le facteur de transcription Sox10**

Une modification dans la séquence du gène encodant le facteur de transcription de Sox10, conduisant à l'inactivation de ce gène, représente un peu moins de 5% des cas de HSCR (Southard-Smith et al., 1999) et certains patients montrent également des problèmes neurologiques additionnels.

Sox10 est exprimé dans les NCC d'origine vagale dès le stade pré-migratoire et est ensuite maintenu plus ou moins longtemps en fonction de leur différenciation. Il est très souvent utilisé comme marqueur pour les CCNe progénitrices puisqu'il s'exprime durant la migration des CCNe et maintient celles-ci à l'état progéniteur (Bondurand, Natarajan, Barlow, Thapar, & Pachnis, 2006; Bondurand et al., 2003). Dans le SNE, une fois différenciées en cellules gliales, les CCNe maintiennent l'expression de Sox10 qui est un régulateur essentiel dans la gliogénèse (Anderson, Stewart, et al., 2006; Britsch et al., 2001). En fait, ce facteur de transcription régule une multitude de gènes clés qui interviennent dans la formation du SNE, notamment *EDNRB* et *RET*. A titre d'exemple, il est capable d'activer l'expression de *RET* par interaction directe

avec le facteur de transcription Pax3¹⁶ ou indirectement par l'intermédiaire du facteur de transcription Phox2b¹⁷ (Lang & Epstein, 2003; Zhu et al., 2004).

À son tour, le facteur de transcription Sox10 joue un rôle important dans le maintien et la survie des CCNe progénitrices puisque des expériences *in vivo* montrent qu'une perte de *Sox10* entraîne une mort cellulaire anormalement élevée des progéniteurs (Britsch et al., 2001; Southard-Smith, Kos, & Pavan, 1998).

Finalement, une mutation homozygote dans *Sox10* affecte le SNE, avec une aganglionose dans le côlon, mais également d'autres cellules dérivées de la crête neurale, comme les mélanocytes, avec une hypopigmentation (Herbarth et al., 1998).

Un schéma récapitulatif des voies de signalisation et facteurs de transcription impliqués dans le développement du SNE est donné dans la **figure 1.8**.

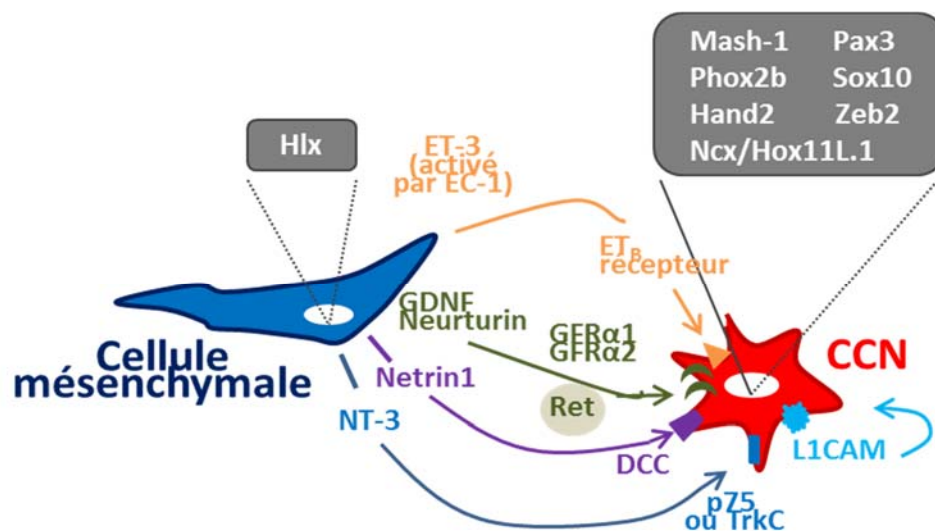


Figure 1.8 : Voies de signalisation et facteurs de transcription impliqués dans le développement du SNE. Les facteurs de transcription sont représentés dans les boîtes grises tandis que les molécules de signalisation synthétisées par les cellules mésenchymales intestinales – telles que GDNF et ET3 (EDN3) – et leurs récepteurs – RET et EDNRB – sont en couleur. Adaptée de Mundt & Bates, 2010.

¹⁶ « Paired Box 3 »

¹⁷ « Paired-like homeobox 2b »

- **Adhésion cellule-cellule et interactions avec la matrice extracellulaire**

Si plusieurs mécanismes impliquent des réponses à des molécules diffusibles, l'adhésion des cellules en migration entre elles et les interactions avec la matrice extracellulaire (MEC) sont deux mécanismes importants qui contrôlent également la motilité des CCNe en migration dans l'intestin. La différence dans le comportement des CCNe en migration, selon la région où elles se trouvent, indique l'existence d'un microenvironnement positionnel avec une migration en chaîne pour les CCNe du front par exemple. Cette capacité à former des chaînes suggère aussi la présence d'interactions cellule-cellule médiées par des molécules d'adhésion cellulaire qui sont nécessaires pour le déplacement de toute une population de cellules (Carmona-Fontaine et al., 2008; Theveneau et al., 2010).

Adhésion cellule-cellule des cellules de la crête neurale entériques entre elles

Il a été montré que les CCNe expriment une variété de molécules d'adhésion cellulaire (Chalazonitis, Tennyson, Kibbey, Rothman, & Gershon, 1997; Iwashita, Kruger, Pardal, Kiel, & Morrison, 2003). *In vitro*, le blocage de la molécule d'adhésion cellulaire L1CAM, qui est normalement présente à la surface des CCNe en migration, provoque la rupture de certaines chaînes cellulaires du front de migration, ce qui a pour conséquence une colonisation partielle de l'intestin. Cependant, la délétion *in vivo* de L1CAM ne conduit pas à une aganglionose bien qu'elle crée un retard transitoire dans la migration des CCNe, ce qui démontre l'implication certaine d'autres molécules d'adhésion dans ce processus (Anderson, Turner, et al., 2006).

Adhésion des cellules de la crête neurale entériques avec la matrice-extracellulaire

Certaines théories ont proposé l'existence d'une fenêtre de temps limite pour terminer la colonisation de l'intestin. De hauts niveaux de laminine, une molécule d'adhésion majeure de la MEC avec le collagène, seraient responsables du changement du microenvironnement de l'intestin à e14.5 et ceci le rendrait non-permissif à la colonisation des CCNe (Druckenbrod & Epstein, 2009). *In vivo*, des mutations dans le gène *EDN3* altèrent directement l'expression de la laminine dans l'intestin et conduit à une aganglionose terminale (Wu et al., 1999). En effet,

la laminine induit la différenciation neuronale, ce qui a pour conséquence une réduction de la prolifération et de la migration des CCNe progénitrices (Chalazonitis et al., 1997).

La migration des CCNe implique donc, d'une part, le contrôle de l'adhésion des cellules en migration entre elles et, d'autre part, avec les différentes composantes de la MEC. La MEC est un environnement dynamique qui est contrôlé dans le temps par différentes molécules, à l'image de la laminine qui n'est pas un cas isolé. La fibronectine, composante de la MEC connue pour son rôle majeur dans l'adhésion MEC-cellules, induit la migration et l'expansion cellulaire par un mécanisme impliquant notamment l'intégrine $\beta 1$ à la surface des CCNe (Breau, Dahmani, Broders-Bondon, Thiery, & Dufour, 2009; Breau et al., 2006). *In vivo*, la délétion du gène encodant l'intégrine $\beta 1$ conduit à une aganglionose terminale associée à des anomalies du SNE (Broders-Bondon, Paul-Gilloteaux, Carlier, Radice, & Dufour, 2012).

1.1.3. Pathologies associées au système nerveux entérique

Neuropathies entériques

L'importance du SNE est mise en évidence par un large éventail de pathologies qui touchent le SNE, appelées neuropathies entériques, et qui surviennent suite à la défaillance de l'une des fonctions qu'il exerce (Furness, 2008, 2012; Sasselli et al., 2012). Les neuropathies entériques se différencient en quatre catégories détaillées dans le **tableau I.I**. La maladie de HSCR appartient à la catégorie des neuropathies entériques congénitales.

La maladie de Hirschsprung

- **Caractéristiques cliniques et traitement de la maladie**

La structure générale d'un ganglion reste similaire, qu'il soit situé dans l'œsophage, l'estomac, le petit ou le gros intestin. Cependant, cette similitude superficielle cache des différences dans la manière d'opérer du SNE dans différentes régions (Furness, 2008).

Tableau I.I: Classification des neuropathies entériques.

Neuropathies congénitales ou développementales	Maladie de Hirschsprung
	Sténose hypertrophique du pylore
	Néoplasie endocrinienne 2B
	Pseudo-obstruction intestinale : formes neurogéniques, Dysplasie neuronale intestinale, hypoganglionose
	Mitochondriopathies affectant les neurones entériques
Neuropathies acquises	Maladie de Chagas
	Pseudo-obstruction intestinale : neuropathies formes secondaires
	Constipation par transit lent
	Diarrhée induite par un agent pathogène
	Syndrome du côlon irritable
	Névrite entérique auto-immune
	Névrite entérique d'étiologie inconnue
	Achalasie du sphincter anal interne
Neuropathies secondaires ou associées à d'autres états pathologiques	Gastroparésie diabétique et autres troubles liés au diabète
	Neuropathies entériques de la maladie de Parkinson
	Neuropathies entériques de la maladie à prion
Neuropathies iatrogéniques ou induites par une drogue	Troubles initiés par des médicaments antinéoplasiques
	Iléus postopératoire
	Neuropathie
	Constipation induite par les opiacées

Dans le côlon, le SNE est indispensable pour le contrôle local de la motilité de l'organe et s'il est absent ou défectueux, cela résulte en une maladie bien identifiée aujourd'hui qui est la maladie de HSCR (**Figure 1.9 A**) (Amiel et al., 2008). Elle est caractérisée par une contraction soutenue du segment aganglionnaire puisqu'il n'y a pas d'activité péristaltique propulsive, ce qui a pour conséquence une occlusion intestinale, suivie d'une prolifération importante de bactéries et d'une distension des segments proximaux, d'où son deuxième nom, mégacôlon aganglionnaire (Bergeron et al., 2015; Butler Tjaden & Trainor, 2013). C'est une maladie létale puisque, dans de telles conditions, le patient ne pourra pas survivre sans une intervention chirurgicale (Furness, 2008; Wattchow et al., 2008). Cette intervention consiste à retirer la zone aganglionnaire afin d'abaisser la zone ganglionnaire et relier un côlon « sain » à l'anus. C'est le seul traitement disponible actuellement et, bien qu'il permette de rétablir un système digestif fonctionnel, il n'est pas exempt de complications pour le patient (Haricharan & Georgeson, 2008).

- **Classification de la maladie**

La maladie de HSCR est variable et se différencie en HSCR-segment court et HSCR-segment long, selon la longueur du segment qui est aganglionnaire. Pour les cas de segment court, la forme classique, l'aganglionose est limitée au rectum et ne dépasse pas le rectosigmoïde (environ le tiers inférieur du côlon) tandis que pour les cas de segment long, l'aganglionose s'étend de manière proximale au côlon sigmoïde. Il arrive que certaines aganglionoses, extrêmement rares, touchent toute l'étendue du côlon : elles sont appelées aganglionoses totales du côlon ou ATC (**Figure 1.9**) (Amiel & Lyonnet, 2001; Amiel et al., 2008). Le sphincter anal interne est toujours la limite inférieure de l'aganglionose.

Dans certains cas peu communs, une variante de la maladie dite « segment sauté » décrit un défaut particulier du SNE : un segment ganglionnaire qui est borné par deux segments aganglionnaires (**Figure 1.9 A**) (O'Donnell & Puri, 2010; Takahashi, Sipp, & Enomoto, 2013).

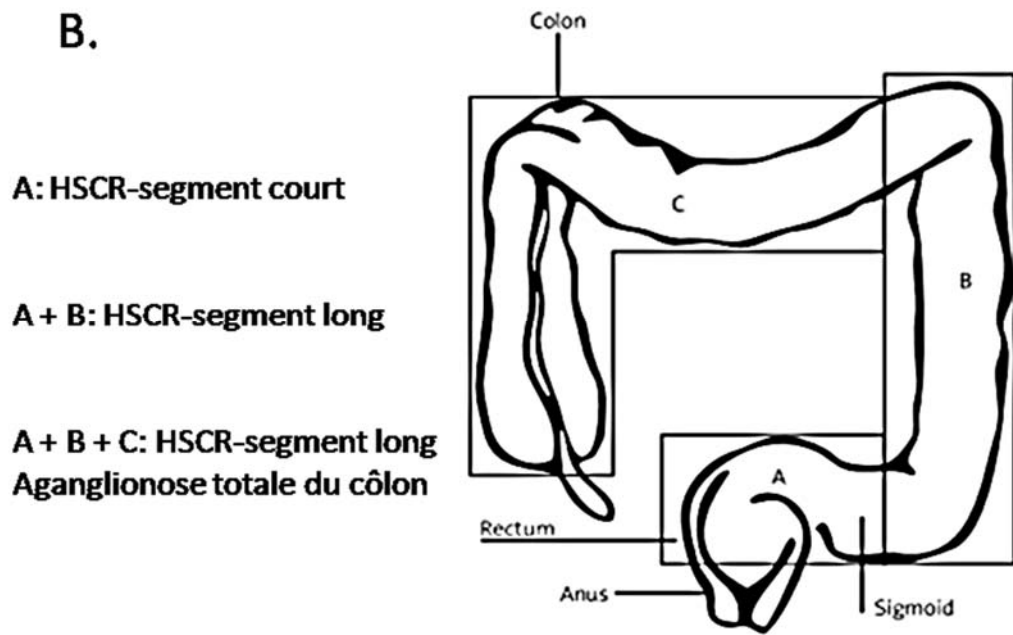
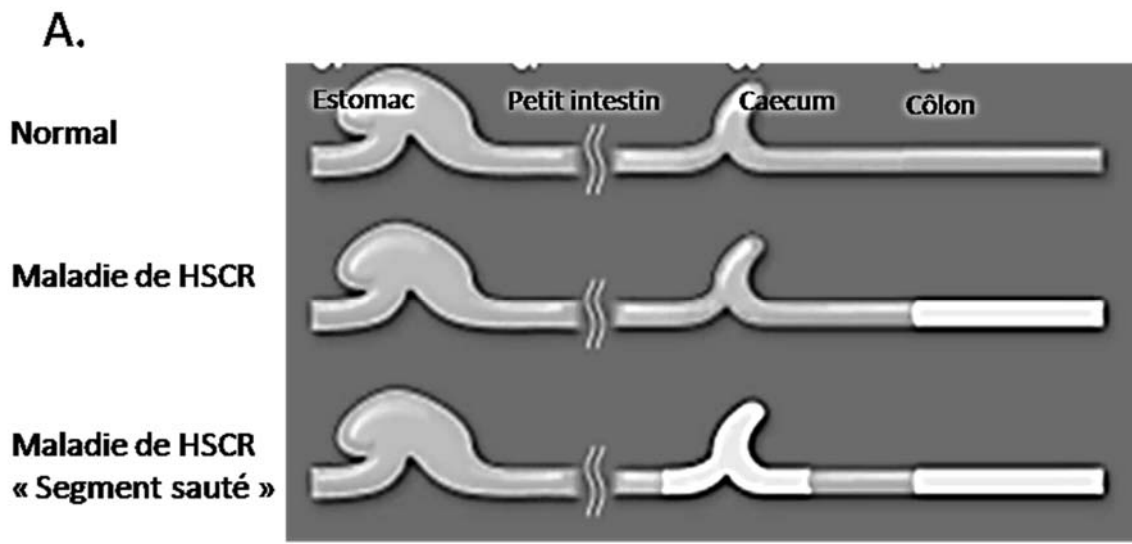


Figure 1.9 : Aganglionose dans la maladie de Hirschsprung. A. La représentation schématique d'un intestin de souris montre l'aire ganglionnaire (gris) dans des conditions normales, de maladie de HSCR ou d'une variante de la maladie « segment sauté ». Remarquez le caecum entre le petit intestin et le gros intestin, une structure propre à l'intestin de souris. Adaptée de Takahashi, Sipp, & Enomoto, 2013. B. Les cas de HSCR sont classés en trois selon la longueur du segment aganglionnaire. Adaptée de Szyberg & Marszalek, 2014.

- **Épidémiologie de la maladie**

Concernant l'épidémiologie, la maladie de HSCR a une incidence d'environ une naissance sur 5 000 (Bodian & Carter, 1963). En revanche, cette incidence varie de manière significative entre les différents groupes ethniques avec, par exemple, une incidence de 1.0/10 000 pour les hispaniques, 1.5/10 000 pour les américains-caucasiens, 2.1/10 000 pour les américains-africains et 2.8/10 000 pour les asiatiques (Amiel et al., 2008; Torfs, 1998). La forme classique de HSCR est le segment court puisqu'il concerne environ 80-85% des cas. Les 15-20% restants concernent les formes longues dont 5% seulement sont des ATC (Kenny et al., 2010).

De manière générale, il existe également un biais sexuel avec 4 garçons pour 1 fille malade. En revanche, ce ratio est moins important dans les cas de HSCR-segment long (Amiel et al., 2008; Badner, Sieber, Garver, & Chakravarti, 1990; Bergeron et al., 2015).

On retrouve un historique de HSCR dans la famille dans 7% des cas (Bodian & Carter, 1963; Russell, Russell, Fenger, & Niebuhr, 1994).

De manière intéressante, 15% des patients atteints de la maladie de HSCR présentent au moins une autre anomalie congénitale (Gariépy, 2004). Cette association donne lieu à des syndromes bien connus comme c'est le cas du syndrome de Waardenburg-Shah. Aussi appelé syndrome de Waardenburg de type 4 (SW4), ce syndrome associe la maladie de HSCR à des anomalies de pigmentation et des défauts de l'oreille interne – surdité et/ou problème d'équilibre (Edery et al., 1996). L'incidence de HSCR étant de 1/5 000 et celle de la surdité de 1/1 000, l'incidence du SW4 est très rare et seulement peu de cas sont rapportés (Amiel et al., 2008; Fernandez et al., 2014).

Pour finir, la maladie de HSCR peut aussi être associée à des anomalies chromosomiques dans 12% des cas. La Trisomie 21 est l'anomalie la plus retrouvée dans les cas de HSCR et donne lieu au syndrome de Down (Badner et al., 1990; Russell, Russell, & Niebuhr, 1994; Southard-Smith et al., 1998). Ce syndrome affecterait entre 5 et 8 millions de gens dans le monde avec une incidence d'environ 1 pour 800 naissances en Amérique du Nord (Hanney et al., 2012).

- **Etiologie de la maladie**

L'étiologie de la maladie de HSCR est très complexe. HSCR est devenu le paradigme des maladies multigéniques. Le phénotype de la maladie est associé à des mutations qui affectent un large éventail de gènes (De Giorgio & Camilleri, 2004). De manière générale, les gènes affectés sont des gènes qui régulent l'expression génétique dans les CCN progénitrices du SNE ou dans les voies de signalisation associées au développement du SNE que nous avons décrits plus haut et qui sont récapitulés dans la **figure 1.8 (Mundt & Bates, 2010)**. La plupart de ces gènes sont déterminés comme des facteurs de susceptibilité : leur mutation ne prédit par forcément la maladie mais elle augmente les risques d'en être atteint (Gariépy, 2004). Des études suggèrent que les facteurs environnementaux tels que la nutrition, la médication et les problèmes de santé des parents pourraient influencer le risque de contracter la maladie de HSCR mais les facteurs environnementaux sont mineurs comparés aux facteurs génétiques (Amiel & Lyonnet, 2001).

La transmission du patron de la maladie est autosomal dominant ou récessif.

- **Nouveaux modèles de souris transgéniques pour la maladie**

Selon la littérature, il est dit que les mutations dans des gènes connus pour être associés à la maladie de HSCR ne représentent qu'une partie des cas cliniquement observés, qui se situe entre le tiers et la moitié (Alves et al., 2013; Gariépy, 2004). De manière intéressante, les mutations dans des séquences codantes des gènes connus ont pour conséquence un HSCR-long segment ou un HSCR syndromique. En revanche, elles n'expliquent en aucun cas la transmission des cas de HSCR court-segment, la forme classique de la maladie. Ceci suggère, d'une part, l'importance des variations dans des régions non-codantes et, d'autre part, l'existence de bien d'autres gènes impliqués dans la maladie de HSCR (Amiel et al., 2008; Bergeron et al., 2013; Pusch, Sasiadek, & Blin, 2002).

La lignée transgénique Spot

Dans notre laboratoire, plusieurs lignées de souris transgéniques ont été générées par mutation insertionnelle aléatoire, nous permettant ainsi de découvrir de nouveaux gènes importants pour le développement des CCN et qui semblent impliqués dans la maladie de HSCR (**Figure 1.10**) (Bergeron et al., 2015; Bergeron et al., 2013).

Les souris FVB sont des souris albinos qui possèdent une mutation homozygote dans leur gène *tyrosinase* conduisant à une perte de fonction. Puisque la tyrosinase est l'enzyme clé dans la production de mélanine et d'autres pigments, les souris FVB possèdent des mélanocytes qui ne sont pas pigmentés (pelage blanc et yeux rouges) (Muller, Ruppert, Schmid, & Schutz, 1988). Pour générer les différentes lignées transgéniques citées au-dessus dans notre laboratoire, nous avons utilisé la méthode décrite par Méthot en 1995 qui consiste à microinjecter un transgène qui encode une tyrosinase fonctionnelle dans un embryon FVB (Methot, Reudelhuber, & Silversides, 1995). Ainsi, le sauvetage de la pigmentation chez les souriceaux obtenus peut servir de marqueur pour la transgénèse mais aussi pour les anomalies du développement des CCN. Trois possibilités apparaissent à la naissance des souriceaux : des souriceaux albinos, des souriceaux qui possèdent une pigmentation normale ou des souriceaux qui ont un défaut de pigmentation. Des souriceaux albinos sont le signe que la transgénèse a échoué tandis qu'une pigmentation uniforme confirme l'efficacité de la transgénèse mais ne met en évidence aucune anomalie qui touche les CCN. En revanche, une pigmentation anormale du pelage des mutants est le signe que le transgène s'est inséré dans un locus critique pour les mélanocytes et par extension, pour le développement des CCN. En effet, une pigmentation anormale du pelage des mutants est le signe que le transgène a perturbé un locus critique pour les mélanocytes et par extension, pour le développement des CCN dont ils sont dérivés (**Figure 1.10**) (Bergeron et al., 2013).

La **figure 1.11** présente les phénotypes de la lignée transgénique Spot, observés chez des souris adultes, à 20 jours après leur naissance (P20). La lignée Spot tire son nom des défauts de pigmentation du pelage des hétérozygotes (Spot^{Tg/+}) qui laisse apparaître de larges taches

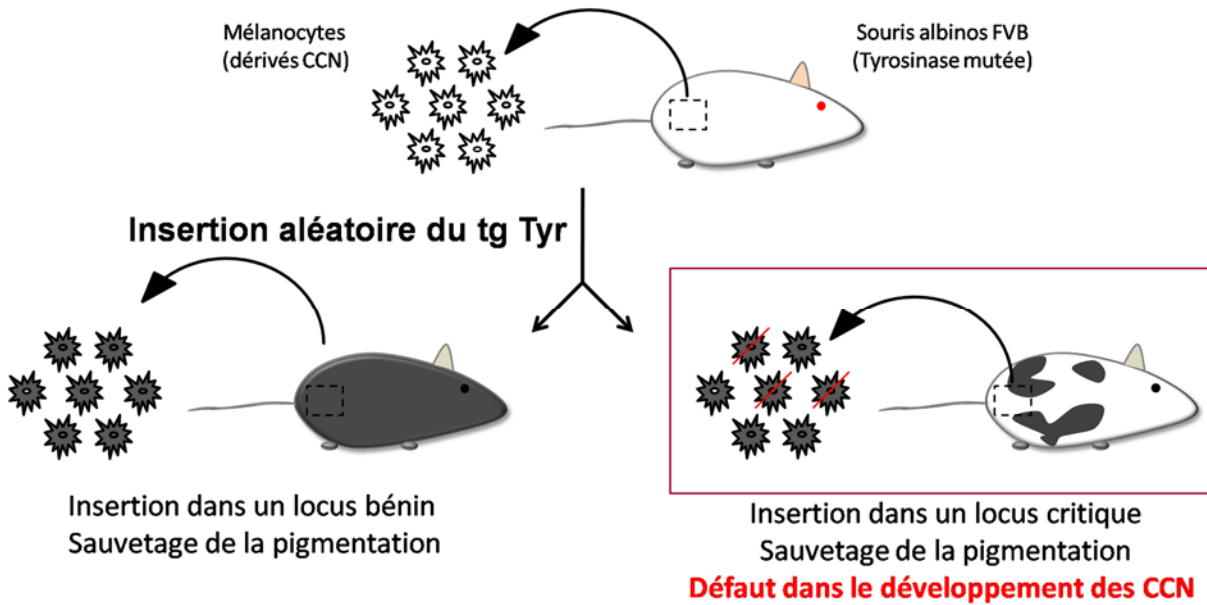


Figure 1.10 : Génération de la lignée transgénique Spot par mutation insertionnelle aléatoire. Le minigène *tyrosinase* a été microinjecté dans des embryons de souris albinos FVB, puis un criblage des souriceaux nous a permis de découvrir de nouveaux loci critiques pour le développement des CCN. Une pigmentation uniforme confirme l'efficacité de la transgénèse mais ne met en évidence aucune anomalie qui touche les CCN. En revanche, une pigmentation anormale du pelage des mutants est le signe que le transgène s'est inséré dans un locus critique pour les mélanocytes et par extension, pour le développement des CCN.

gris clair et des yeux pigmentés. Après croisement génétique, ces taches de pigmentation apparaissent plus foncées dans le fond Gata4-RFP – une lignée de souris communément utilisée dans notre laboratoire qui marque de manière endogène les CCN (Pilon, Raiwet, Viger, & Silversides, 2008). Les Spot homozygotes ($Spot^{Tg/Tg}$) montrent un manque total de pigmentation dans leur pelage et possède seulement de la pigmentation dans les yeux. En plus des défauts de pigmentation, les souris $Spot^{Tg/Tg}$ adultes souffrent des signes classiques de mégacôlon aganglionnaire : une mort prématurée autour de l'âge de trois semaines, une taille inférieure aux souris contrôle de type sauvage, une posture courbée et un abdomen gonflé pour les mutants encore vivants. Après dissection de leur intestin, nous avons pu observer un blocage et une accumulation de matériel fécal dans le caecum et dans la partie proximale de leur côlon, suggérant ainsi fortement une aganglionose dans leur côlon distal. De plus, une

analyse histologique, menée par Karl Bergeron dans notre laboratoire, a démontré l'absence de ganglions dans les portions distales des souris homozygotes. La lignée transgénique Spot constitue de ce fait un modèle murin idéal pour l'étude de la maladie de HSCR.

Il est important de comprendre que le développement des CCN chez les souris homozygotes Spot est largement plus perturbé que chez les hétérozygotes. D'abord, les hétérozygotes ont quelques taches grises de pigmentation sur leur pelage alors que les homozygotes n'en ont aucune. Enfin, seules les souris homozygotes souffrent des signes classiques de mégacôlon aganglionnaire ce qui explique pourquoi nos expériences porteront uniquement sur des homozygotes.

De manière intéressante, la lignée Spot s'apparente à un HSCR syndromique puisqu'elle possède, en plus d'un mégacôlon aganglionnaire, des défauts de pigmentation et des anomalies de l'oreille interne. Ceci est le SW4 mais les aspects concernant les défauts de l'oreille interne, bien qu'étudiés dans notre laboratoire, ne seront pas traités dans ce mémoire.

Mon projet de recherche porte principalement sur la caractérisation du défaut de formation du SNE de la lignée Spot, d'un point de vue cellulaire, moléculaire et génétique.

Chez Spot, le transgène s'est inséré à l'intérieur du locus *Nr2f1-K12*, une région dépourvue de gènes préalablement associés à la maladie. *Nr2f1* encode un facteur de transcription connu pour son rôle dans la gliogénèse du SNC et *K12*, antisens du gène *Nr2f1*, est un ARN long non codant (ARNlnc) pour lequel aucune information n'est disponible actuellement.

La suite de cette introduction dresse un état des connaissances rapide au sujet de *Nr2f1* et sur les capacités qu'ont les ARN long non codants à réguler la transcription d'autres gènes.

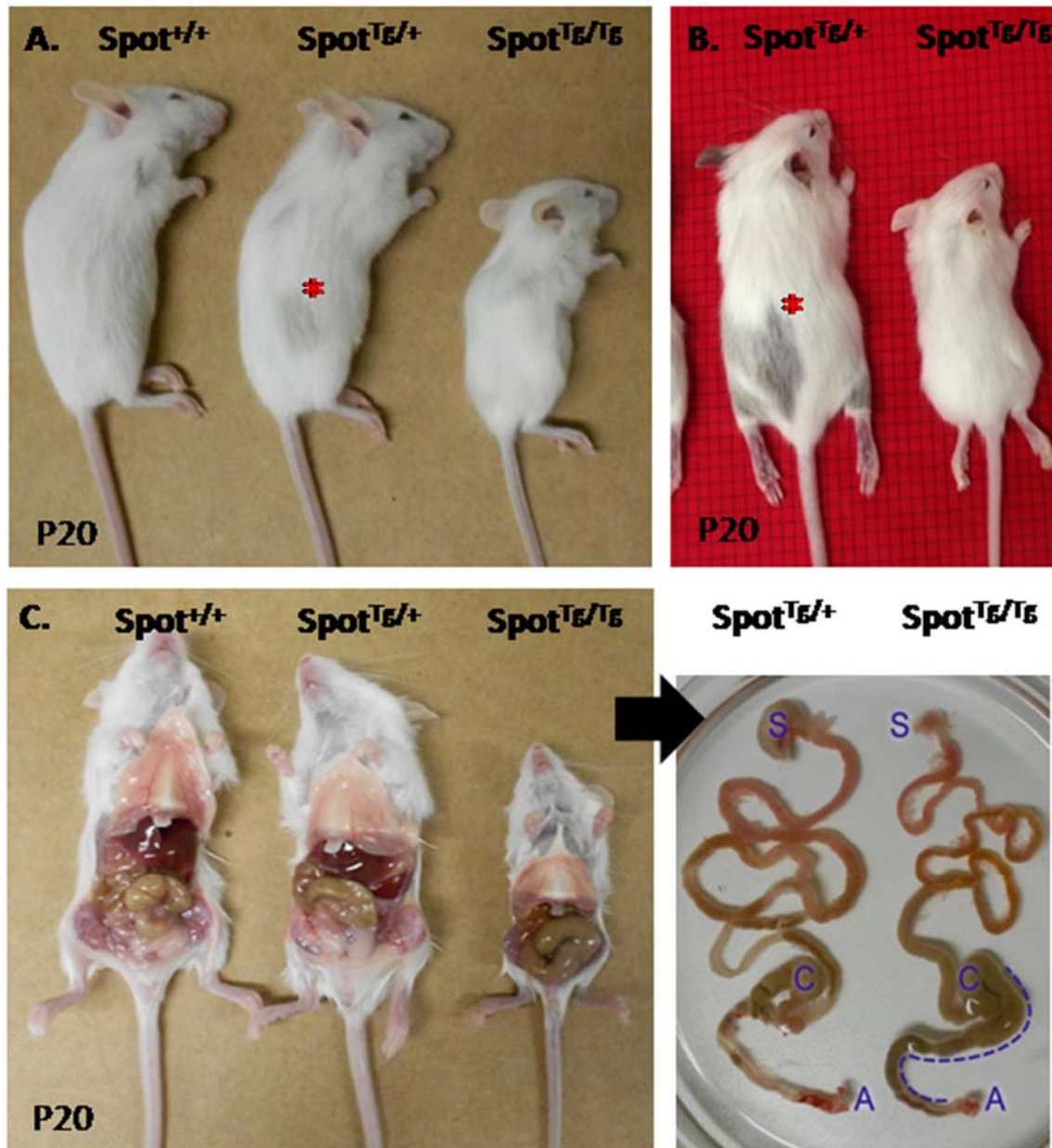


Figure 1.11 : Phénotype des souris Spot adultes. Les souris Spot présentent des défauts de pigmentation associés aux signes classiques du mégacôlon aganglionnaire. A. Dans le fond génétique FVB, les souris $Spot^{Tg/+}$ ont des taches de pigmentation (astérisque rouge) sur le corps et les yeux pigmentés. Le défaut de pigmentation est aggravé chez les souris $Spot^{Tg/Tg}$ qui ont le pelage totalement blanc et seulement les yeux pigmentés. Les $Spot^{Tg/Tg}$ sont aussi nettement plus petites que les $Spot^{Tg/+}$. B. Les mêmes défauts de pigmentation sont retrouvés dans le fond Gata4-RFP. C. Les souris $Spot^{Tg/Tg}$ présentent un abdomen gonflé et une accumulation de matière fécale de l'intestin distal jusqu'au côlon, alors que les souris $Spot^{Tg/+}$ ne sont pas affectées et sont comparables aux souris de type sauvage. D'après Karl Bergeron.

1.2. Le gène *NR2F1*, membre de la super famille des récepteurs nucléaires

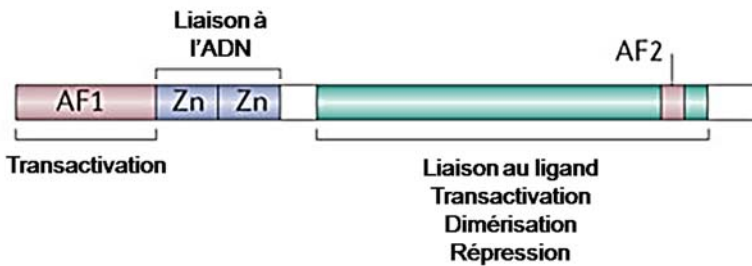
Les récepteurs nucléaires

La super famille des récepteurs nucléaires (RN) est une large famille de régulateurs cellulaires qui sont des facteurs de transcription (Laudet, 1997). Ils peuvent fonctionner comme activateurs, répresseurs de la transcription selon qu'ils se lient, ou non, à un ligand ou un cofacteur. Lorsqu'il n'y a pas de ligand et qu'ils ne sont pas liés par un agoniste, les RN répriment l'expression de gènes cibles en interagissant avec des co-répresseurs. Au contraire, quand ils sont liés, que ce soit par leur ligand ou par un agoniste, les RN subissent des changements de conformation qui induisent leur liaison avec des co-activateurs et l'activation de l'expression de gènes cibles (Tsai & Tsai, 1997).

La figure 1.12 représente la structure en domaines des RN, une structure conservée commune à la plupart des membres de la super famille (Glass & Ogawa, 2006). Les RN consistent en plusieurs domaines nucléaires : un domaine d'activation transcriptionnelle variable en amino (N) -terminal (AF1), un domaine de liaison à l'ADN (DLA), très conservé, au centre et un domaine de liaison au ligand (DLL), relativement conservé, en carboxy (C) -terminal (Giguere, 1999).

Chacun de ces domaines médie des fonctions bien particulières. Le DLA médie principalement la liaison spécifique du RN à des éléments de réponses dans l'ADN dans des régions régulatrices des gènes cibles – enhancer ou promoteur (Naar et al., 1991). Le DLL spécifie les propriétés de liaison à un ligand pour chaque récepteur et régule les interactions du RN avec des protéines co-activatrices ou co-répresseuses d'une manière ligand-dépendante. En effet, le DLL contient une courte région α -hélicale (AF2) qui, après liaison à un ligand, se déplace d'une position mobile à une position plus stable dans laquelle il est lié au DLA. Ce changement conformationnel crée un site de liaison pour des co-activateurs ou co-répresseurs, selon la position du domaine AF2 (Glass & Ogawa, 2006; Torchia et al., 1997).

Structure primaire



Structure tertiaire

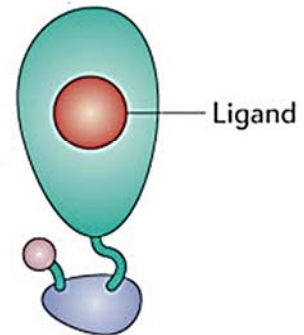


Figure 1.12 : Structure conservée des récepteurs nucléaires. Les RN sont formés de trois principaux domaines : un domaine de transactivation (AF1), un domaine de liaison à l'ADN et un domaine de liaison au ligand. Ce dernier contient un domaine d'activation fonctionnelle, AF2, qui lie des protéines co-activatrices ou co-répressives qui régulent l'expression de gènes cibles, dont les régions régulatrices ont été liées par le domaine de liaison à l'ADN. Adaptée de Glass & Ogawa, 2006.

Finalement, les RN peuvent également réguler la transcription de gènes par interaction directe avec d'autres facteurs de transcription, un mécanisme qui ne met en jeu aucune liaison à l'ADN (Karin, 1998).

Concernant leur classification, il existe aujourd'hui deux grands groupes de RN : les RN hormonaux qui répondent à des ligands qui sont des hormones et les RN orphelins dont les ligands étaient encore inconnus quand ils ont été découverts. En effet, les RN orphelins sont définis comme des produits de gènes qui ont les caractéristiques structurelles des RN et qui ont été identifiés sans connaître leur ligand potentiel. Fait important, ils restent toujours dans cette catégorie même après une éventuelle identification de ligands qui leurs sont spécifiques.

Les membres des récepteurs nucléaires de la sous-famille 2 : *Nr2f1* et *Nr2f2*

Les RN qui appartiennent à la sous-famille 2, Nr2f, sont aussi connus sous le nom de Coup-tf pour « chicken ovalbumin upstream promoter transcription factors » et ils se positionnent comme les RN orphelins les plus étudiés aujourd'hui.

Ces facteurs de transcription ont d'abord été identifiés pour leur liaison directe à des séquences répétées dans le promoteur en amont du gène de l'ovalbumine régulant ainsi l'expression de ce gène dans l'oviducte de poulet (Pastorcic et al., 1986; L. H. Wang et al., 1989).

Au sein de cette sous-famille, les séquences des deux homologues *Nr2f1* (*Coup-tf1*) et *Nr2f2* (*Coup-tf2*), chez la souris, possèdent 80% d'identité. Concernant leur expression dans le SNC en développement chez la souris, elle commence autour de e7.5, augmente largement à e9.5 avec un pic entre e12 et e13, puis baisse avant la naissance (Qiu et al., 1994). De plus, ils sont généralement retrouvés dans les cellules mésenchymales de nombreux organes en développement (Jonk et al., 1994).

Des modèles de souris « knock-out » ont permis de démontrer le rôle de *Nr2f1* et *Nr2f2* dans le développement. Il a été montré que ces deux derniers jouent des rôles critiques dans la régulation de plusieurs processus développementaux chez les mammifères, notamment différenciation, métabolisme et homéostasie (Tsai & Tsai, 1997). *Nr2f2* est impliqué dans les interactions mésenchymales-endothéliales et sa délétion *in vivo* entraîne une létalité embryonnaire avec des défauts dans l'angiogénèse et le développement du cœur (Pereira, Qiu, Zhou, Tsai, & Tsai, 1999). De manière intéressante, *Nr2f1* est connu pour sa régulation de la neurogénèse, la gliogénèse et la différenciation des CCN durant le développement embryonnaire (Qiu et al., 1997). Les souris déficientes pour le gène *Nr2f1* montrent de nombreuses altérations dans l'arborisation, les projections et la myélinisation des axones ainsi que dans la régionalisation du cortex (Yamaguchi et al., 2004; Zhou et al., 1999; Zhou, Tsai, & Tsai, 2001). Ces souris mutantes souffrent d'un retard dans la myélinisation de leurs axones et d'une démyélinisation élevée dans le SNC. *In vitro*, il a été montré que ces défauts de myélinisation étaient dus à un retard dans la différenciation des oligodendrocytes, une classes de cellules gliales du SNC (Yamaguchi et al., 2004). Plus récemment, il a été montré que *Nr2f1* et *Nr2f2* sont nécessaires pour la spécification temporaire des progéniteurs dans le SNC et notamment pour la génération des différents types gliaux durant le développement du SNC. En effet, ces deux facteurs de transcription sont particulièrement requis pour l'acquisition de

compétence gliogénique puisqu'ils sont capables de répondre à des cytokines gliogéniques – telles que LIF¹⁸ et BMP2 (Naka, Nakamura, Shimazaki, & Okano, 2008). Ensemble, ces données nous permettent de mettre en évidence l'implication certaine de *Nr2f1* dans le développement des cellules gliales.

Si les produits des gènes de la famille Nr2f sont capables de moduler l'expression de gènes, ces gènes sont eux-mêmes régulés par d'autres produits de gènes. Il y a principalement deux morphogènes qui semblent jouer un rôle critique dans la régulation des gènes de la famille Nr2f : l'acide rétinoïque (AR) et la glycoprotéine Shh¹⁹. D'une part, de hauts niveaux d'expression de Coup-tf sont induits *in vitro* par l'AR dans les cellules P19, et d'autre part, le traitement d'embryons de poisson zèbre à l'AR perturbe l'expression spatiotemporelle des Coup-tf (Fjose, Weber, & Mlodzik, 1995; Jonk et al., 1994). De la même manière, il a également été montré que Shh est capable d'induire la synthèse d'ARNm de Coup-tf2, à la fois *in vitro* dans des cellules P19 (Tsai & Tsai, 1997) mais également *in vivo* (Takamoto et al., 2005)

¹⁸ « Leukemia Inhibition Factor »

¹⁹ « Sonic hedgehog »

1.3. Les ARN longs non codants

«Do non-coding RNAs that are derived from the introns and exons of protein-coding and non-protein-coding genes represent a fundamental advance in the genetic operating system of higher organisms? Recent evidence from comparative genomics and molecular genetics indicates that this might be the case. If so, there will be profound consequences for our understanding of the genetics of these organisms, and in particular how the trajectories of differentiation and development and the differences among individuals and species are genomically programmed.» (Mattick, 2004)

Nous avons longtemps pensé que les gènes codants pour des protéines étaient les acteurs majeurs de la régulation génétique, avec le dogme central de la biologie moléculaire selon lequel l'acide désoxyribonucléique, ADN, est transcrit en acide ribonucléique messenger, ARNm, lui-même traduit en protéine. Cependant, depuis quelques décennies, de nombreuses preuves laissent penser que les processus développementaux qui régulent la complexité des organismes sont principalement dus au potentiel régulateur des portions non-codantes, qui constituent plus de 98% du génome chez l'Homme (Mattick, 2004; K. C. Wang & Chang, 2011). Les procaryotes possèdent moins de 25% d'ADN non-codant dans leur génome. Les eucaryotes simples ont entre 25 et 50% d'ADN génomique non-codant. Les animaux et les plantes ont plus de 50% d'ADN génomique non-codant, avec 98,5% de séquences non-codantes dans le génome humain (**Figure 1.13**) (Aparicio et al., 2002; Lander et al., 2001; Mouse Genome Sequencing et al., 2002; Venter et al., 2001).

Nous sommes encore très loin d'avoir attribué aux ARN non codants (ARNnc) toutes leurs fonctions biologiques, mais des milliers d'entre eux sont déjà documentés et une classe particulière semble se démarquer de par son potentiel à réguler la transcription d'autres gènes : les ARN longs non codants ou ARNlnc (Berretta & Morillon, 2009; Mercer, Dinger, & Mattick, 2009).

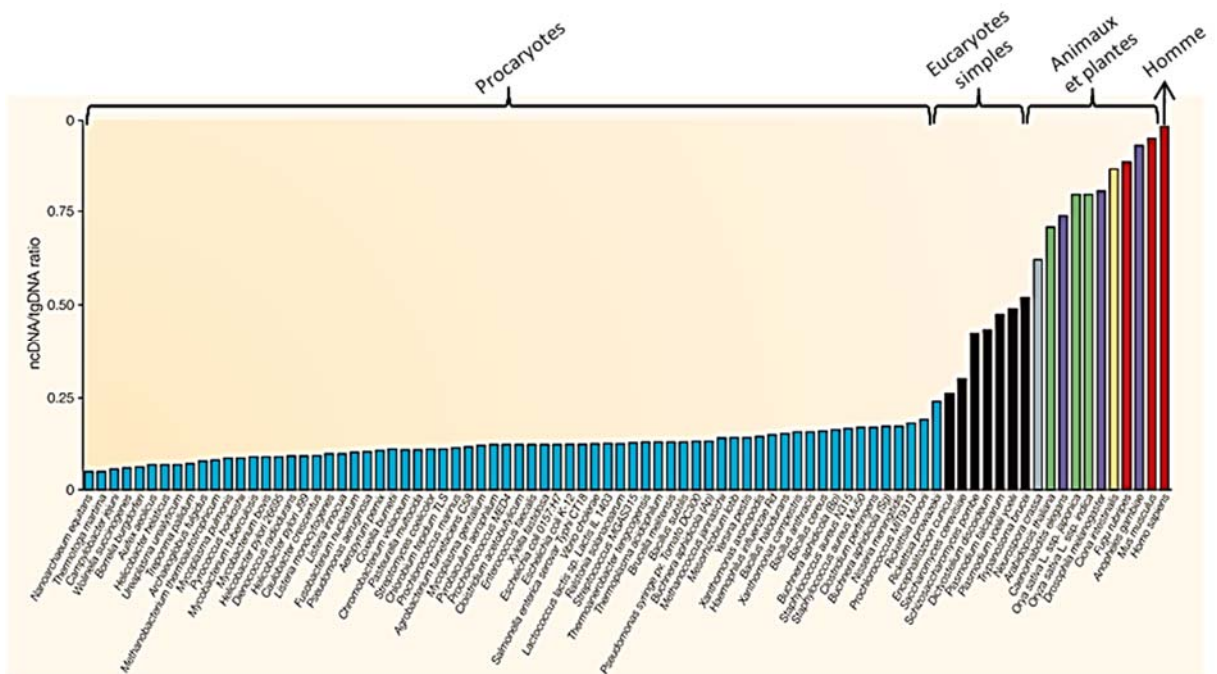
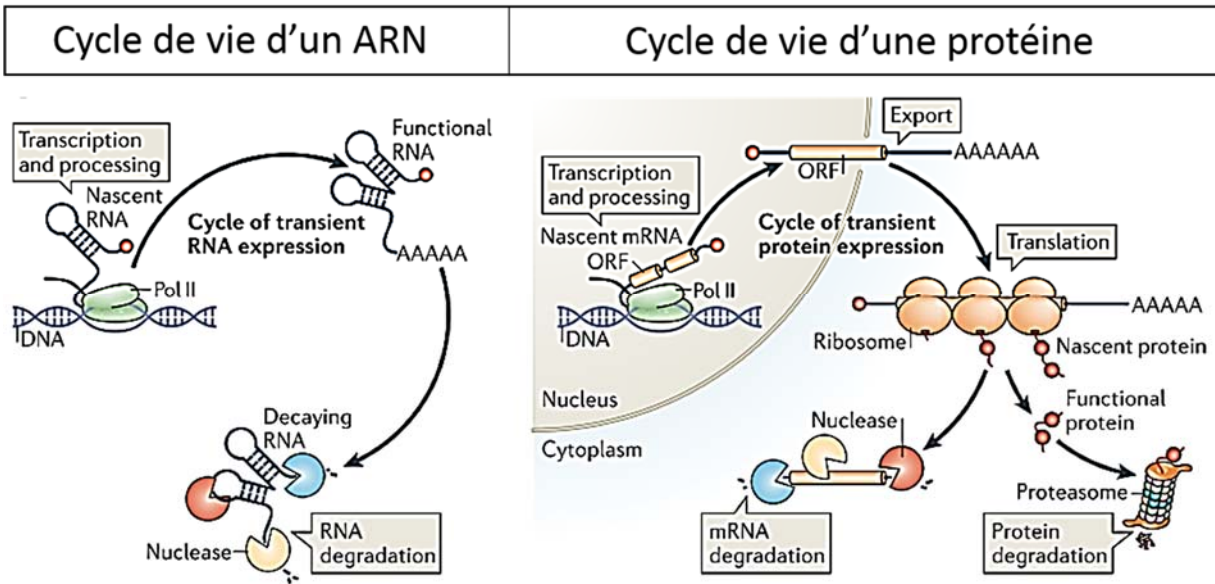


Figure 1.13 : Proportion d'ADN non-codant par rapport à l'ADN génomique total dans différents organismes. La complexité développementale d'un organisme corrèle avec la proportion de gènes non-codants dans son génome. Les bactéries ont moins de 25% d'ADN non-codant tandis que l'Homme en possède plus de 98%. Bleu : procaryotes (bactéries et archées); noir : eucaryotes simples; gris : *Neurospora crassa*; vert : plantes; violet : nématodes et insectes; jaune : *Ciona intestinalis*; rouge : vertébrés. Adaptée de Mattick, 2004.

Biogénèse des ARN longs non codants

Les ARNlnc sont également transcrits par l'ARN polymérase II de manière similaire à la transcription des ARN messagers. Leur maturation inclut également l'ajout d'une coiffe à leur extrémité 5', une polyadénylation à l'extrémité 3' et un épissage (Geisler & Coller, 2013).

Le **figure 1.14** décrit le cycle de vie d'un ARN en comparaison avec celui d'une protéine. De manière intéressante, l'expression d'un ARN est dynamique. Un ARN fonctionnel est généré rapidement mais peut être dégradé tout aussi rapidement. Au contraire, les protéines nécessitent des étapes supplémentaires, notamment l'exportation de l'ARNm du noyau et sa traduction afin de produire un peptide fonctionnel. Comme c'est le cas pour un ARN, une protéine doit être dégradée pour ne plus s'exprimer (Geisler & Coller, 2013).



Fonctions des ARN longs non-codants

Figure 1.14 : Cycle de vie d'un ARN. Les ARNlnc et les ARNm sont transcrits par l'ARN polymérase II. Pendant leur maturation, ces deux classes d'ARN sont dotés d'une coiffe en 5' et d'une queue polyA en 3' et subissent un épissage. Les ARNlnc sont alors fonctionnels tandis que les ARNm sont exportés hors du noyau pour être traduits en protéines. Adaptée de Geisler & Collier, 2013.

Les ARNlnc sont définis arbitrairement comme plus longs que 200 nucléotides (Kapranov et al., 2007). De nombreuses études ont d'abord montré combien le transcriptome pouvait être complexe, avec des ARNlnc qui chevauchent d'autres multiples transcrits aussi bien codants que non-codants. Les ARNlnc peuvent aussi se placer entre les séquences qui composent ces transcrits, au niveau des séquences introniques (Zhang et al., 2013). Cette complexité a permis de faire un grand pas dans la compréhension des gènes et de leur organisation, d'un modèle linéaire vers un modèle modulaire. Dans ce nouveau modèle, une seule séquence d'ADN peut donner lieu à un éventail de transcrits : sens et antisens, codants et non-codants (Carninci et al., 2005; Kapranov et al., 2005). Un exemple est donné dans la **figure 1.15** qui représente la structure du locus *Pax6* (Mercer et al., 2009).

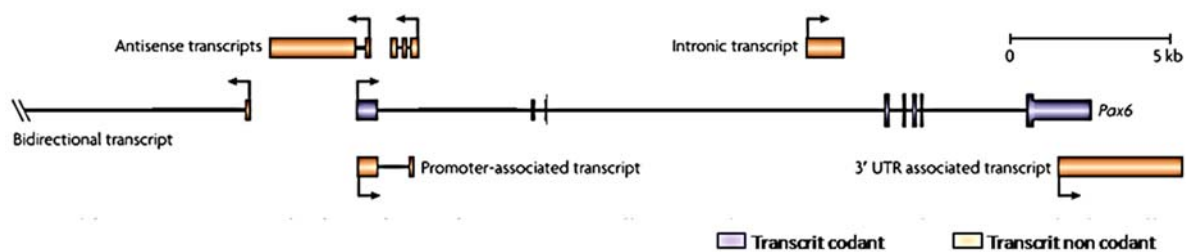


Figure 1.15 : Organisation génomique du locus *Pax6* : transcrits codants et non codants. Ce schéma illustre la complexité d'un réseau entrelacé de transcrits longs non codants (orange) associés avec le gène codant *Pax6* (violet). Adaptée de Mercer et al., 2009.

Le large répertoire fonctionnel que nous leur connaissons aujourd'hui inclut des rôles dans la dynamique chromosomique, dans la biologie des télomères et dans l'organisation structurale de la cellule (Amaral & Mattick, 2008). Par le biais de plusieurs exemples non exhaustifs, nous nous concentrerons sur l'implication des ARNlnc dans la régulation de l'expression de gènes voisins aux niveaux de la modification de la chromatine et de la transcription.

- **Modification de la chromatine guidée par les ARN longs non codants**

Les ARNlnc peuvent coordonner des modifications épigénétiques en recrutant des complexes de remodelage de la chromatine au niveau de loci spécifiques et ils sont donc qualifiés de guides. Ainsi, les ARNlnc peuvent guider des changements dans l'expression de gènes voisins – en cis – ou de gènes plus distants – en trans (K. C. Wang & Chang, 2011).

Par exemple, les gènes encodant les facteurs de transcription de la famille Hox²⁰ sont organisés en quatre groupes *HoxA*, *HoxB*, *HoxC* et *HoxD*, situés respectivement sur les chromosomes humains 7, 11, 5 et 4. Ils contiennent des centaines de ARNlnc qui sont exprimés de façon temporelle et spécifique (K. C. Wang, Helms, & Chang, 2009). Ces ARNlnc sont capables d'induire différents états de chromatine par méthylation des histones et modulent ainsi son

²⁰ « Gène homéotique »

accessibilité pour l'ARN polymérase et la transcription des gènes.

Action en trans

Le ARNInc antisens *HOTAIR*²¹, qui est situé sur le locus *HoxC*, est capable d'induire un état de répression au niveau de la chromatine du locus *HoxD* et ainsi réprimer la transcription des gènes appartenant au locus *HoxD* – en trans (Rinn et al., 2007). Le mécanisme mis en jeu est représenté dans la **figure 1.16 (A)**. *HOTAIR* recrute PRC2²² qui forme un complexe Polycomb au niveau du locus *HOXD*, ce qui induit la triméthylation des lysines en position 27 de l'histone 3 (H3K27me3). Ceci est une marque épigénétique dite répressive puisqu'elle confère un état dense et fermé à la chromatine – hétérochromatine – ce qui empêche la liaison de l'ARN polymérase et réprime l'expression des gènes associés (Mercer et al., 2009).

Ce mécanisme explique également le phénomène bien connu d'inactivation du chromosome X dans lequel le ARNInc *Xist*, accompagné de l'ARNnc *RepA*, recrute le complexe de modification de la chromatine Polycomb pour réprimer le chromosome X (Ogawa, Sun, & Lee, 2008; Zhao, Sun, Erwin, Song, & Lee, 2008) (**Figure 1.16 A**).

Action en cis

Le ARNInc *Hottip*²³, qui est situé sur le locus *HoxA*, active la transcription de plusieurs gènes voisins – en cis – en recrutant le complexe MLL²⁴ qui induit la triméthylation des lysines en position 4 de l'histone 3 (H3K4me3). Cette marque épigénétique, à l'inverse de la précédente, est dite activatrice puisqu'elle confère un état ouvert et accessible à la chromatine – euchromatine – ce qui permet la liaison de l'ARN polymérase et active l'expression des gènes associés (Song & Kingston, 2008; K. C. Wang et al., 2011).

²¹ « *HOX*transcript antisense RNA »

²² « Polycomb chromatin remodelling complex »

²³ « *HOXA* transcript at the distal tip »

²⁴ « Mixed lineage leukemia »

Ainsi, les complexes de remodelage de la chromatine possèdent souvent plusieurs domaines de liaison à l'ARN mais une très petite spécificité de séquence d'ADN (Meier & Brehm, 2014).

- **Régulation transcriptionnelle par les ARN longs non codants**

Certains promoteurs proximaux sont transcrits en ARNlnc et la figure **1.16 (B)** montre trois différents mécanismes par lesquels les ARNlnc peuvent agir pour contrôler la régulation transcriptionnelle de gènes voisins – en cis (Mercer et al., 2009).

De la même manière que les ARNlnc recrutent des complexes de modification de la chromatine, ils recrutent des protéines qui possèdent aussi des domaines de liaison à l'ARN et peuvent ainsi moduler leur activité. Par exemple, le gène *cycline D1* encode un régulateur important du cycle cellulaire. Il est régulé par des signaux de dommages à l'ADN qui induisent l'expression de plusieurs ARNlnc, associés à son promoteur, avec lesquels il coopère pour réguler l'activité de *TLS*²⁵ qui encode une protéine de liaison à l'ARN. Quand TLS est recrutée, elle inhibe l'activité histone acétyl transférase des deux protéines CBP²⁶ et p300 afin de réprimer l'expression de *cycline D1* et réguler le cycle cellulaire (X. Wang et al., 2008).

Les ARNlnc peuvent également agir comme cofacteurs afin de moduler l'activité de facteurs de transcription. Par exemple, le ARNlnc *Dlx6as*²⁷ ou *Evf2* est transcrit d'un enhancer conservé chez les vertébrés. Il se lie et recrute le facteur de transcription *Dlx2*²⁸ à cet enhancer pour induire l'expression de gènes voisins, notamment *Dlx6* (Berghoff et al., 2013).

Les ARNlnc sont aussi capables de réguler l'activité de la machinerie de transcription par interaction avec le complexe d'initiation de la transcription. Par exemple, la régulation du gène qui encode la dihydrofolate réductase (DHFR) est dépendante d'un ARNlnc. Ce dernier est capable de se lier au niveau du promoteur de *DHFR* où il forme un triplex et ainsi interférer

²⁵ « Translocated in Liposarcoma »

²⁶ « CREB Binding Protein »

²⁷ « Distal-Less Homeobox 6 antisens »

²⁸ « Distal-Less Homeobox 2 »

avec le cofacteur de transcription TFIID²⁹ qui ne pourra pas se lier (Martianov, Ramadass, Serra Barros, Chow, & Akoulitchev, 2007).

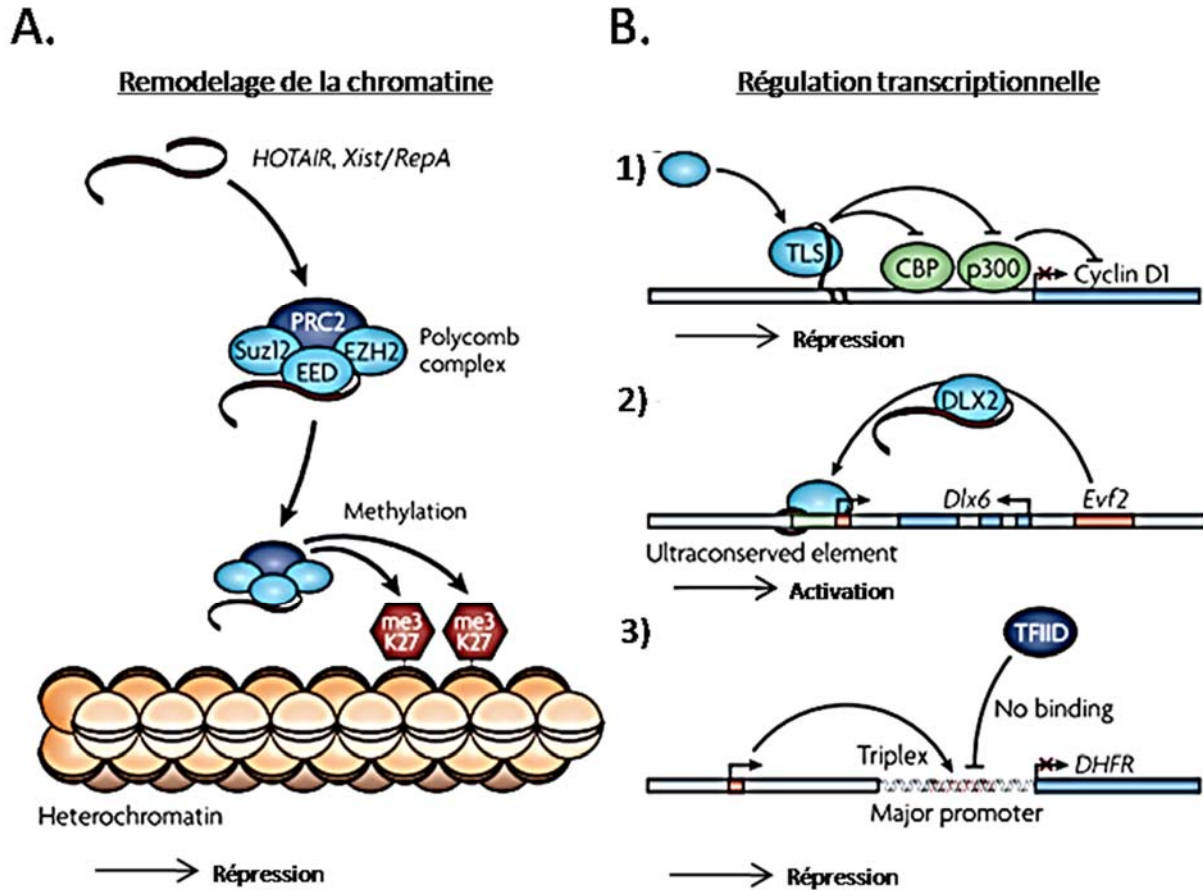


Figure 1.16 : Différents mécanismes de régulation de la transcription par les ARN longs non-codants.

A. Les ARNnc peuvent lier et recruter des complexes de modification de la chromatine et ainsi cibler leur activité au niveau de loci d'ADN spécifique afin de moduler la transcription. L'expression des gènes peut être réprimée ou activée selon la nature de la marque épigénétique ajoutée par le complexe. B. 1) Les ARNnc sont capables de lier et recruter des protéines de liaison à l'ARN pour moduler leur activité. TLS est recrutée par ARNnc et inhibe l'activité histone acétyl transférase de CBP et p300 afin de réprimer l'expression du gène de la cycline D. 2) Le ARNnc Evf2 joue le rôle de cofacteur et lie le facteur de transcription DLX2 qu'il recrute à son locus pour induire la transcription du gène voisin, Dlx6. 3) Le ARNnc se lie au niveau du promoteur du gène *DHFR* où il forme une structure en triplex qui empêche liaison de TFIID, un cofacteur d'initiation de la transcription. Adaptée de Mercer et al., 2009.

²⁹ « Transcription Factor II D »

CHAPITRE 2 : HYPOTHESES

Avant de présenter les objectifs de recherche, voici les hypothèses sur lesquelles nous avons basé notre travail.

- Le gène d'ARN long non codant *K12* est normalement exprimé dans les CCNe qui colonisent les intestins pour former le SNE.
- Chez les embryons Spot, l'expression de *K12* dans les CCN est affectée par l'insertion transgénique.
- *K12* est impliqué dans la migration, la prolifération, la différenciation ou la survie des CCNe.

CHAPITRE 3 : OBJECTIFS ET APPROCHE GENERALE

2.1. Quelle est l'origine embryonnaire du défaut de formation du système nerveux entérique chez Spot?

Objectif #1 : Caractériser le défaut embryonnaire du système nerveux entérique chez Spot

A l'âge adulte, la lignée transgénique Spot présente les signes classiques de mégacôlon aganglionnaire. Notre objectif premier est donc de déterminer le défaut embryonnaire du SNE et notamment le processus sous-jacent défectueux qui en est responsable.

- **Fluorescence endogène *Gata4*-RFP : Défaut de colonisation et migration chez Spot**

Dans un premier temps, nous déterminerons la migration et la colonisation des CCNe dans les intestins embryonnaires Spot.

- **Immunomarquages : Différenciation, prolifération et mort cellulaires chez Spot**

Dans un deuxième temps, des immuno-marquages permettront d'évaluer les différents processus cellulaires impliqués dans la formation de SNE et qui pourraient être les causes du défaut Spot. Les trois événements suivants seront testés : différenciations neuronale et gliale, prolifération cellulaire et mort cellulaire.

2.2. Quelles sont les causes génétiques du défaut de formation du système nerveux entérique chez Spot?

Objectif #2 : Identifier les gènes candidats responsables du phénotype Spot

Les causes génétiques du mégacôlon aganglionnaire sont encore peu claires. Rappelons que des mutations dans des gènes connus ne représentent qu'environ la moitié des cas cliniquement observés. Nous cherchons à trouver de nouveaux gènes impliqués dans la maladie. Pour cela, le laboratoire a fait séquencer le génome et le transcriptome des souris Spot, à partir de CCNe (e12.5).

- **Séquençage du génome : Localisation de l'insertion transgénique**

Dans un premier temps, les résultats de séquençage du génome des souris Spot permettront de déterminer où a lieu l'insertion transgénique.

- **Séquençage du transcriptome : Mise en évidence des gènes candidats**

Dans un deuxième temps, une analyse poussée du séquençage du transcriptome de Spot comparé à celui d'un contrôle, nous dirigera vers les gènes potentiellement intéressants.

- **RT-PCR : Confirmation des profils d'expression des gènes candidats**

Dans un troisième temps, nous confirmerons par RT-PCR les profils d'expression des gènes potentiels à différents stades embryonnaires chez Spot.

- **Essais luciférase : Évaluation de l'activité transcriptionnelle de l'élément conservé sur le locus *Nr2f1-K12***

Dans un quatrième temps, nous évaluerons par essais luciférase le potentiel régulateur d'une séquence de 676 pb (conservée sur le locus *Nr2f1-K12*) à l'égard des gènes qui lui sont voisins.

- **Souris transgéniques : Surexpression des gènes candidats dans des modèles murins et validation des gènes candidats**

Dans un cinquième et dernier temps, nous entamerons des expériences de gain de fonction dans des modèles murins afin de valider le potentiel des gènes candidats mis en évidence.

2.3. K12, un gène d'ARN long non codant régulateur impliqué dans la formation du système nerveux entérique?

Objectif #3 : Définir le profil de K12 dont rien n'est connu présentement

Puisqu'aucune information n'est disponible dans la littérature à propos de ce ARNInc, tout reste à découvrir. Notre hypothèse de départ réside dans le fait que le ARNInc K12 régule l'expression de *Nr2f1* dont il est l'antisens et qu'ils sont, ensemble, impliqués dans la formation du SNE.

▪ **RT-PCR : Les différents isoformes de K12 et leur expression dans les CCN**

La première étape de cette étude est de générer les outils moléculaires nécessaires. Dans un premier temps, nous nous baserons sur les prédictions disponibles sur ensembl afin d'amplifier le gène *K12* et ses différentes isoformes, d'une façon que nous appellerons pleine longueur. Les différents isoformes pleine longueur seront amplifiés à partir d'intestin entier mais une étude plus approfondie sera menée afin de déterminer le niveau d'expression de chaque isoforme dans les CCNe – qui forment le SNE – comparé à leur niveau d'expression dans toutes les autres cellules entériques. Une importance particulière sera accordée aux isoformes exprimés voire surexprimés dans les CCNe.

▪ **Système MS2-YFP : Localisation subcellulaire de K12**

Dans un deuxième temps, la localisation intracellulaire – nucléaire ou cytoplasmique – de *K12* sera déterminée à l'aide du système MS2-YFP nous permettant ainsi de confirmer le potentiel régulateur du gène.

CHAPITRE 4 : MATERIEL ET METHODES

Souris

Toutes les expériences utilisant les souris ont été menées en accord avec la réglementation dictée par le Conseil Canadien de Protection des Animaux (CCPA) et approuvées par le Comité Institutionnel de Protection des Animaux (CIPA) local de l'Université du Québec à Montréal (UQAM) selon le protocole #650. L'euthanasie des souris a été effectuée par administration d'isoflurane suivi de dioxyde de carbone.

Pour la génération des embryons, les souris ont été accouplées durant une nuit. Un bouchon vaginal observé le lendemain matin désigne le jour embryonnaire (e)0.5.

Les principaux stades d'études ont été : e12.5, e13.5 et e15.5

- Le stade e15.5 a été nécessaire pour l'analyse de la différenciation gliale puisque le marqueur glial S100 β apparaît normalement dans l'intestin autour de e14.5 - e15.
- Le stade e12.5 est un stade plus précoce du développement auquel le petit intestin et le côlon proximal sont normalement entièrement colonisés par les progéniteurs qui terminent de coloniser le colon distal. A ce stade, les neurones ont déjà commencé à se différencier dans l'intestin et le marqueur neuronal HuC/D y est normalement présent.

Ce stade est utilisé de manière préférentielle dans notre laboratoire s'il n'y a aucune condition particulière comme c'était le cas pour S100 β qui apparaît plus tardivement.

- Le stade e13.5 est un intermédiaire qui nous a servi notamment pour la confirmation du RNA-seq. Ce stade a été utilisé notamment pour confirmer une différenciation gliale précoce et la confirmation du RNA-seq.

- **Lignée transgénique Spot**

La lignée transgénique Spot a été générée par microinjection du minigène *tyrosinase* dans le pronoyau d'embryons FVB selon Nagy (2003) et Methot (1995) (Methot et al., 1995; Nagy, Gertsenstein, Vintersten, & Behringer, 2003). Afin de marquer de manière endogène les CCN, des souris Spot, dans le fond FVB, ont été croisées avec deux lignées transgéniques utilisées dans le laboratoire et préalablement décrites par Pilon (2008) : *Gata4p-GFP* ou *Gata4p-RFP*, aussi conservées dans le fond FVB (Pilon et al., 2008).

- **Lignées transgéniques *Nr2f1* et *K12-F6R4****

Concernant les expériences de surexpression de *Nr2f1* et de *K12-court*, les constructions adéquates ont été microinjectées dans le pronoyau d'embryons B6C3 selon la technique classique (Nagy, Gertsenstein, Vintersten, & Behringer, 2003). Les embryons obtenus ont été collectés 15 jours suivant la microinjection (e15.5) et criblés pour l'expression de la GFP.

Pour les transgéniques *Nr2f1*, nous avons construit un plasmide permettant la co-expression de la protéine *Nr2f1* et de la GFP sous le contrôle du promoteur minimal *Hsp68* (Kothary et al., 1989) et de l'enhancer de *Sox10* spécifique aux CCN (U3 ou MCS4) (Antonellis et al., 2008; Werner, Hammer, Wahlbuhl, Bosl, & Wegner, 2007).

Pour les transgéniques *K12*, nous avons construit deux plasmides qui ont été co-injectés, le but étant de ne pas altérer l'expression de l'ARN non codant par la présence de la GFP dans le même plasmide. La première construction permet l'expression de la forme courte de *K12-F6R4** sous le contrôle du promoteur minimal *Hsp68* et de l'enhancer U3 de *Sox10*, alors que la deuxième construction permet l'expression de la GFP sous le contrôle de *Hsp68* et de U3.

Tableau IV.I: Oligos utilisés pour les géotypages contrôle et mutant Spot.

	Oligo sens (F)	Oligo antisens (R)	Amplification
WT	5' CCA TGTATA CTC TTT GGT TGG TGG	5' TTT GTG GCT GTA AAG ATT GAC TCC	650 pb
Spot	5' TTT AGC AAA TCC CAG TCA TTT CTT AG	5' TTT GTG GCT GTA AAG ATT GAC TCC	500 pb

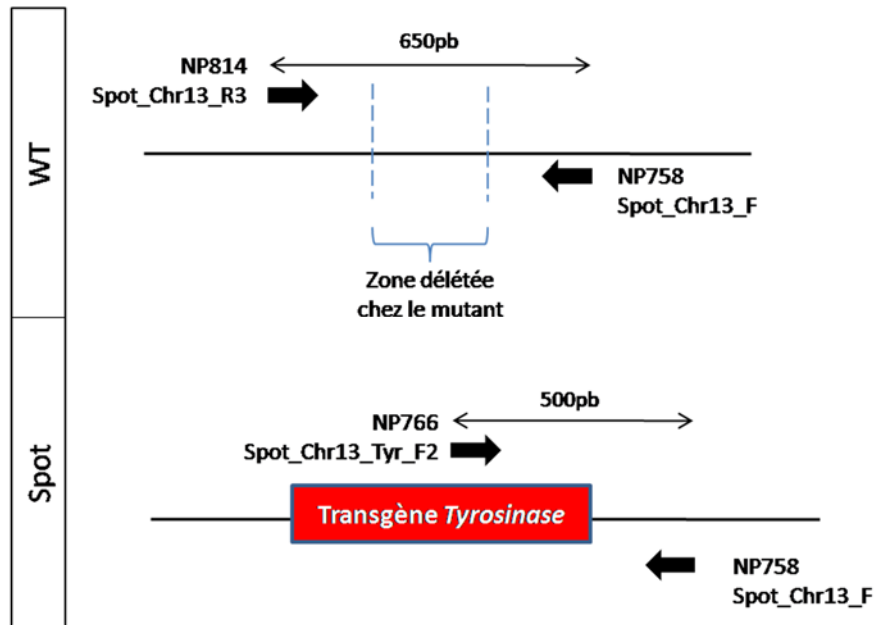


Figure 4.1 : Stratégies de génotypages contrôle et mutant Spot. Le génotypage d'un intestin contrôle de type sauvage donne une bande à 650 pb tandis que celui d'un mutant homozygote Spot^{Tg/Tg} donne une bande à 500 pb. Dans le cas d'un hétérozygote Spot^{Tg/+}, nous obtenons une bande de chaque.

Génotypage par PCR

- **Spot**

Pour toutes les expériences utilisant des souris et notamment des embryons de souris, le génotypage de l'allèle Spot a été fait par PCR. Lors de la dissection, les têtes des embryons ont été conservées individuellement et traitées à la protéinase K à 50°C pendant une nuit. Le lendemain, une extraction d'ADN au phénol-chloroforme a permis d'obtenir l'ADN matrice, dont 1ul a été prélevé pour la réaction de PCR. L'ADN polymérase Taq standard (Feldan) et des oligos qui bordent l'insertion Spot ont également été utilisés. La stratégie de génotypage du site d'insertion est représentée dans la **figure 4.1** et les séquences des oligos sont données

dans le **tableau IV.I**. La réaction de PCR a consisté en 10 cycles de : 20 secondes de dénaturation à 95°C, 30 secondes d'hybridation à 62°C et 30 secondes d'élongation à 72°C, suivis de 20 cycles de : 20 secondes de dénaturation à 95°C, 30 secondes d'hybridation à 60°C et 30 secondes d'élongation à 72°C.

▪ ***Nr2f1* et *K12-F6R4****

Pour les expériences de surexpression de *Nr2f1* et *K12-court* dans des souris, les têtes des embryons collectés à e15.5 sont conservées individuellement, traitées à la protéinase K de la même manière que pour le génotypage Spot. En revanche, la stratégie de génotypage et les oligos utilisés sont différents : les amorces sens et antisens s'hybrident respectivement à l'enhancer U3 de *Sox10* et le promoteur minimal *Hsp68* (**Tableau IV.II**). La réaction de PCR a consisté en 30 cycles de : 20 secondes de dénaturation à 95°C, 30 secondes d'hybridation à 60°C et 1 minute d'élongation à 72°C.

Tableau IV.II: Oligos utilisés pour les génotypages des embryons transgéniques pour la surexpression de *Nr2f1* et *K12-F6R4**

	Oligo sens (F)	Oligo antisens (R)	Amplification
U3-Hsp68	5' CCA TGG GCT AGC GTG CCA GGC AGC AGA GGC TAG GGT	5' CGC CCT GCG CCT TTA AGG AGT CTT	1 000 pb

Immunomarquages et essai TUNEL

Les intestins embryonnaires ont été disséqués aux jours embryonnaires adéquats – e12.5, e13.5 et e15.5 – fixés au paraformaldéhyde (4% dans PBS 1X) à température pièce pendant 1H ou alternativement à 4°C pendant une nuit, déshydratés au méthanol puis conservés à -20°C pendant maximum trois mois. Après réhydratation au PBS, les intestins ont été incubés à température ambiante pendant 2H dans une solution de blocage (10% FBS, 0.1% Triton-X100 dans PBS 1X). Suite au blocage, les intestins ont été incubés à 4°C pendant une nuit dans la solution d'anticorps primaire selon le **tableau IV.III**. Le lendemain, les tissus ont été lavés dans

du PBS et incubés à température ambiante pendant 2H dans la solution d'anticorps secondaire selon le **tableau IV.III**. Enfin, les tissus ont été incubés à température pièce 10 minutes dans une solution de DAPI à 1µg/ml. Les solutions d'anticorps utilisées ont été diluées dans la solution de blocage.

Pour l'essai TUNEL, les tissus réhydratés ont été perméabilisés à 37°C pendant 20 minutes dans une solution de Triton-X100 0.3% et citrate de sodium 0.1% dans PBS 1X. Puis, ils ont été incubés à 37°C pendant 1H dans une solution disponible dans la trousse « In situ cell death detection » disponible chez Roche.

Les méthodes ci-dessus ont été préalablement mises au point dans notre laboratoire et sont précisément décrites par Karl Bergeron (2015) (Bergeron et al., 2015).

Tableau VI.III: Anticorps utilisés pour les expériences d'immunofluorescence.

	Anticorps	Dilution	Source
Anticorps primaire	Goat anti-Sox10	1 : 100	Santa Cruz Biotechnology (sc-17342)
	Mouse anti-HuC/D	1 : 500	Life Technologies (A-21271)
	Rabbit anti-S100β	1 : 500	Dako (Z0311)
	Rabbit anti-Ki67	1 : 500	Abcam (ab15580)
Anticorps secondaire	Bovine anti-goat alexa fluor 488	1 : 500	Jackson Immuno Research (805-545-180)
	Donkey anti-mouse alexa fluor 647	1 : 500	Jackson Immuno Research (715-605-150)
	Donkey anti-rabbit alexa fluor 594	1 : 500	Jackson Immuno Research (711-585-152)

Microscopie confocale et quantification cellulaire

Suite aux immunomarquages, les tissus marqués ont été étalés et montés entre lame et lamelle, dans un milieu de montage, délicatement en prenant soin de ne pas écraser les tissus. Après 1H de séchage, les tissus étaient prêts à être observés au microscope confocal. Les lames ont été observées majoritairement au grossissement 60X, dans l'huile.

La quantification des cellules a été faite dans un second temps, manuellement, et a consisté à surligner, avec le logiciel ImageJ, une à une chaque cellule positive au marqueur d'intérêt.

Tri cellulaire par FACS (« Fluorescence-activated cell sorting »)

Les intestins embryonnaires Spot::*Gata4*-RFP ont été disséqués à e12.5 et e13.5 et traités individuellement pour leur dissociation dans une solution de collagénase (0.4 mg/ml; Sigma C2674), dispase II (1.3 mg/ml; Life Technologies 17105-041) et DNase I (0.5 mg/ml; Sigma DN25). Un trieur cellulaire (MoFlo XDP, Beckman Coulter) nous a permis de collecter les cellules RFP-positives de chaque intestin, soit environ 10 000 cellules par intestin. Chaque échantillon de cellules est conservé à -80°C avant de procéder à l'extraction d'ARN selon la trousse « RNAeasy Plus purification » disponible chez Qiagen.

Séquençages du génome et du transcriptome

Les séquençages du génome et du transcriptome ont été effectués par le Centre d'innovation de génome Québec et de l'Université McGill, à partir de CCN triées e12.5, comme préalablement décrit par Bergeron (2015) (Bergeron et al., 2015). La plateforme utilisée a été la plateforme « HiSeq 2000 » (Illumina). La méthode utilisée s'appelle « paired-end sequencing » : elle permet de séquencer les deux extrémités d'un fragment et fournit des séquences qui peuvent facilement être alignées sur un génome de référence (**Figure 4.2**).

Le matériel de Spot a été fragmenté mécaniquement (taille d'approximativement 300 - 500 pb). A partir de ces fragments, entre 50 et 150 millions de séquences « paired-end » ont été obtenues, filtrées selon leur qualité et cartographiées sur le génome de référence de souris *Mus musculus* (mm9 pour l'ADN génomique et mm10 pour l'ARN). Les analyses d'ontologie génomique ont été effectuées à l'aide de l'outil GOTOolBox, permettant l'identification des gènes sur- ou sous-représentés parmi un éventail de gènes (Martin et al., 2004).

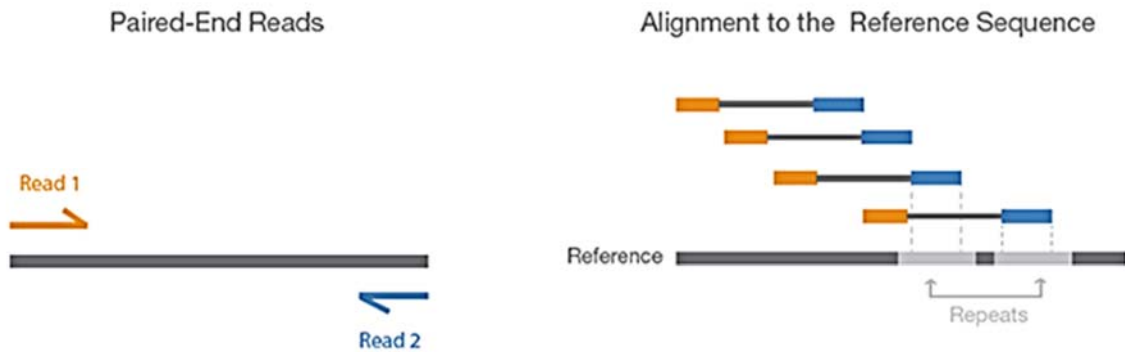


Figure 4.2: Principe du séquençage « paired-end ». Cette méthode est basée sur le séquençage des deux extrémités d'un fragment suivi de l'alignement de ces séquences sur un génome de référence. Adaptée du site internet de la plateforme <http://www.illumina.com>.

RT-PCR semi-quantitatives

▪ Confirmation du RNAseq

La confirmation du RNAseq a été menée à partir d'ARN de CCNe triées d'intestins WT et Spot^{Tg/Tg}, à deux stades : e12.5 et e13.5. 10 ng d'ARN ont été rétrotranscrits par l'ARN polymérase Superscript II (Life Technologies, Canada) afin d'obtenir l'ADNc dont 1ul a été utilisé pour l'amplification des cibles par PCR, avec l'ADN polymérase (Feldan). Les oligos utilisés sont indexés dans le **tableau IV.IV**. La réaction a consisté en 35 cycles de : 20 secondes de dénaturation à 95°C, 30 secondes d'hybridation à 60°C et entre 30-120 secondes d'élongation à 72°C selon la taille de la cible. Pour vérification, les séquences ont été clonées dans le vecteur pGEM-t (Promega) puis séquencées par le Centre d'innovation de génome Québec et de l'Université McGill. Le niveau d'expression de Gapdh a été utilisé pour la normalisation des niveaux d'expression et des outils de densitométrie fournis par ImageJ ont été utilisés pour la quantification des amplifications sur gel d'agarose 2%.

Tableau IV.IV: Oligos utilisés pour les RT-PCR de *Nr2f1* et des différentes formes de *K12*.

Cible	Oligo sens (F)	Oligo antisens (R)		Amplification	
		Pleine longueur	Confirmation RNAseq	Pleine longueur	Confirmation RNAseq
<i>K12</i> court	F1: 5' TTC GAA ACA GAA GCC CCA TCC CCA CAG CCA	R4 (Exon 3): 5' GGG CCC CTT CTA ACA GTA GTT TAT TCA GCA ATC TTCA G		<i>Non</i>	
	F2: 5' TTC GAA ATT GTA CGC AGA TGA TGG AGA GGC			<i>Non cloné</i>	
	F3: 5' TTC GAA GAA GAA AAT GCT TGA GAA AAT AAG GAA AAA GAG			2160 pb	
	F4: 5' TTC GAA GCA CAG GGC GGC AGA GTG ACA AAG			2280 pb 2480 pb	
	F5: 5' TTC GAA GGA AGG AAG GAA GGA AGG AAG GAA			<i>Non</i>	
	F6: 5' TTC GAA AGT CTC CCT CGG ACT CTG GGC TGT		R5 (Exon 3) : 5' ATA AAG TAG GGA TCC GTT TCC AGT TGT GTC AAC	2260 pb 2460 pb	160 pb 360 pb 560 pb
<i>K12</i> long	F1: 5' TTC GAA ACA GAA GCC CCA TCC CCA CAG CCA	R1 (Exon 4): 5' GGG CCC CAC ATT TCA GAG ATA TTT ACT GAG TAG TAA CG		<i>Non</i>	
	F2: 5' TTC GAA ATT GTA CGC AGA TGA TGG AGA GGC			4180 pb	
	F3: 5' TTC GAA GAA GAA AAT GCT TGA GAA AAT AAG GAA AAA GAG			4140 pb	
	F4: 5' TTC GAA GCA CAG GGC GGC AGA GTG ACA AAG			<i>Non</i>	
	F5: 5' TTC GAA GGA AGG AAG GAA GGA AGG AAG GAA			<i>Non</i>	
	F6: 5' TTC GAA AGT CTC CCT CGG ACT CTG GGC TGT		R3 (Exon 4) : 5' ATG TTA GGA CTG TCA GCT TGG TGG	4140 pb	1 500 pb
<i>Nr2f1</i>	5' CTT TCA GGA ACA GGT GGA GAA GC		5' AGG AAC ACT GGA TGG ACA TGT AAG G		400 pb



Figure 4.3 : Positions des oligos utilisés pour les différentes expériences de RT-PCR des différentes formes de *K12*. Les amorces F1 à F6 sont les amorces sens et les amorces R1 à R4 sont les amorces antisens. Les amorces R1 et R4 nous ont permis d’amplifier les transcrits pleine longueur par RT-PCR tandis que les amorces R3 et R5 ont été utilisées pour confirmer le RNAseq par RT-PCR.

▪ Clonage des *K12*

Afin de générer les différents isoformes de *K12* pleine longueur, les expériences de RT-PCR ont été effectuées à partir d'ARN d'embryon entier WT. 10 ng d'ARN ont été rétrotranscrits par l'ARN polymérase Superscript III (Life Technologies, Canada). 1ul d'ADNc ainsi obtenu a été utilisé pour l'amplification par PCR par des isoformes pleine longueur par l'ADN polymérase Long Range (Feldan) selon le tableau 3.4. La réaction a consisté en 35 cycles de : 20 secondes de dénaturation à 95°C, 30 secondes d'hybridation à 60°C et 5 minutes d'élongation à 68°C. Pour vérification, les séquences entières ont été clonées dans le vecteur pGEM-t (Promega) puis séquencées par le Centre d'innovation de génome Québec et de l'Université McGill.

Pour la comparaison des niveaux d'expression en fonction du matériel de départ, les RT-PCR ont été faites dans les mêmes conditions énoncées ci-dessus à partir de CCNe et des autres cellules entériques triées d'intestins WT et Spot^{Tg/Tg}.

Essais luciférase

L'élément conservé – EC 2.5 – de 676 pb sur le locus *Nr2f1-K12*, à proximité de l'insertion transgénique, a été identifié à l'aide de la base de données de séquences de 60 vertébrés disponible sur le site genome.ucsc.edu. L'EC2.5 a été amplifié par RT-PCR (**Tableau IV.V**), à partir d'intestin entier WT e12.5, cloné dans pGEM-t (Promega) et validé par séquençage par le Centre d'innovation de génome Québec et de l'Université McGill. La construction à tester a été générée par sous-clonage de l'EC2.5 dans le vecteur pXP2 contenant le promoteur minimal Thymidine kinase (Nordeen, 1988) en amont du gène rapporteur de la luciférase. 200 ng d'ADN plasmidique ont été transfectés dans des Neuro-2a (cellules de neuroblastome) et P19 (cellules de carcinome embryonnaire) et l'activité de l'EC2.5 a été déterminée 48H plus tard par essais luciférase. Les cellules ont d'abord été lysées à température pièce pendant 20 minutes sous agitation, dans un tampon de lyse (NP40 10%, DTT 1 mM et Tris pH8 1 mM). Pour mesurer l'intensité lumineuse, le lysat cellulaire est incubé pendant 5 secondes dans un luminomètre – dans le noir -- avec la solution d'essai (Glycyl glycine 25 mM, MgSO4 15 mM, KPO4 15 mM,

EGTA 4 mM, ATP 2 mM et DTT 2 mM) et la luciférine.

Tableau IV.V: Oligos utilisés pour la RT-PCR de l'EC2.5.

	Oligo sens (F)	Oligo antisens (R)	Amplification
EC2.5	5' GGT ACC ATG GAC TTT TCT GAA TCA CTC ATC C	5' CTC GAG GGA TAC AAGV AAA ATG CCC AAA TGC	676 pb

Système MS2-YFP

Les séquences des différents isoformes de *K12* ont été sous-clonées en amont de 12 répétitions de motif tiges-boucles MS2 (x12), dans le vecteur d'expression pCMV5-MS2 qui contient un promoteur CMV. 250 ng d'ADN plasmidique contenant *K12* ont été co-transfectés avec 250 ng de plasmide pMS2-YFP qui permet l'expression de la protéine MS2 fusionnée à la YFP, dans des cellules Neuro-2a. Deux variantes du plasmide pMS2-YFP ont été construites et utilisées : une variante qui contient une séquence de localisation nucléaire (NLS) fusionnée à la YFP et une autre variante dans laquelle cette séquence a été retirée. 48H après la co-transfection, les cellules ont été fixées au paraformaldéhyde (4% dans PBS) sur glace pendant 5 minutes, puis marquées au DAPI (1µg/ml) à température pièce pendant 10 minutes.

Une schématisation des deux types d'expériences que nous avons menés est montrée en **figure 4.4** et plus de détails sur le principe et les techniques associés à cette méthode sont décrits dans une vidéo de Brody (Brody & Shav-Tal, 2011). La protéine MS2 reconnaît spécifiquement le motif MS2. Si la YFP est fusionnée à la protéine MS2 et l'ARNInc étiqueté par un motif MS2, la YFP traduira donc la localisation de l'ARNInc à condition que l'ARNInc et la protéine MS2-YFP soient cotransfectés.

Expérience A: K12-MS2 + MS2-YFP [sans NLS]



Expérience B: K12-MS2 + MS2-YFP [avec NLS]



Figure 4.4 : Principe du système MS2-YFP. Pour déterminer leur localisation subcellulaire, les ARN étiquetés MS2 sont reconnus par la protéine de fusion MS2-YFP. Deux variantes sont testées, avec et sans le site de localisation nucléaire dans le plasmide pMs2-YFP.

Immunobuvardage

Afin de valider la construction pour générer les embryons transgéniques Nr2f1, l'expression de la protéine Nr2f1 a été confirmée par immunobuvardage de type western. Pour cela, 7µg du plasmide Sox10.U3-Hsp68-Nr2f1-IRES-eGFP ont été transfectés dans des Neuro-2a. 48H après, il y eu lyse cellulaire et extraction, puis l'extrait protéique a été conservé à -80°C. La quantité de protéines dans l'extrait a été calculée à l'aide d'une courbe standard de BSA et environ 20 µg de protéines ont été utilisés pour migration sur gel. Les protéines migrent selon leur taille et la taille attendue pour Nr2f1 était de 45 kDa. Après transfert des protéines sur la membrane, celle-ci a été incubée dans une solution de blocage pendant 2H puis, à 4°C pendant une nuit dans une solution d'anticorps primaire de souris anti-Nr2f1 (AB181137, Abcam ; dilution 1 : 1000). Enfin, le lendemain, elle a été incubée à température pièce pendant 1H dans une solution d'anticorps secondaire lié à la peroxidase de raifort, HRP anti-souris (dilution 1 : 10 000).

Statistiques

Les données présentées constituent la moyenne de toutes les données obtenues pour un nombre n de valeurs. Les quantifications ont été confrontées au test de Student pour évaluer la significativité des résultats. Les résultats ont été considérés comme significatifs lorsque la p -value était inférieure à 0.05 avec une étoile (*) qui correspond à $p \leq 0.05$, deux étoiles (**) qui correspondent à $p \leq 0.01$, trois étoiles (***) qui correspondent à $p \leq 0.001$ et quatre étoiles (****) qui correspondent à $p \leq 0.0001$.

De manière générale, N représente le nombre d'animaux par groupe (WT ou Spot homozygotes) et n représente le nombre moyen de cellules par groupe (WT ou Spot homozygotes).

CHAPITRE 5 : RESULTATS

5.1. Quelle est l'origine embryonnaire du défaut de formation du système nerveux entérique chez Spot?

5.1.1. Migration et colonisation des CCNe durant le développement

L'intestin embryonnaire Spot montre un retard de migration des CCNe associé à un défaut de colonisation du caecum qui ne sont jamais rattrapés dans le temps (Figure 5.1)

Rappelons que la lignée transgénique *Gata4*-RFP est une lignée de souris disponible au laboratoire qui permet de marquer toutes les CCN de manière fluorescente avec la RFP (Pilon et al, 2008). Ainsi, nous avons pu marquer de manière endogène les CCN de souris Spot par croisement entre la lignée *Gata4*-RFP et la lignée Spot dans le fond FVB : les CCN sont marquées dans l'embryon entier et notamment dans l'intestin embryonnaire.

Après dissection des intestins à différents stades (e10.5, e11.5, e12.5, e15.5), nous avons facilement pu observer la formation du SNE avec la colonisation de l'intestin par les CCNe, grâce à la fluorescence RFP.

De manière générale, on observe qu'il y a un retard de migration des CCNe d'origine vagale dans les intestins Spot^{Tg/Tg} par rapport aux intestins contrôles de type sauvage. À e15.5, dans les intestins contrôles, le côlon est totalement colonisé (jusqu'à l'anus) alors que dans les intestins Spot^{Tg/Tg}, les CCNe ont à peine colonisé le côlon proximal. Ce retard de migration est détecté dès e12.5, où le front de migration des CCNe atteint presque la moitié du côlon dans les intestins contrôles tandis que les bras de migration des CCNe s'arrêtent dans la région post-caecum dans les intestins Spot^{Tg/Tg}. À des stades plus précoces, comme e11.5 et voire e10.5, le délai de migration reste généralement perceptible. Cependant, il y a toujours une variation naturelle entre les animaux qui ne nous permet pas d'identifier le défaut clairement. Finalement, avec le développement dans le temps, le retard de migration s'aggrave et n'est jamais rattrapé.

Puisque les CCNe d'origine vagale constituent la majorité des cellules progénitrices du SNE, notre analyse a été concentrée sur cette population de cellules. En revanche, nous pouvons également observer la présence des CCNe d'origine sacrale qui commencent à coloniser l'anus mais qui – comme nous l'attendions – ne rattrapent en aucun cas le défaut de migration accusé par les CCNe vagales.

Au retard de migration des CCNe d'origine vagale, s'ajoute un défaut de colonisation des CCNe dans le caecum (marqué par une étoile rouge) des intestins $Spot^{Tg/Tg}$, alors que le caecum est uniformément colonisé dans les intestins contrôles. Ce défaut de colonisation n'apparaît qu'à partir du moment où les CCNe ont normalement atteint le caecum, c'est-à-dire à e12.5.

Concernant les intestins embryonnaires hétérozygotes $Spot^{Tg/+}$, le défaut de migration des CCNe d'origine vagale est un défaut intermédiaire entre les intestins contrôles et les intestins homozygotes $Spot^{Tg/Tg}$. Le défaut de colonisation du caecum y est présent. Ces données ne sont pas montrées dans la **figure 5.1**.

Une différenciation précoce ou un manque de cellules progénitrices peut perturber la colonisation de l'intestin par les CCNe et être la cause d'une formation incomplète du SNE. Pour identifier quel est le processus responsable du défaut de formation du SNE dans les intestins $Spot$, des expériences d'immunofluorescence ont été menées afin d'évaluer les différenciations gliale et neuronale, la prolifération ainsi que la mort cellulaire des CCNe dans les intestins embryonnaires $Spot$. Ces analyses sont décrites tout au long de cette section afin de déterminer l'origine embryonnaire du défaut $Spot$.

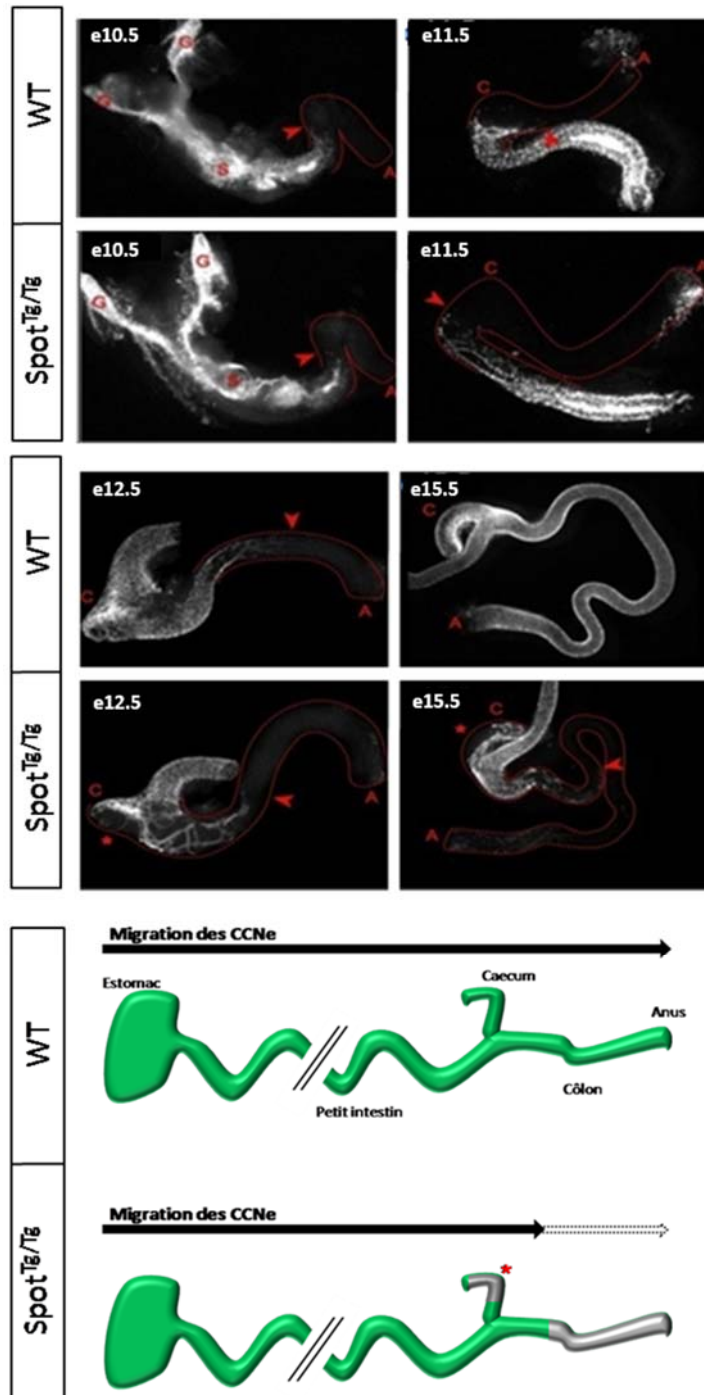


Figure 5.1 : Les intestins embryonnaires Spot montrent un retard de migration des CCNe associé à un défaut de colonisation du caecum qui ne sont jamais rattrapés dans le temps.

A : anus, C : caecum, S : estomac. Les CCN sont marquées par le transgène *Gata4*-RFP. A e12.5, il y a un retard de migration des CCNe vagues dans l'intestin Spot par rapport au contrôle. Les flèches rouges indiquent la position du front de migration. A ce retard de migration, s'ajoute un défaut de colonisation des CCNe dans le caecum (étoile rouge) des intestins Spot. Ces défauts sont perceptibles dès e11.5, de manière légère, et s'aggravent dans le temps. D'après Karl Bergeron.

5.1.2. Différenciation des CCNe au stade embryonnaire e15.5

Une différenciation gliale précoce est à l'origine du défaut de colonisation dans l'intestin Spot (Figures 5.2, 5.3)

Par immunomarquages, nous avons identifié les neurones (HuC/D), les cellules gliales (S100 β et Sox10) et les progéniteurs (Sox10) afin de déterminer si les différenciations neuronale et gliale sont la cause du défaut de colonisation de Spot. L'expérience d'immunofluorescence a été effectuée, à e15.5, dans les intestins Spot^{Tg/Tg} par rapport aux intestins contrôles de type sauvage. Les trois zones suivantes ont été évaluées : le début du petit intestin ou intestin proximal, la fin du petit intestin ou intestin distal et le début du côlon ou côlon proximal. Les résultats des quantifications des projections d'images confocales sont donnés par rapport au nombre total de CCNe, obtenu en faisant la somme des cellules Sox10+ et HuC/D+.

Les résultats révèlent une différenciation gliale précoce dans les intestins Spot par rapport aux contrôles et nous remarquons que le nombre de cellules gliales augmente au détriment du nombre de progéniteurs. Cette différence est notable dans l'intestin proximal avec 36% de cellules gliales et 13% de progéniteurs dans le contrôle contre 43% et 7% respectivement chez Spot. Puis, dans l'intestin distal, il y a 19% de cellules gliales et 36% de progéniteurs dans le contrôle contre 30% et 31% respectivement chez Spot. Enfin, dans le côlon proximal, il n'y a que 1% de cellules gliales et presque 74% de progéniteurs dans le contrôle contre 28% de cellules gliales et 40% de progéniteurs chez Spot. Ce défaut de différenciation gliale se retrouve tout le long de l'intestin et de manière plus marquée à proximité du front de migration, dans le côlon proximal.

La différenciation neuronale, quant à elle, n'apparaît pas comme impliquée dans le défaut de colonisation chez Spot puisque le nombre de neurones dans l'intestin reste comparable entre les deux groupes. Afin de confirmer la différenciation gliale prématurée et/ou d'écarter la différenciation neuronale comme la cause du défaut de colonisation des CCNe, ces analyses ont également été effectuées à des stades plus précoces, plus proches du moment où le défaut de colonisation apparaît. Les résultats sont décrits dans les sections suivantes.

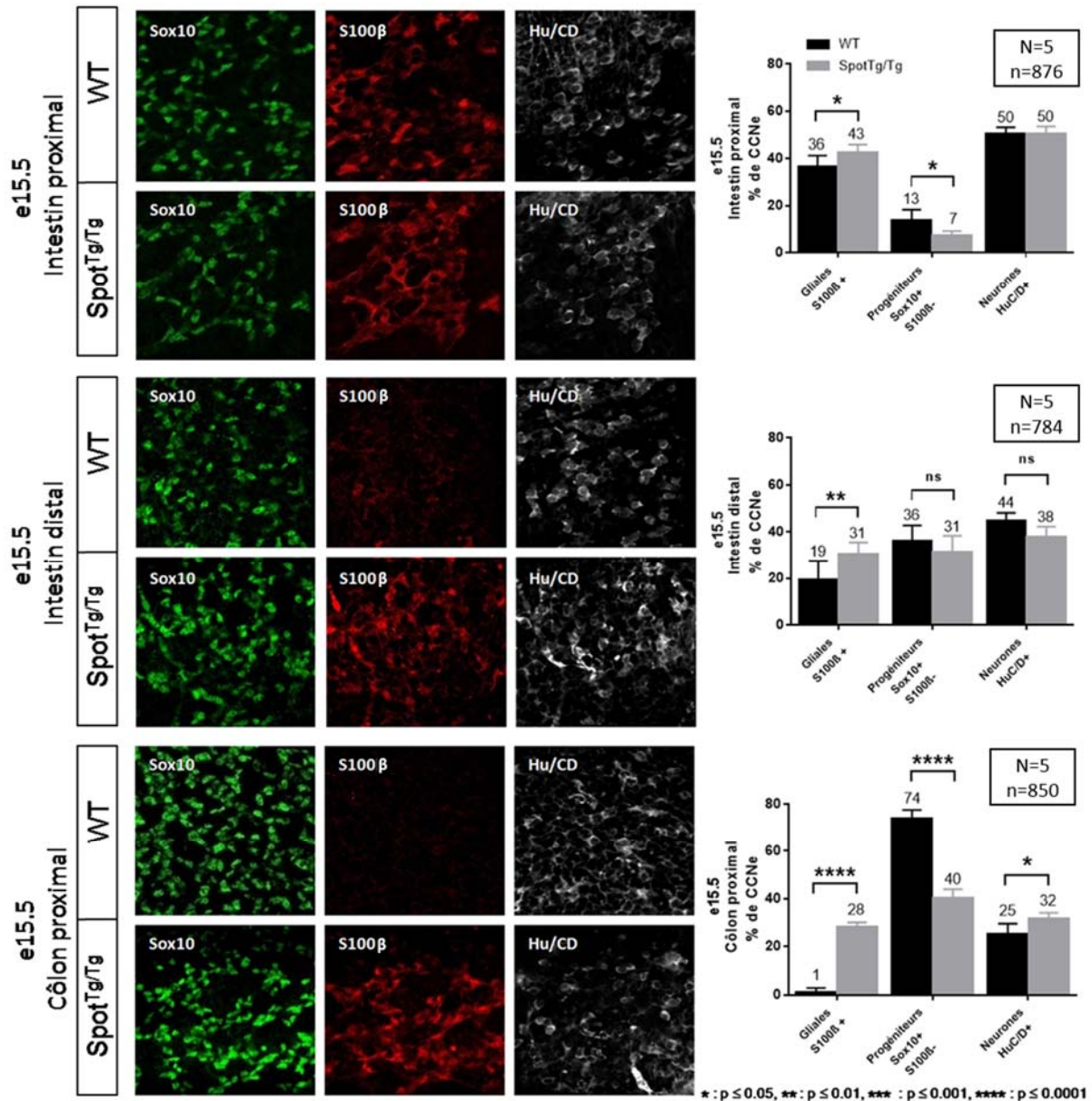


Figure 5.2 : Une différenciation gliale précoce des CCNe est à l'origine du défaut de colonisation dans l'intestin Spot. Des expériences d'immunofluorescence permettent de marquer les neurones (HuC/D), les cellules gliales (S100β et Sox10) et les progéniteurs (Sox10). Les projections d'images confocales et leur quantification, dans trois régions de l'intestin à e15.5, révèlent une différenciation gliale prématurée dans l'intestin Spot par rapport au contrôle. Les résultats de quantification sont donnés par rapport au nombre total de CCNe (Sox10+ et HuC/D+). Le nombre de cellules gliales augmente au détriment des progéniteurs et ce défaut se retrouve tout le long de l'intestin mais de manière plus marquée à proximité du front de migration (côlon proximal). Le nombre de neurones reste plutôt stable.

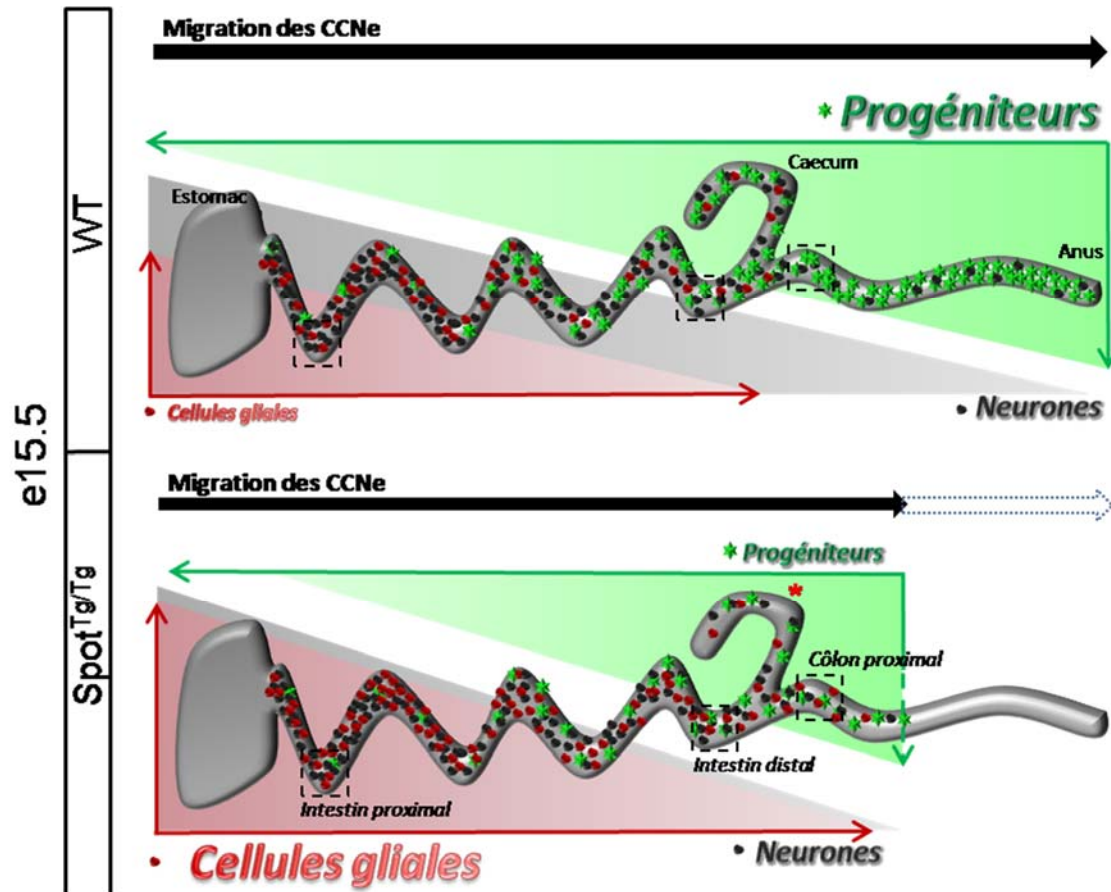


Figure 5.3 : Une différenciation gliale précoce des CCNe est à l'origine du défaut de colonisation dans l'intestin Spot (schéma à e15.5). Les cellules sont représentées par des sphères et étoiles : les étoiles vertes pour les cellules non différenciées, les sphères noires pour les neurones et les sphères rouges pour les cellules gliales. Une schématisation de la migration des CCNe, à e15.5, dans l'intestin Spot par rapport au contrôle, indique les trois régions où la différenciation a été évaluée : intestin proximal, intestin distal et côlon proximal. Les intestins Spot montrent une différenciation gliale précoce le long de l'intestin au détriment des progéniteurs. On retrouve dans les intestins Spot le retard de migration des

5.1.3. Différenciation des CCNe au stade embryonnaire e13.5

Le défaut de différenciation gliale prématurée chez Spot est confirmé à un stade précoce (Figure 5.4)

De la même manière que précédemment, nous avons fait des immunomarquages afin de d'évaluer la différenciation dans les intestins Spot par rapport aux intestins contrôles de type sauvage, au stade plus précoce e13.5. Les résultats des quantifications d'images confocales sont donnés par rapport au nombre total de CCNe. Il est important de garder en mémoire que, dans un contexte normal, le marqueur glial S100 β ne commence à s'exprimer qu'à partir du stade embryonnaire e14.5 dans l'intestin (Young, Bergner et Müller, 2003). Ceci se vérifie dans nos résultats, à e13.5, avec seulement 1% de cellules gliales marquées S100 β dans l'intestin proximal et aucun marquage dans le reste de l'intestin chez le contrôle. En revanche, la différenciation gliale précoce chez Spot se confirme puisque 39% des CCNe sont marquées par S100 β dans l'intestin proximal et des cellules marquées par S100 β se retrouvent jusqu'à environ la moitié du petit intestin. De même qu'à e15.5, le marquage HuC/D reste similaire et le nombre de neurones ne varie pas de manière significative entre les deux groupes à e13.5.

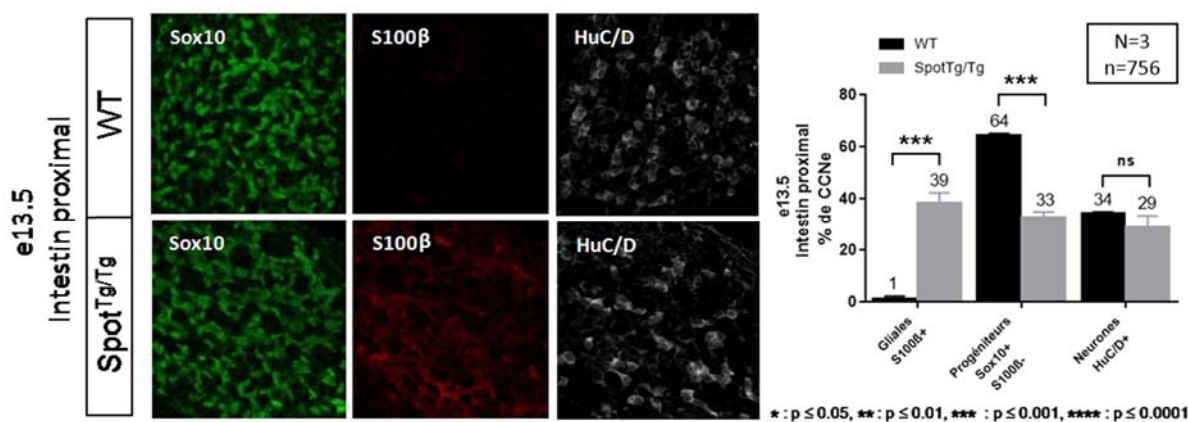


Figure 5.4 : Le défaut de différenciation gliale précoce chez Spot est confirmé à e13.5. Des immunomarquages identifient les neurones (HuC/D), les cellules gliales (S100 β et Sox10) et les progéniteurs (Sox10). A e13.5, alors que le marqueur glial S100 β n'est pas encore exprimé si tôt dans les intestins contrôles de type sauvage, les intestins Spot révèlent une présence importante de cellules gliales avec l'expression de S100 β , dans l'intestin proximal. Le nombre de neurones ne varie pas de manière significative.

5.1.4. Expression des marqueurs gliaux dans les CCNe au stade embryonnaire e12.5

Les marqueurs gliaux sont surexprimés chez Spot (Tableau V.I)

Au stade embryonnaire e12.5, aucun immunomarquage des cellules gliales avec S100 β n'a été fait. Cependant, de manière intéressante, les résultats de séquençage du transcriptome des CCNe à ce stade nous permettent d'apprécier les niveaux d'expression de différents gènes chez Spot et chez le contrôle (*Gata4*-RFP).

Ainsi, nous avons remarqué que plusieurs gènes connus pour être des marqueurs gliaux (Young, Bergner et Müller, 2003; Sasselli, Pachnis et Burns, 2012) sont surexprimés dans les CCNe de Spot par rapport aux CCNe contrôles. Ces informations sont données dans le **tableau V.I**. Par exemple, le marqueur glial S100 β que nous avons utilisé dans les expériences d'immunofluorescence précédentes, se retrouve également surexprimé à e12.5 environ 6,25 fois chez Spot par rapport au contrôle. D'autres marqueurs gliaux, tels que B-Fabp, Sox10 et Gfap, sont eux aussi surexprimés chez Spot.

Ces informations, associées aux résultats de différenciation gliale des expériences d'immunofluorescence (**Figures 5.2, 5.3, 5.4**), nous laissent penser qu'une différenciation prématurée des CCNe progénitrices en cellules gliales pourrait être la cause du défaut de colonisation dans l'intestin embryonnaire Spot.

Tableau V.I : D'après le séquençage du transcriptome, les différents marqueurs gliaux connus sont surexprimés chez Spot à e12.5.

Marqueurs gliaux connus	Fold change : Spot ^{Tg/Tg} par rapport à G4-RFP
<i>S100β</i>	(+) 6.25
<i>B-FABP</i>	(+) 3.15
<i>Sox10</i>	(+) 1.85
<i>Gfap</i>	(+) 1.30

(+) : régulation à la hausse

5.1.5. Différenciation neuronale des CCNe au stade embryonnaire e12.5

La différenciation neuronale n'est pas responsable du défaut de migration des CCNe dans l'intestin embryonnaire Spot (Figure 5.5)

Cette fois, nous avons identifié par immunomarquages uniquement les neurones et les progéniteurs afin de déterminer la différenciation neuronale, dans les intestins Spot par rapport aux intestins contrôles de type sauvage, au stade embryonnaire e12.5. Les résultats des quantifications des projections d'images confocales sont donnés par rapport au nombre total de CCNe. Ainsi, nous cherchons à savoir si un défaut de différenciation neuronale pourrait être ajouté au défaut de différenciation gliale précoce pour causer un problème de formation du SNE dans les intestins Spot.

Au stade e12.5, les CCNe ont normalement colonisé le côlon proximal chez les embryons de type sauvage mais le front de migration, tout juste dans la région post-caecum, n'atteint pas cette zone dans les intestins d'embryons Spot : le côlon proximal des embryons Spot est dépourvu de CCNe. C'est pourquoi seules les deux régions dans le petit intestin ont pu être évaluées, quantifiées et comparées : intestin proximal et intestin distal.

De même qu'à e15.5 et e13.5, le marquage neuronal HuC/D est comparable dans les intestins d'embryons Spot et ceux de type sauvage et les résultats des quantifications ne montrent aucune différence significative entre les deux groupes à e12.5. La différenciation neuronale n'est pas défectueuse chez Spot et n'apparaît donc pas comme la cause du défaut de colonisation dans les intestins Spot.

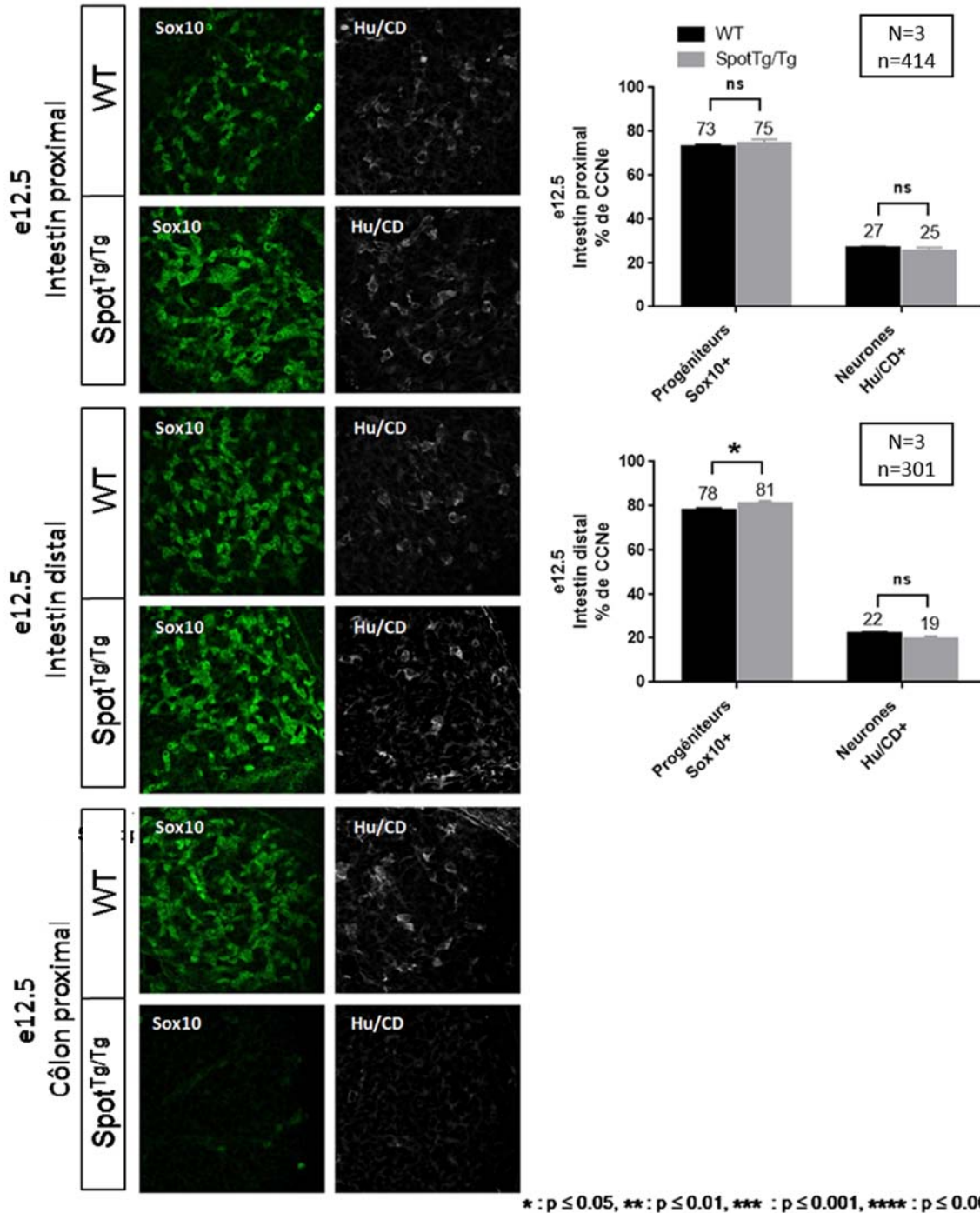


Figure 5.5 : La différenciation neuronale n'est pas responsable du défaut de migration des CCNe dans l'intestin embryonnaire Spot. Des expériences d'immunofluorescence permettent de marquer les neurones (Hu/CD), les cellules gliales (Sox10) et les progéniteurs (Sox10). Les projections d'images confocales et leur quantification, dans deux régions de l'intestin à e12.5, ne montrent aucune différence significative quant au nombre de neurones différenciés. Les résultats de quantification sont donnés par rapport au nombre total de CCNe. Chez Spot, le front de migration s'arrête dans le caecum à e12.5 et le côlon proximal est donc dépourvu de CCNe.

5.1.6. Prolifération des CCNe au stade embryonnaire e12.5

Les CCNe prolifèrent moins dans l'intestin embryonnaire Spot (Figure 5.6)

Par immunofluorescence, le marqueur de prolifération Ki67 nous a permis de marquer les cellules en prolifération dans les intestins embryonnaires Spot par rapport aux contrôles de type sauvage, au stade embryonnaire e12.5. Deux régions dans le petit intestin, une région proximale et une région plus distale, ont été évaluées et quantifiées. Les résultats des quantifications sont donnés par rapport au nombre de cellules Sox10+ et la moyenne des deux régions ci-dessus est indiquée. A ce stade, dans des conditions normales, les cellules Sox10+ sont pour la plupart des cellules progénitrices en pleine prolifération (Sasselli, Pachnis et Burns, 2012).

En moyenne, 96% des CCNe des intestins embryonnaires contrôles sont en prolifération contre 89% dans les intestins embryonnaires Spot. Cette différence est très significative avec une *p-value* de $p=0.0008739$, d'après le test de Student. En effet, les cellules progénitrices, une fois différenciées, arrêtent de proliférer. Dans les intestins Spot, une différenciation gliale prématurée explique une baisse de prolifération des progéniteurs.

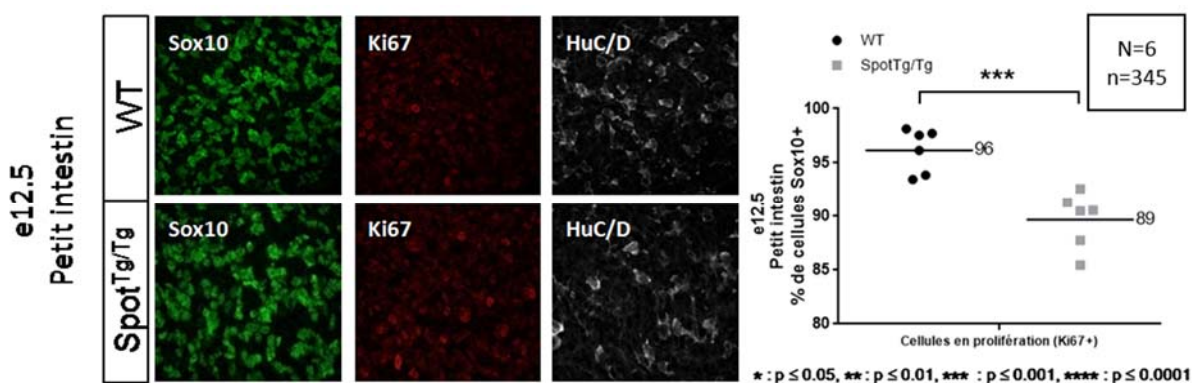


Figure 5.6 : Les CCNe prolifèrent moins dans l'intestin embryonnaire Spot. A e12.5, le marqueur de prolifération Ki67 indique une diminution significative des cellules en prolifération dans le petit intestin des embryons Spot par rapport aux intestins contrôles de type sauvage.

5.1.7. Mort/survie des CCNe au stade embryonnaire e12.5

La mort cellulaire ne semble pas être inhabituelle dans l'intestin embryonnaire Spot (Figure 5.7)

L'essai TUNEL (« Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End labelling »), qui marque l'ADN en fragmentation, nous a permis d'identifier les cellules en train de mourir dans les intestins embryonnaires Spot par rapport aux intestins contrôles de type sauvage, au stade embryonnaire e12.5.

Le marqueur d'apoptose TUNEL ne montre aucune différence aberrante quant à la mort cellulaire dans les intestins embryonnaires Spot par rapport aux intestins contrôles. Les cellules en train de mourir sont pointées par des flèches rouges, à ne pas confondre avec les cellules autofluorescentes, également marquées dans d'autres canaux. Notez que les cellules en apoptose se retrouvent particulièrement à la surface des tissus qui est plus susceptible d'être abimée au moment de la dissection.

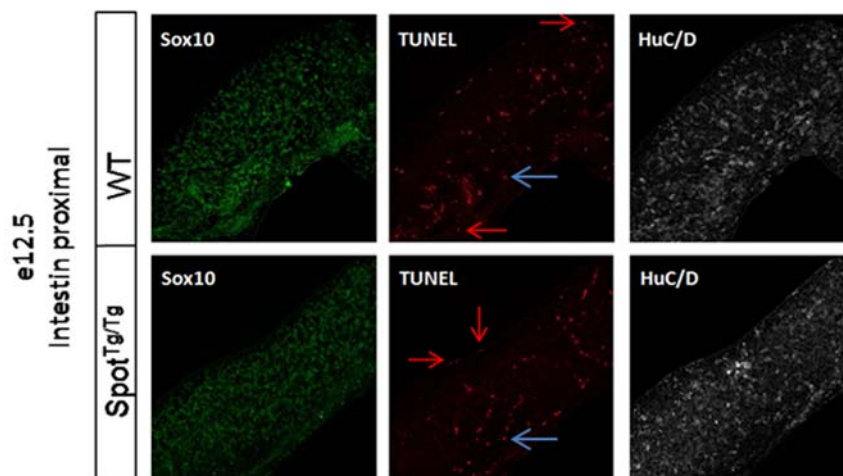


Figure 5.7 : La mort cellulaire ne semble pas être inhabituelle dans l'intestin embryonnaire Spot. Le marqueur d'apoptose TUNEL ne montre aucune différence flagrante quant à la mort cellulaire dans les intestins embryonnaires Spot^{Tg/Tg} par rapport aux contrôles de type sauvage à e12.5. Les flèches rouges pointent les cellules en apoptose qui se retrouvent particulièrement à la surface des tissus (à ne pas confondre avec les cellules autofluorescentes pointées par une flèche bleue).

5.2. Quelles sont les causes génétiques du défaut de formation du système nerveux entérique chez Spot?

5.2.1. Localisation génomique du transgène Tyrosinase chez Spot

Le transgène s'est inséré à l'intérieur du locus *Nr2f1-K12* sur le chromosome 13 (Figure 5.8)

Le séquençage du génome des souris Spot nous a permis de localiser le lieu de l'insertion du transgène *Tyrosinase* qui a eu lieu dans le locus *Nr2f1-K12* sur le chromosome 13, résultant en une courte délétion de 353 pb. Cette région est dépourvue de gènes préalablement associés à la maladie de HSCR. L'insertion s'est faite précisément à l'intérieur d'un intron du gène *A830082K12Rik*, que nous appelons *K12*, un ARNInc, antisens du gène *Nr2f1*. Pour faciliter la suite de notre étude, nous avons ordonné les transcrits de *K12* en deux catégories selon leur épissage: les formes dites courtes qui s'arrêtent à l'exon 3 et ne sont pas touchées par l'insertion transgénique tandis que les formes dites longues qui contiennent l'exon 4 et sont interrompues par l'insertion transgénique. Une analyse poussée de *K12* et ses différentes isoformes est menée dans les sections suivantes mais nous pouvons déjà remarquer que le premier exon de *K12* est alternatif et peut partager des séquences avec le gène *Nr2f1*. Notez également la présence sur le locus d'un élément hautement conservé au cours de l'évolution et dont l'activité régulatrice est évaluée dans une section suivante.

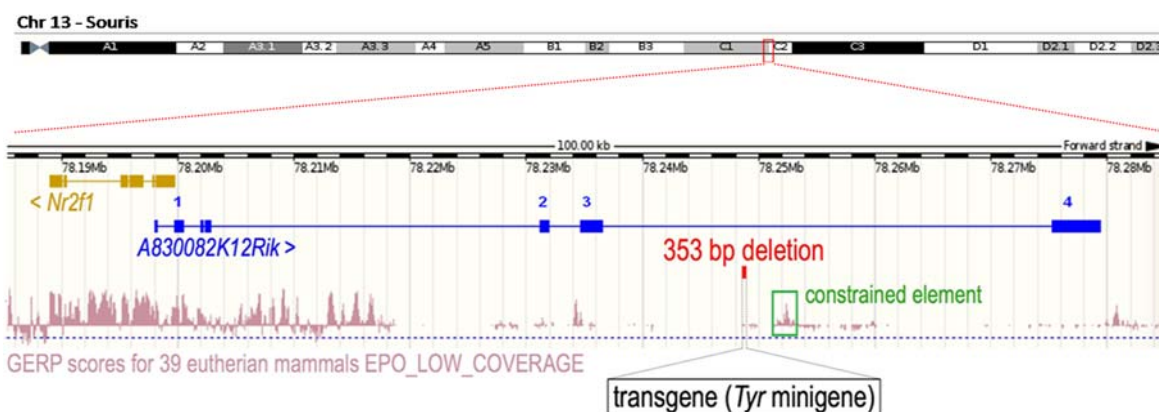


Figure 5.8 : Le transgène s'est inséré à l'intérieur du locus *Nr2f1-K12* sur le chromosome 13 chez Spot. L'insertion a eu lieu précisément à l'intérieur d'un intron du gène *K12*, ARNInc, antisens du gène *Nr2f1*, résultant en une courte délétion de 353 pb et perturbant ainsi l'organisation du locus contenant un élément très conservé.

5.2.2. Dérégulation de certains gènes importants dans les CCNe des embryons Spot

Nr2f1 et les formes courtes de *K12* sont surexprimés chez Spot tandis que les gènes préalablement associés à la maladie de HRSC restent plutôt stables.

- Les gènes candidats, *Nr2f1* et les formes courtes de *K12*, sont surexprimés chez Spot (Tableau V.II et figure 5.9)

Le séquençage du transcriptome des CCNe de Spot (e12.5) nous révèle des informations intéressantes quant à l'expression des gènes candidats appartenant au locus *Nr2f1-K12* (Tableau V.II). *Nr2f1* et les formes courtes de *K12* sont surexprimés chez Spot par rapport au contrôle (*Gata4*-RFP) : plus de 13 fois et plus de 4 fois respectivement. Au contraire, les formes longues de *K12* sont interrompues et inexistantes chez Spot. Ces résultats sont significatifs.

Les résultats de séquençage du transcriptome ont été confirmés par RT-PCR, nous permettant d'analyser facilement les niveaux d'expression du gène cible de manière semi-quantitative (Figure 5.9). Les expériences de RT-PCR ont été effectuées à deux stades différents : e12.5 et e13.5, à partir de CCNe triées par FACS. Nous pouvons observer la dérégulation des gènes candidats chez Spot par rapport au contrôle, aux deux stades étudiés. *Nr2f1* et les formes courtes de *K12* sont surexprimés chez Spot et, de manière intéressante, certaines isoformes courts de *K12* apparaissent clairement à e13.5 et semblent être spécifiques à Spot. C'est le cas notamment de l'isoforme *K12-F6R4** de 2450pb. Ces différentes isoformes sont analysées plus en profondeur dans une prochaine section qui porte sur le profil d'expression du gène *K12*.

Tableau V.II : D'après le séquençage du transcriptome, le gène *Nr2f1* et les formes courtes de *K12* sont surexprimés chez Spot, tandis que les formes longues de *K12* sont perdues.

Gènes candidats	Expression CCNe G4-RFP (compte moyen brut)	Expression CCNe Spot ^{Tg/Tg} (compte moyen brut)	Fold change : Spot par rapport à G4-RFP
<i>Nr2f1</i>	2.29	31.74	(+) 13.89
<i>K12 (courts)</i>	1.00	4.76	(+) 4.76
<i>K12 (longs)</i>	0.45	0.003	(-) 139.00

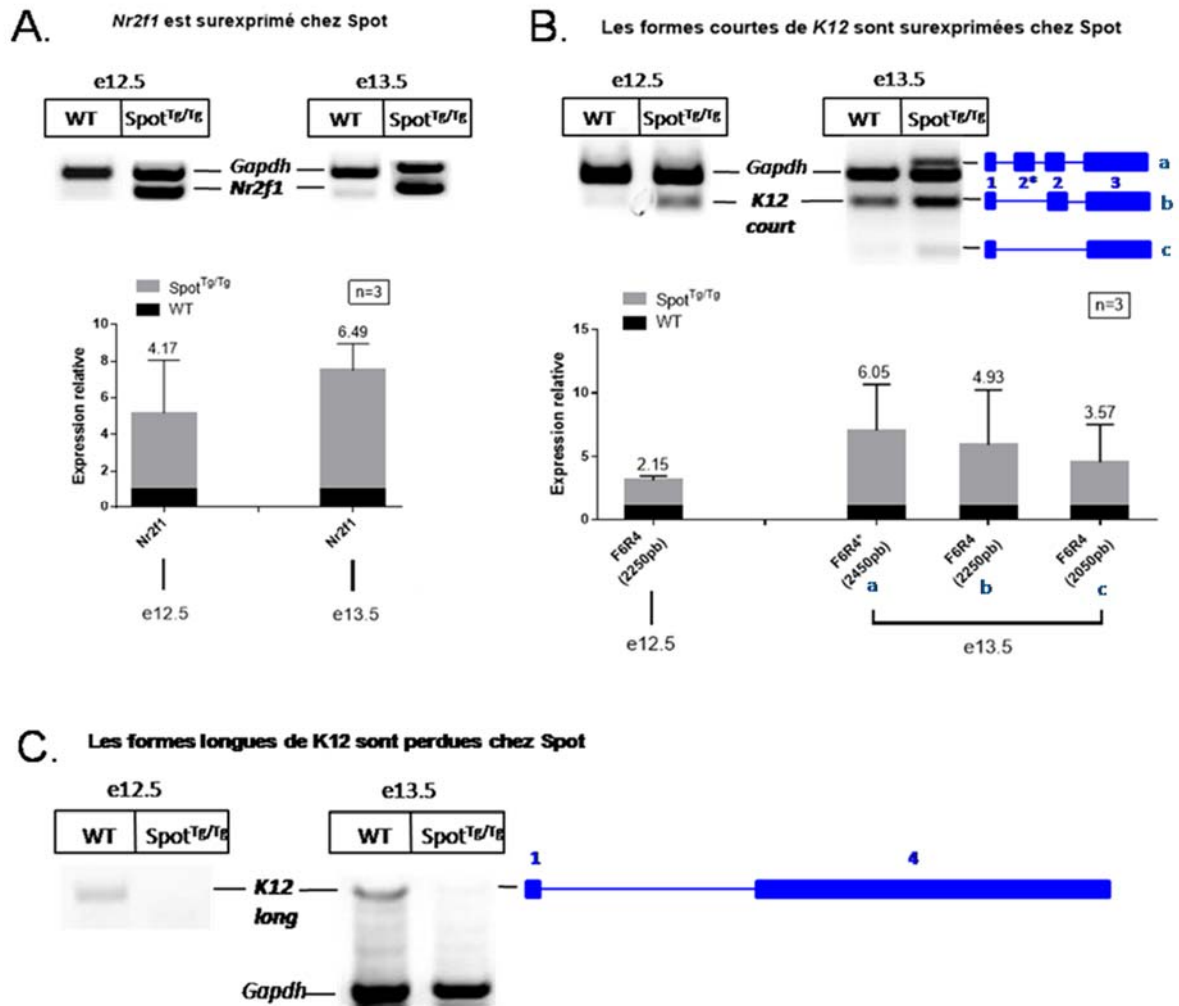


Figure 5.9 : Le gène *Nr2f1* et les formes courtes de *K12* sont surexprimés chez Spot. Des expériences de RT-PCR ont été effectuées à partir de CCNe triées par FACS, aux stades embryonnaires e12.5 et e13.5. Les résultats semi-quantitatifs confirment la dérégulation des gènes candidats chez Spot : il y a une surpression de *Nr2f1* (A) et des formes courtes de *K12* (B) ainsi qu'une absence des formes longues de *K12* (C) chez Spot. De manière intéressante, certaines isoformes courtes de *K12* (B) apparaissent à e13.5 et se révèlent être spécifiques aux CCNe de Spot. C'est le cas notamment de l'isoforme F6R4* de 2450pb (a).

- **Les principaux gènes déjà associés à la maladie de HRSC restent plutôt stables (Tableau V.III)**

Le séquençage du transcriptome des CCNe de Spot (e12.5) nous permet également d'apprécier les niveaux d'expression de gènes déjà connus et associés à la maladie de HRSC. A l'image de *Ret* et de *Gdnf*, aucune différence aberrante n'apparaît chez Spot par rapport au contrôle (*Gata4*-RFP).

Dans le **tableau V.III**, se trouve une liste non exhaustive de gènes préalablement associés à la maladie. Parmi ceux-ci, le gène *Sox10* est celui qui est le plus dérégulé chez Spot : il est surexprimé 1.85 fois. Rappelons que *Sox10*, comme c'est le cas pour *Ret*, est exprimé par les CCNe progénitrices non différenciées (Barlow et al., 2003). Toutefois, *Sox10* continue à être exprimé par les CCNe une fois qu'elles sont différenciées en cellules gliales et c'est pourquoi il appartient également à la catégorie des marqueurs gliaux (Rothman et al., 1986).

Ces analyses sont consistantes avec une surexpression des marqueurs gliaux et une différenciation gliale précoce chez Spot.

Tableau V.III : D'après le séquençage du transcriptome, les principaux gènes déjà associés à la maladie de HRSC restent plutôt stables.

Gènes connus HRSC	Fold change : Spot par rapport à G4-RFP
<i>Nrtn</i>	(+) 0.71
<i>Edn3</i>	(+) 0.80
<i>Ret</i>	(+) 0.81
<i>Gdnf</i>	(+) 0.95
<i>Ece1</i>	(+) 1.27
<i>Ednrb</i>	(+) 1.51
<i>Sox10</i>	(+) 1.85

5.2.3. Activité transcriptionnelle de l'élément conservé sur le locus *Nr2f1-K12*

L'insertion transgénique a perturbé l'organisation d'un élément conservé dans l'évolution qui possède une forte activité répressive (Figure 5.10)

L'insertion du transgène *tyrosinase* chez Spot associée à la délétion de 353 pb, a perturbé toute l'organisation du locus *Nr2f1-K12*. Une analyse de conservation de séquences a été effectuée sur tout le locus et nous retrouvons une région hautement conservée entre les différentes espèces, située à environ 2 kb après le site d'insertion du transgène, dans un intron de *K12*. Quand le transgène s'est intégré dans le génome de Spot, il a perturbé toute l'organisation du locus et notamment celle de l'élément conservé.

Pour évaluer le potentiel régulateur de cette petite séquence de 676 pb, que nous avons appelée élément conservé 2.5 (EC2.5), celle-ci a été amplifiée par PCR puis clonée dans un vecteur, en amont du gène rapporteur de la luciférase. En plus, ce vecteur contient un promoteur minimal *thymidine kinase* (pTK109) qui lui confère une activité transcriptionnelle de base. Après transfection de cette construction dans des cellules Neuro-2a, les essais luciférase nous ont permis d'évaluer l'activité transcriptionnelle de cette construction comparée à celle de pTK109 seul. Les résultats ont révélé une forte activité répressive de l'élément conservé, et ceci de manière plus importante dans les P19 que dans les Neuro-2a. Dans les Neuro-2a, en présence de l'EC2.5, l'activité transcriptionnelle de la luciférase est au moins deux fois moins élevée qu'en absence de l'EC2.5. Dans les P19, l'activité transcriptionnelle de la luciférase est environ dix fois moins importante lorsque l'EC2.5 est présent.

Finalement, ces résultats nous permettent de déduire que le transgène, en s'insérant dans le locus *Nr2f1-K12*, a perturbé un élément régulateur qui réprimait l'expression de ses gènes voisins, notamment *Nr2f1* et *K12-court*.

Ces deux gènes candidats étant largement surexprimés chez Spot, lequel est responsable du phénotype chez Spot?

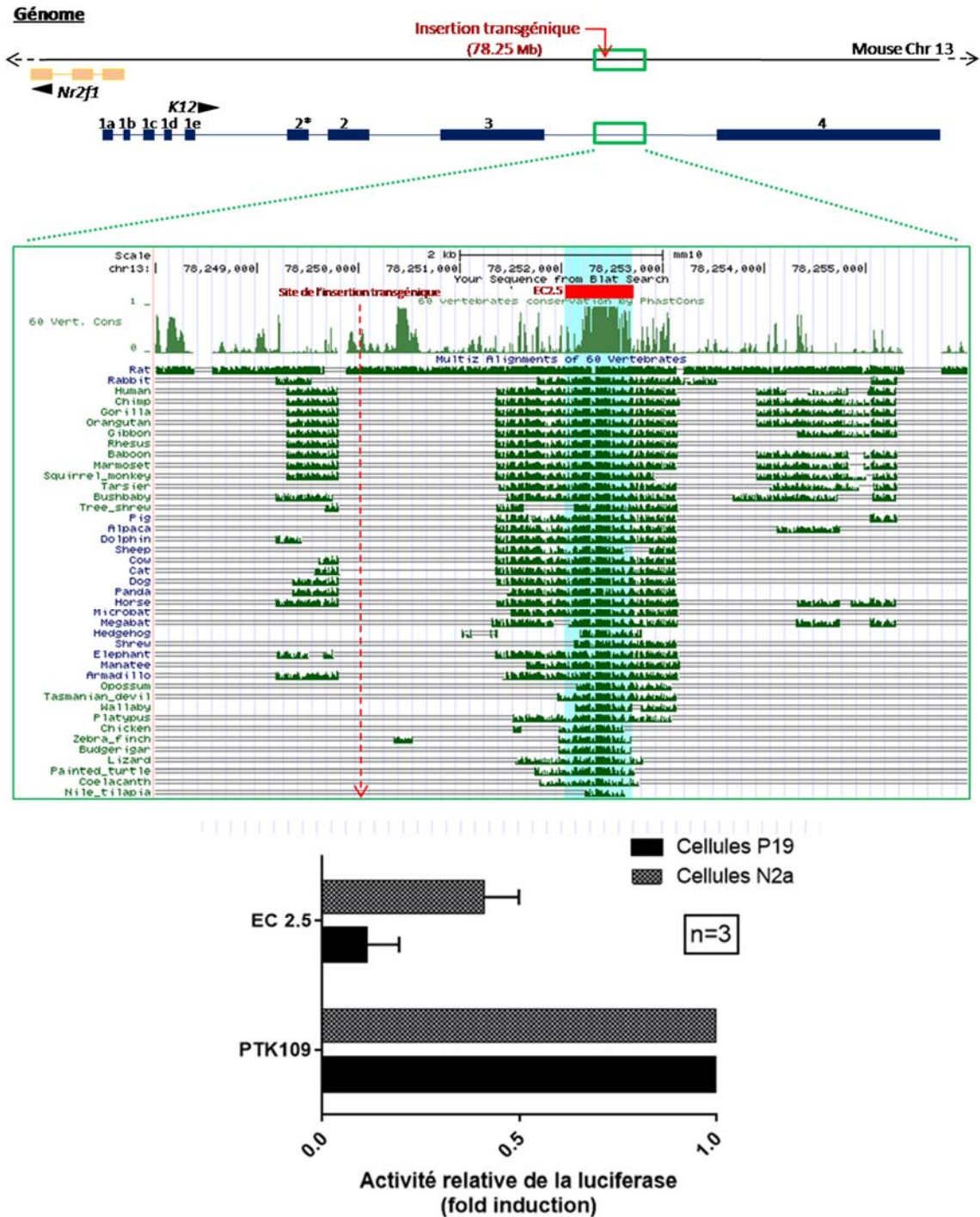


Figure 5.10 : L'insertion transgénique dans le locus *Nr2f1-K12* a perturbé un élément conservé dans l'évolution qui possède une forte activité répressive. Le locus *Nr2f1-K12* comporte un élément hautement conservé entre les espèces (EC2.5), ayant été perturbé par l'insertion transgénique. Les essais luciférase révèlent que l'EC2.5 possède une activité répressive forte et ce, de manière plus importante dans les cellules P19 que Neuro-2a.

5.2.4. La surexpression des gènes candidats dans des modèles murins permet-elle de retrouver le phénotype des souris Spot?

Dans cette section, nous avons pu pointer le doigt sur deux gènes potentiellement responsables du phénotype Spot, et notamment d'une différenciation gliale précoce qui cause un défaut de formation du SNE : *Nr2f1* et l'ARNInc, *K12*. Plusieurs hypothèses se dégagent. Dans un premier cas, *Nr2f1* est le seul gène responsable du phénotype. Dans un deuxième cas, c'est *K12* qui est le seul gène responsable du phénotype. En revanche, dans un troisième cas, il se peut que les deux gènes soient ensemble responsables du phénotype. Enfin, si l'un, l'autre ou les deux gènes sont bien impliqués dans le phénotype, il est probable qu'il(s) n'agisse(nt) pas seul(s).

Afin de répondre à ces questions, nous avons entrepris la génération de souris transgéniques dans lesquelles *Nr2f1* ou *K12-court* ont été surexprimés dans les CCN. Pour commencer, nous souhaitons savoir si la surexpression de l'un ou l'autre suffisait à récapituler le phénotype. Pour se faire, nous avons fait des constructions permettant l'expression de chaque gène candidat sous le contrôle du promoteur minimal Hsp68 (Kothary et al., 1989) et de l'enhancer de Sox10 spécifique aux CCN (U3 ou MCS4) (Antonellis et al., 2008; Werner et al., 2007). Les deux expériences ont été menées en parallèle. La présence de la GFP est essentielle afin de faciliter le criblage des transgéniques. Dans la première expérience, *Nr2f1* est co-exprimé avec la protéine GFP grâce à la présence d'une séquence IRES. Dans le deuxième cas, la protéine IRES-eGFP est également exprimée sous le contrôle de Sox10.U3-Hsp68 mais dans un deuxième plasmide qui est coinjecté, afin de ne pas altérer l'expression de l'ARNInc.

- **Surexpression de *Nr2f1* (Figure 5.11)**

Avant de procéder à la microinjection, nous avons vérifié la construction Sox10.U3-Hsp68-*Nr2f1*-IRES-eGFP (pNP455) (Figure 5.11 A). Trois niveaux de vérifications ont été effectués. La construction a été séquencée puis transfectée dans des cellules Neuro-2a et nous avons pu observer à la fois l'expression de la GFP par fluorescence (Figure 5.11 B) et l'expression de la protéine *Nr2f1* (45kDa) par immunobuvardage, à l'aide d'un anticorps contre *Nr2f1* (Figure

5.11 C).

- **Surexpression de *K12-court* (Figure 5.12)**

Pour vérifier la construction Sox10.U3-Hsp68-K12(F6R4*) (pNP454) (Figure 5.12 A), nous l'avons faite séquencer puis nous l'avons transfecté dans des cellules Neuro-2a et avons pu valider la transcription de l'isoforme de *K12-court* F6R4* par RT-PCR (Figure 5.12 B). En effet, rappelons que cette isoforme est spécifique aux CCNe de Spot. Elle ne s'exprime pas dans les cellules Neuro-2a (Figure 5.12 B)

Une fois que la construction des plasmides a été validée, la génération des embryons a été effectuée par la plateforme de microinjection en devenir de l'UQAM, selon la technique classique de microinjection d'ADN dans le pronoyau (Nagy, Gertsenstein, Vintersten, & Behringer, 2003) (voir le **chapitre 4 – Matériel et méthodes**). Les embryons réimplantés ont été collectés 15 jours suivant la microinjection – soit e15.5 – et criblés pour la GFP.

Pour l'expérience de surexpression de *Nr2f1*, trente-trois embryons ont été collectés et criblés. Pour l'expérience de surexpression de *K12-court*, vingt-huit embryons ont été obtenus et criblés. Malheureusement, le criblage minutieux de chacun des embryons entiers que nous avons obtenus ne nous a pas permis de repérer un patron de fluorescence des CCN. De plus, le génotypage de ces embryons n'a pas non plus indiqué la présence de transgéniques.

Le taux d'insertion d'un transgène étant extrêmement bas (souvent inférieur à 1%) (Jindal & Sharma, 2010) – et largement dépendant de la construction microinjectée – nous n'avons pas récupéré un nombre suffisant d'embryons à e15.5 pour pouvoir confirmer nos hypothèses de départ – au sujet des deux gènes candidats et leur implication dans le phénotype Spot.

Bien que de nombreux résultats suggèrent fortement l'implication du gène *Nr2f1*, et possiblement son antisens *K12*, dans le phénotype de mégacôlon aganglionnaire chez Spot, il serait essentiel de pouvoir le valider et la génération d'autres embryons transgéniques est en cours dans notre laboratoire.

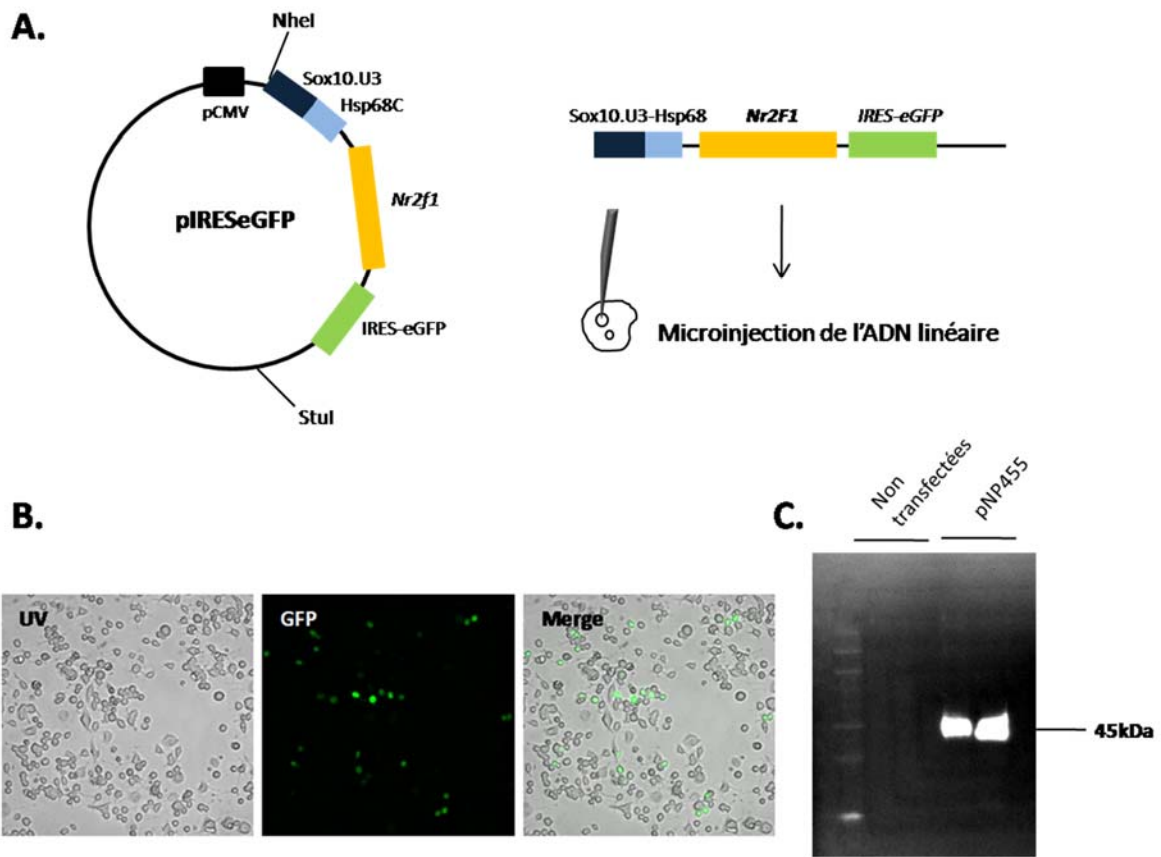


Figure 5.11 : La construction Sox10.U3-Hsp68-Nr2f1-IRES-eGFP est validée. A. Le plasmide à microinjecter permet la coexpression de la protéine Nr2f1 et de la GFP, sous le contrôle de l'enhancer Sox10-U3 et du promoteur minimal *Hsp68* afin de restreindre leur expression dans les CCN. B. La construction a été transfectée dans des cellules Neuro-2a pour vérifier la fluorescence GFP. C. Après transfection du plasmide dans des Neuro-2a, un immunobuvardage a permis de valider l'expression de la protéine Nr2f1 (45 kDa), validant ainsi la construction.

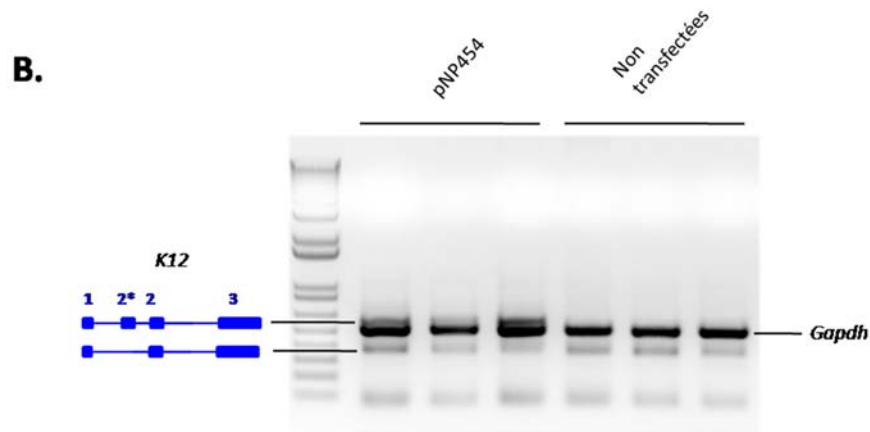
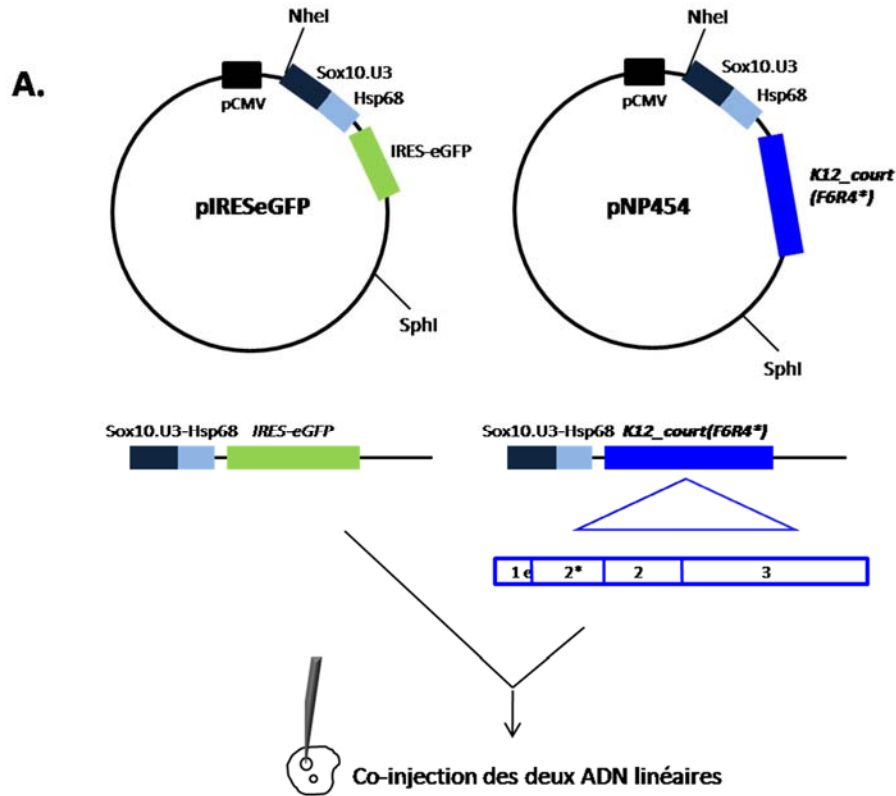


Figure 5.12 : La construction Sox10.U3-Hsp68-K12(F6R4*) est validée. A. Deux plasmides sont à microinjecter ensemble. Le premier permet l'expression de la GFP sous le contrôle de l'enhancer Sox10.U3 et du promoteur minimal *Hsp68*. Le deuxième permet l'expression de *K12-court (F6R4*)* sous le contrôle Sox10.U3-Hsp68. B. Une RT-PCR pour *K12-court* nous a permis de valider l'expression de l'isoforme F6R4*, qui s'exprime uniquement dans les cellules Neuro-2a qui ont été transfectées par le plasmide Sox10.U3-Hsp68-K12(F6R4*). Dans les cellules non transfectées, seule la forme classique de *K12-court (F6R4)* s'exprime. Cela permet de valider la construction.

5.3. K12, un gène d'ARN long non codant régulateur impliqué dans la formation du système nerveux entérique?

5.3.1. Prédiction sur Ensembl

L'ARN long non codant *K12* est épissé en différentes isoformes (Figures 5.13, 5.14)

Une première analyse des prédictions disponibles sur Ensembl nous indique que *K12* peut être épissé de nombreuses manières différentes (isoformes). Le gène entier de *K12* est formé de 4 exons qui sont séparés par 3 introns. Le premier exon est alternatif et peut partager une partie de sa séquence avec le gène *Nr2f1*, dont il est l'antisens : il y a 6 premiers exons possibles, leur taille varie de 60 à 300 pb et c'est l'exon 1a qui partage sa séquence avec *Nr2f1*. Le deuxième exon est prédit pour faire entre 200 et 750 pb. Le troisième exon est prédit pour faire entre 60 et 1900 pb. Jusqu'à maintenant, nous avons ordonné les transcrits en deux catégories distinctes selon leur épissage : les formes courtes et les formes longues. Toutes les isoformes contenant l'exon 3 étaient regroupées dans les formes courtes tandis que toutes les isoformes contenant l'exon 4, interrompues par l'insertion transgénique, étaient regroupées dans les formes longues.

Selon les prédictions, les formes courtes peuvent être composées des exons 1, 2 et 3 tandis que les formes longues se composent uniquement des exons 1 et 4.

5.3.2. Clonage des différentes isoformes de *K12*

Dessin des oligos (Figures 4.13, 4.14)

La stratégie adoptée fut de dessiner six amorces sens (F1 à F6, **figure 5.14**), soit une pour chaque premier exon alternatif possible, ainsi que deux amorces antisens (R1 et R4, **figure 5.13**) pour amplifier les formes en pleine longueur : un oligo antisens, R1, à la fin de l'exon 4 (4080 pb) pour les formes longues et un autre oligo antisens, R4, à la fin de l'exon 3 (1900 pb) pour les formes courtes. Les séquences exactes des oligos sont données dans le **tableau IV.IV** du **chapitre 4 – Matériel et méthodes**.

Chr 13 - Souris

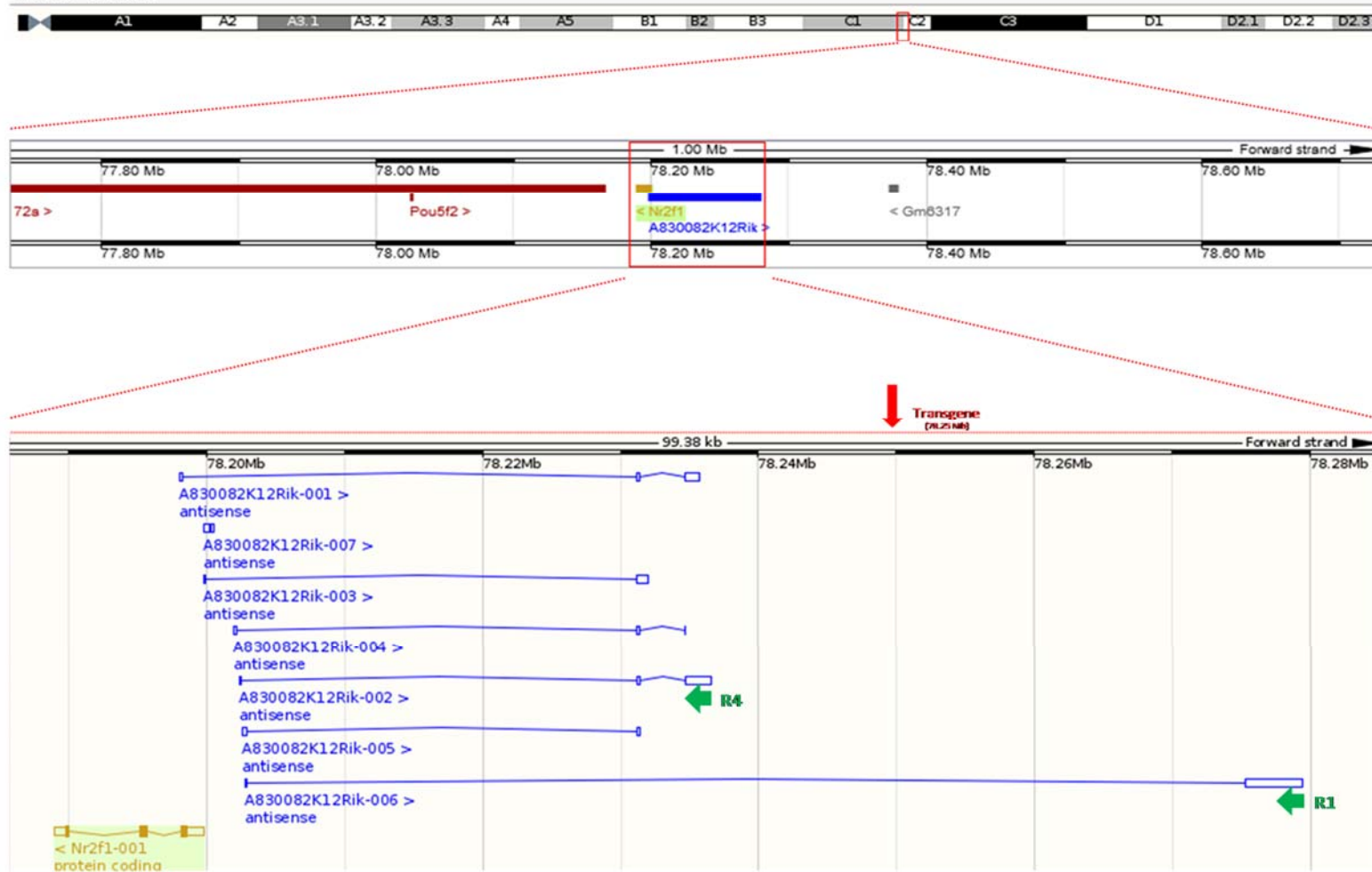


Figure 5.13 : D'après les prédictions retrouvées sur Ensembl, le gène *K12* est épissé en différentes isoformes. Les différents transcrits de *K12* sont représentés en bleu et la séquence qui code pour *Nr2f1* en jaune. *K12* est formé de 4 exons qui sont séparés par 3 introns. Le premier exon est alternatif (6) et partage une partie de sa séquence avec le gène *Nr2f1*, antisens de *K12*. On retrouve l'insertion transgénique qui a lieu à l'intérieur du dernier intron. Nous avons classé les transcrits dans deux catégories distinctes selon leur épissage : les formes courtes (exons1+2+3) et les formes longues (exons1+4), interrompues par l'insertion.

Chr 13 – Souris

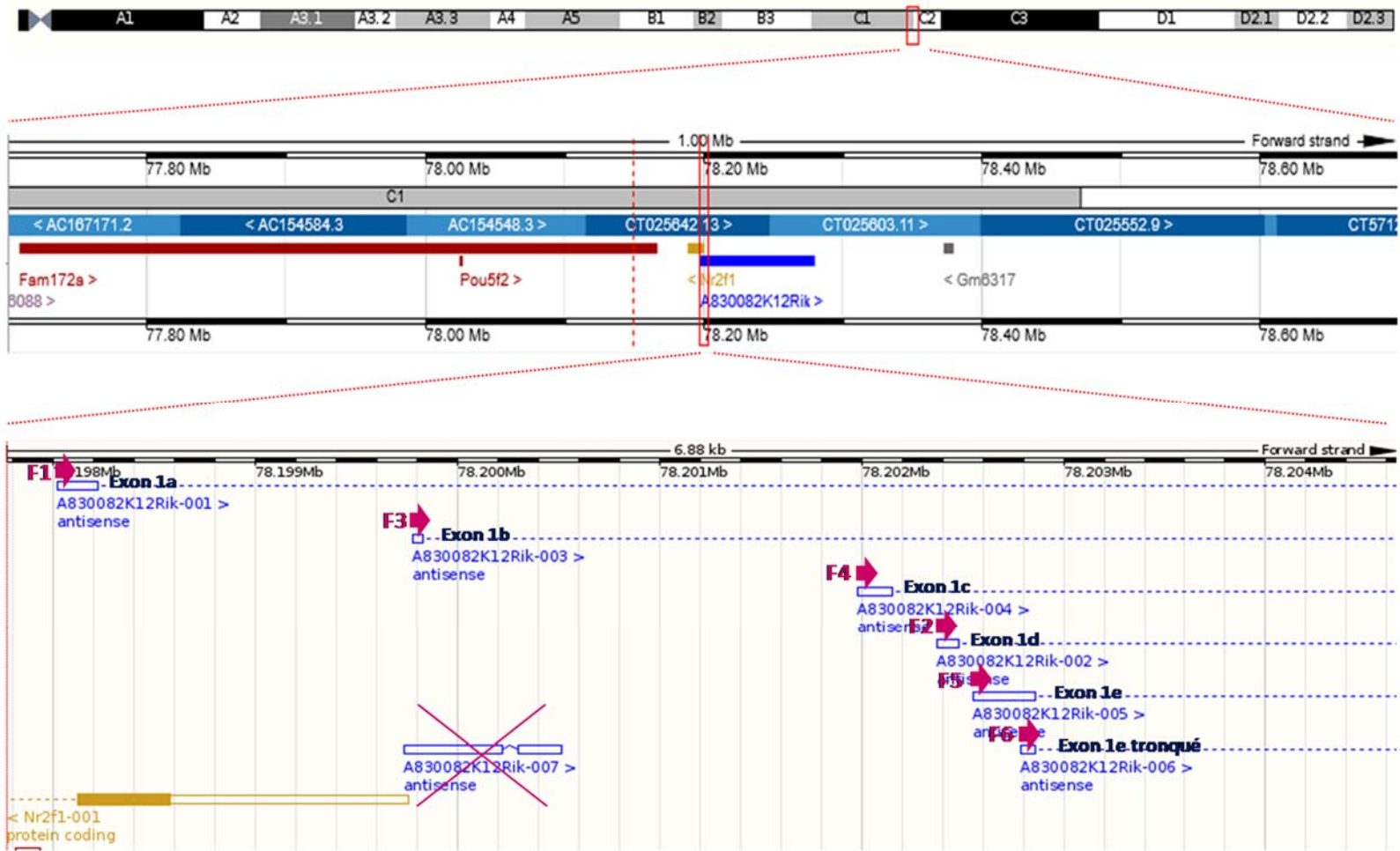


Figure 5.14 : *K12* est composé d'un premier exon alternatif, qui peut partager sa séquence avec *Nr2f1*. Selon les prédictions sur Ensembl, il y a 6 possibilités de premier exon et nous avons dessiné un oligo sens en 5' de chaque premier exon possible en vue de cloner toutes les isoformes de *K12*. C'est l'exon 1a qui partage sa séquence avec *Nr2f1*. Chaque oligo sens porte le numéro correspondant à l'annotation du transcrit sur Ensembl (par exemple : oligo F1 pour l'amorce sens correspondant au transcrit #001). La forme #007 n'a pas été étudiée.

Amplification des isoformes de *K12* pleine longueur par RT-PCR (Figures 5.15, 5.16)

Dans un premier temps, des expériences de RT-PCR à partir d'ARN d'intestin entier (e12.5) nous ont permis d'amplifier les différents transcrits de *K12* que nous avons ciblés. Nous attendions une amplification de minimum 2kb environ concernant les formes courtes (l'exon 3 faisant 1900 pb), contre 4kb environ pour les formes longues (l'exon 4 faisant 4080 pb).

Pour les formes longues (**figure 5.15**), en utilisant l'oligo antisens R1 à l'extrémité de l'exon 4, seuls les oligos sens F2, F3, F5 et F6 nous ont donné l'amplification attendue. Ensuite, seules les isoformes longues F2R1, F3R1 et F6R1 ont pu être extraites et clonées dans pGEM-T pour séquencées. Les résultats de séquençage nous confirment que l'exon 1 est systématiquement épissé avec l'exon 4, comme c'était le cas sur Ensembl.

Dans un deuxième temps, connaissant l'expression des formes longues de *K12* dans l'intestin entier, l'idée était de s'assurer de leur expression dans les CCNe puis d'éventuellement identifier quelles isoformes sont surexprimées dans les CCNe, à l'état sauvage. Trois expériences de RT-PCR ont été menées en parallèle et confrontées : RT-PCR à partir d'intestin entier, RT-PCR à partir des CCNe triées et RT-PCR à partir des cellules qui composent l'intestin en excluant les CCNe.

Ainsi, les résultats obtenus nous indiquent que les formes longues F3R1 et F5R1 sont normalement exprimées dans les cellules qui composent l'intestin (CCNe exclues) et sont nettement surexprimées dans les CCNe. La forme longue F6R1 est exprimée uniquement dans les CCNe et n'est pas exprimée dans les autres cellules qui composent l'intestin.

Pour les formes courtes (**figure 5.16**), en utilisant l'oligo antisens R4 à l'extrémité de l'exon 3, seuls les oligos sens F3, F4 et F6 nous ont donné l'amplification attendue. Les isoformes F3R4, F4R4 et F6R4 ont été extraites et clonées dans pGEM-T, puis séquencés. Après analyse des résultats de séquençage, les isoformes courtes de *K12* se sont révélées être plus compliquées que ce qui était prédit sur Ensembl.

Nous avons découvert l'existence d'un nouvel exon d'environ 200pb, situé entre l'exon 1 et l'exon 2 prédits : nous avons donc appelé ce nouvel exon, exon 2*. Ainsi, nous avons donc cloné les isoformes F3R4 et F6R4 contenant l'exon 1 correspondant, l'exon 2 et l'exon 3, mais également les isoformes F4R4* et F6R4* contenant l'exon 1 correspondant, l'exon 2*, l'exon 2 et l'exon 3.

F4R4* et F6R4 paraissent surexprimées dans les CCNe. Ce n'est pas le cas de la forme courte F3R4 bien qu'elle s'exprime normalement dans les CCNe.

Afin de faciliter la compréhension, les différentes isoformes de *K12* (longues et courtes) sont regroupées dans un schéma récapitulatif proposant une vue d'ensemble de la structure complexe du gène *K12*, avec d'une part les isoformes qui étaient prédites sur Ensembl et d'autre part les isoformes que nous avons découvert (**Figure 5.17**). Finalement, les différents isoformes amplifiées et clonées pourront servir au laboratoire dans un futur proche à construire différents outils moléculaires et investiguer au sujet de *K12*.

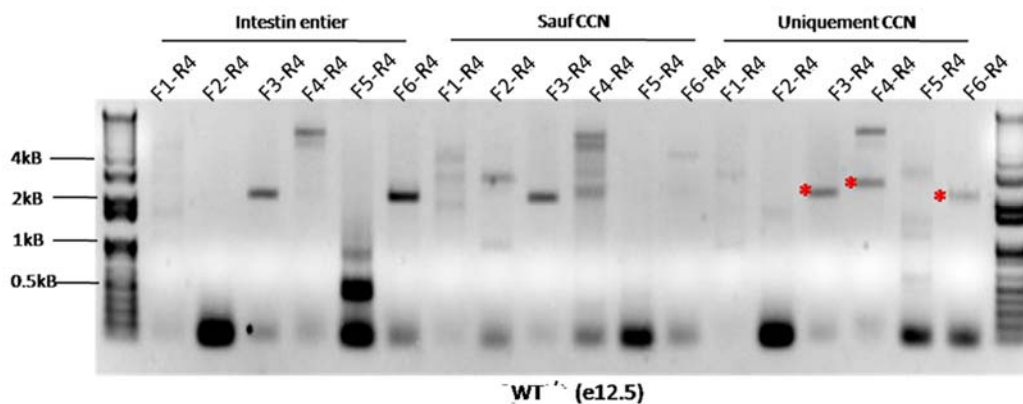
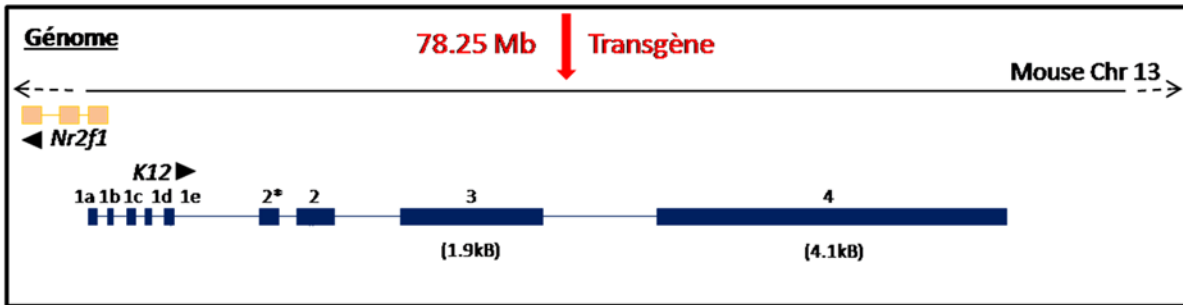
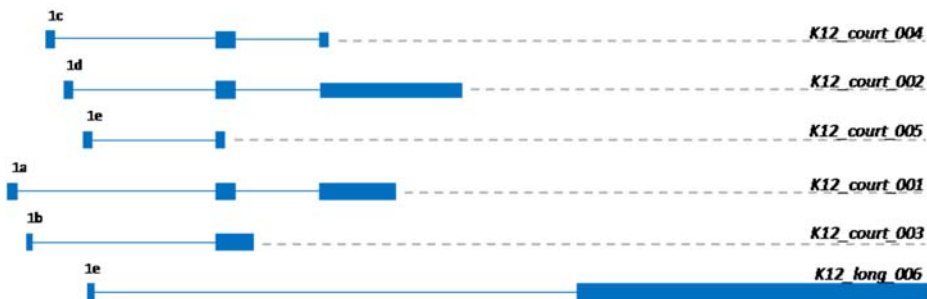


Figure 5.16 : Certaines isoformes courtes de *K12* sont surexprimées dans les CCNe. Après amplification, les isoformes F3R4, F4R4 et F6R4 (étoiles) ont été extraites, clonées dans pGEM-T et séquencées. Les résultats de séquençage indiquent que l'exon 1 est épissé avec l'exon 2 qui est épissé avec l'exon 3, tel que prédit sur Ensembl. Les résultats révèlent également l'existence d'un nouvel exon entre l'exon 1 et l'exon 2, que nous appelons exon 2*. L'exon 1 peut donc être aussi épissé avec l'exon 2* qui est épissé avec l'exon 2, qui est épissé avec l'exon 3. Les isoformes F1R4, F2R4 et F5R4 n'ont jamais pu être amplifiées. De manière intéressante, les isoformes courtes F4R4* et F6R4 semblent surexprimées dans les CCNe.



**Isoformes prédits
(par Ensembl)**



**Isoformes confirmés
(par séquençage)**

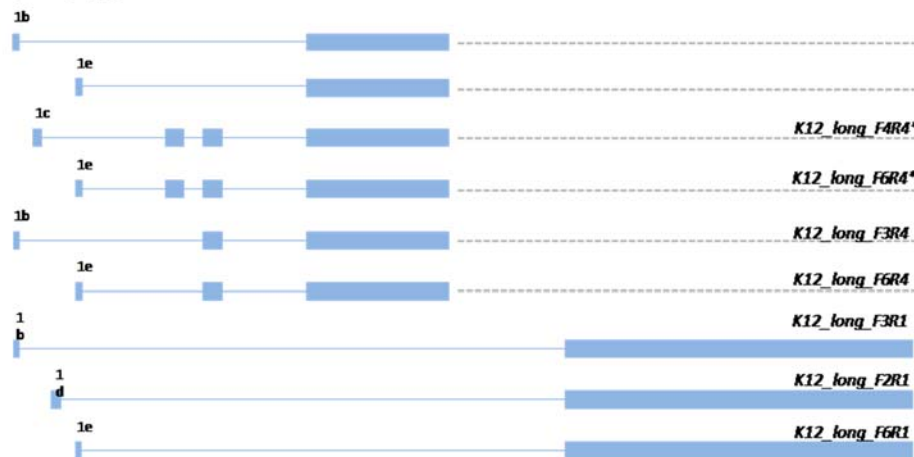


Figure 5.17 : Représentation générale du locus *Nr2f1-K12*. De nouvelles isoformes de *K12* – courtes et longues – ont été découvertes sur la base des prédictions qui étaient disponibles sur Ensembl. Au contraire, toutes les isoformes prédites n’ont jamais été amplifiées par RT-PCR. Nous n’excluons pas le fait qu’il puisse exister encore de nouvelles isoformes.

5.3.3. Localisation subcellulaire de *K12*

***K12* est colocalisé avec l'euchromatine dans des régions transcriptionnellement actives du noyau (Figures 5.18, 5.19)**

Cette section a pour but d'en apprendre plus au sujet de l'ARNInc, *K12*. Nous savons que de nombreux ARNInc sont capables de réguler la transcription de gènes voisins, notre hypothèse réside donc dans le fait que *K12* régule *Nr2f1*, dont il est antisens. Dans ce but, nous voulions connaître la localisation de *K12* dans la cellule afin de confirmer son potentiel régulateur.

Le système MS2-YFP nous permet de visualiser la localisation de l'ARN qui, étiqueté par les motifs MS2, est ainsi reconnu par la protéine MS2, elle-même fusionnée à la YFP pour détection. De cette manière, les différentes isoformes de *K12* ont été clonées dans un vecteur d'expression, en amont de motifs MS2. Rappelons aussi que nous avons créé deux variantes de protéine de fusion MS2-YFP: la première contient une séquence de localisation nucléaire et localise systématiquement la protéine dans le noyau tandis que la deuxième ne possède pas cette séquence et n'a aucun effet sur la localisation de la protéine. Le principe du système MS2-YFP et les deux expériences menées sont schématisés dans la **figure 4.4** du **chapitre 4 – Matériel et méthodes**. La localisation de l'ARN a été déterminée dans deux expériences menées en parallèle, avec l'utilisation des deux variantes de plasmide MS2-YFP (avec et sans NLS). Pour chaque expérience, le plasmide contenant la protéine MS2-YFP a été co-transfecté avec le plasmide contenant l'ARN marqué MS2 (*K12* dans pCMV5-MS2). Dans une condition contrôle, le plasmide contenant la protéine MS2-YFP a été co-transfecté avec un plasmide contenant l'ARN qui n'est pas marqué par les motifs MS2 (*K12* dans pGEM-t).

Dans le cas de l'expérience A (MS2-YFP sans NLS), le puits contrôle montre que la YFP reste diffuse dans toute la cellule à l'exclusion du noyau, marqué par le DAPI. Une fois que l'ARN est présent, la YFP, même si elle n'est pas limitée au noyau, semble s'y localiser préférentiellement. De manière intéressante, la localisation de la YFP se retrouve particulièrement dans les régions du noyau où la fluorescence du DAPI est moins prononcée,

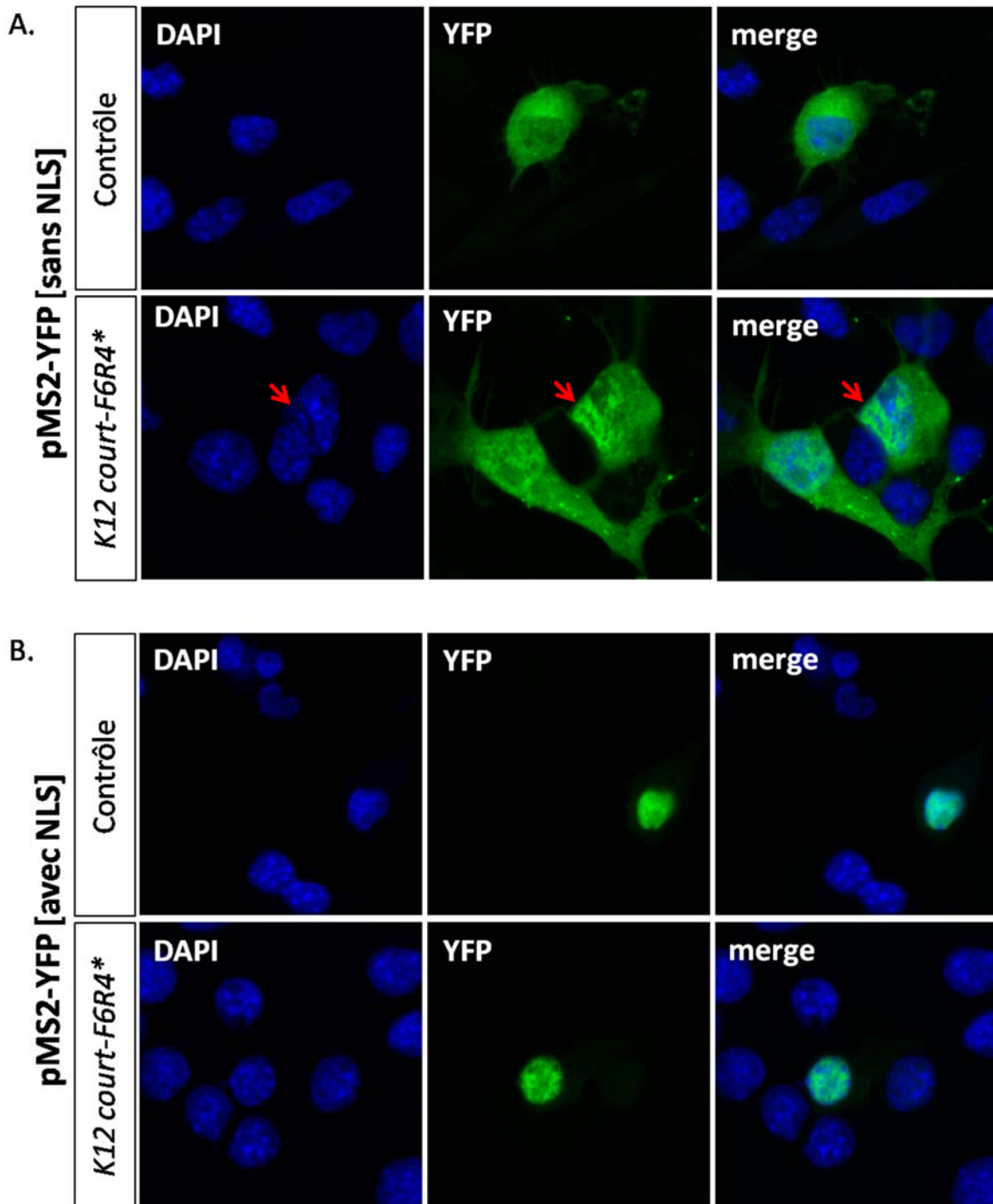


Figure 5.18 : K12 est localisé dans des régions transcriptionnellement actives du noyau. A. Expérience sans NLS fusionné à la YFP. Dans le contrôle, sans ARN marqué, la YFP est diffuse dans le cytoplasme. Quand K12-MS2 est présent, la YFP se localise préférentiellement au noyau et particulièrement dans des zones de chromatine ouverte. B. Expérience avec NLS fusionné à la YFP. Dans le contrôle, la YFP est diffuse dans le noyau. En présence de K12-MS2, la YFP se retrouve dans les zones d'euchromatine du noyau.

ce qui correspond à l'euchromatine ou chromatine ouverte (**Figure 5.18 A**). En ce qui concerne, l'expérience B (MS2-YFP avec NLS), le puits contrôle montre que la YFP est localisée au noyau de manière diffuse. Une fois que l'ARN est présent, la YFP reste localisée au noyau mais plus particulièrement dans les régions d'euchromatine (**Figure 5.18 B**). Ces observations renforcent le potentiel de *K12* à réguler la transcription de son voisin *Nr2f1*, puisqu'il se situe dans des régions où la chromatine est accessible à la machinerie de transcription.

Nous ne montrons pas toutes les photos ici par souci de simplicité, mais ces résultats sont les mêmes pour tous les transcrits de *K12* que nous avons cloné. Que ce soient les formes courtes ou les formes longues, aucune différence n'a été remarquée dans leur localisation.

Une dernière expérience a été menée en transfectant un troisième plasmide contenant la protéine B23 fusionnée à la RFP. B23, aussi connue sous le nom de nucléophosmine, est une protéine humaine nucléolaire. Sachant que *K12* semblait se situer particulièrement dans le noyau, nous avons voulu savoir s'il était localisé plus particulièrement dans le nucléole. Ainsi, nous avons pu facilement déterminer que *K12* est exclu du nucléole (**Figure 5.19**).

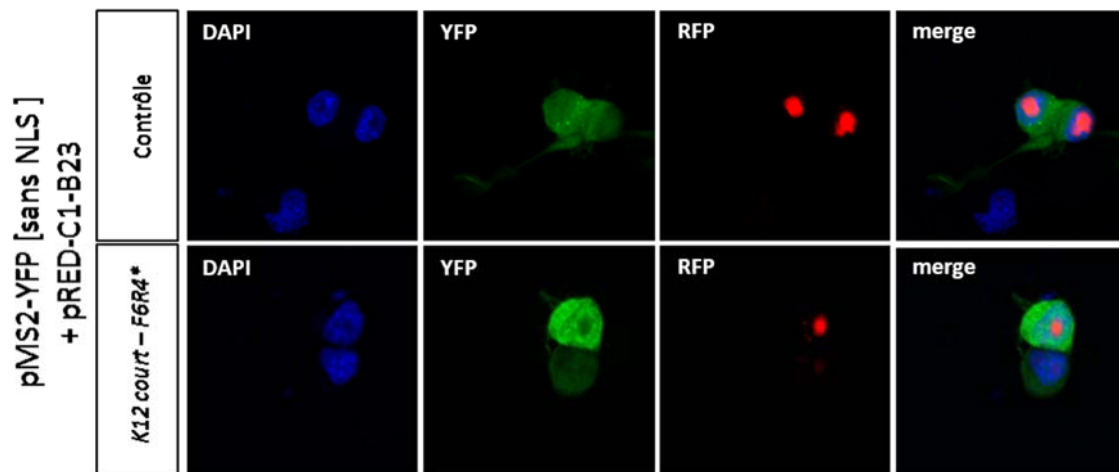


Figure 5.19 : *K12* n'est pas localisé dans le nucléole. *K12* est localisé dans le noyau mais il est exclu du nucléole. Le résultat est le même pour toutes les formes de *K12* (avec ou sans NLS).

CHAPITRE 6 : DISCUSSION

Le développement du SNE chez les mammifères est dérivé d'un petit groupe de progéniteurs qui émigrent du tube neural, les CCN. Pour permettre une formation complète d'un SNE fonctionnel, ces cellules progénitrices prolifèrent de manière très importante afin de coloniser entièrement le tractus digestif en développement. Pendant leur colonisation, les CCNe se différencient en neurones et cellules gliales qui s'organiseront en plexus ganglionnaires responsables du comportement complexe de l'intestin et notamment de ses mouvements péristaltiques. Ce processus développemental implique des événements séquentiels de neurogénèse et de gliogénèse qui nécessite d'abord une balance entre la prolifération et la différenciation, mais aussi un équilibre adéquat entre les différents types de neurones et de cellules gliales entériques. Plusieurs voies de signalisation sont connues pour être impliquées dans le développement du SNE. Une coordination parfaite entre les voies de signalisation qui régulent la prolifération et la différenciation neuronale et gliale est donc essentielle pour le développement d'un SNE correct. Dans le cas contraire, un défaut dans l'une des composantes de ce réseau complexe de voies de signalisation peut mener à la maladie de HSCR, une neuropathie congénitale.

Les analyses génétiques de patients atteints de la maladie ont identifié plusieurs loci et mutations associés à la maladie de HSCR mais rappelons que des mutations dans des gènes connus n'expliquent qu'une partie – entre un tiers et la moitié – des cas sporadiques de HSCR (Amiel & Lyonnet, 2001; Gariepy, 2004). La maladie de HSCR est une condition hétérogène qui peut être transmise d'une manière autosomique dominante : l'allèle muté est situé sur un chromosome non sexuel et un seul allèle muté peut suffire pour que la maladie se manifeste (Bodian & Carter, 1963). De manière intéressante, la pénétrance de la maladie est incomplète puisque tous les porteurs des génotypes sensibles ne sont pas atteints et ce, même au sein d'une même famille. Ceci suggère fortement l'existence de « modificateurs génétiques » qui

reflètent la complexité du réseau de voies de signalisation impliquées dans le développement du SNE (Mundt & Bates, 2010). Le gène *RET*, appartenant à l'une de ces voies de signalisation, est reconnu comme un gène central dans la maladie puisque nous savons maintenant qu'entre 15 et 35 % des cas de HSCR sporadiques possèdent une mutation hétérozygote dans la séquence codante de *RET* (Brooks et al., 2005). Cependant, la transmission de la maladie semblerait être multifactorielle et multigénétique : on soupçonne qu'une mutation dans un gène à risque contribue à la maladie en conjonction avec une ou plusieurs mutations dans d'autres gènes – qu'ils soient au sein de la même voie de signalisation ou dans une voie de signalisation en interaction dans le réseau. Aujourd'hui, de nombreux chercheurs spéculent que certains cas de HSCR seraient dus à une accumulation de variants d'ADN communs et plus rares, dans différents gènes (Liu et al., 2015; Mundt & Bates, 2010). Ainsi, les différentes combinaisons de variants génétiques pourraient mener à un large éventail de cas avec différents degrés de sévérité de la maladie (Liu et al., 2015).

Les études basées sur la caractérisation de modèles animaux pour la maladie de HSCR sont très instructives puisqu'elles permettent d'étudier un (ou plusieurs) gène(s) spécifique(s), ainsi que la physiopathologie de la maladie. Dans ce projet de recherche, la caractérisation de la lignée transgénique Spot nous a permis, d'une part, de mettre en évidence deux nouveaux gènes possiblement associés à la maladie de HSCR et de confirmer la gliogenèse précoce comme un important mécanisme pathogénique.

Les souris Spot homozygotes souffrent des signes classiques de mégacôlon aganglionnaire: une mort prématurée autour de l'âge de trois semaines, une taille inférieure à la normale, une posture courbée et un abdomen gonflé pour les mutants encore vivants. Ces derniers présentent un blocage et une accumulation de matière fécale dans leur caecum et dans la partie proximale de leur côlon suggérant un côlon distal aganglionnaire. De plus, une analyse histologique effectuée dans le laboratoire a confirmé l'absence de ganglions dans les parties distales du côlon Spot. Une analyse en profondeur du développement du SNE chez l'embryon Spot nous a permis de mettre en évidence une différenciation gliale prématurée des CCNe. Une fois différenciés, les progéniteurs perdent leur potentiel de prolifération et nous

observons chez Spot une baisse de prolifération et un retard de migration des CCNe chez Spot. Ceci menant ainsi à une aganglionose du côlon distal et au phénotype de la maladie de HSCR.

En 2011, Ngan et ses collaborateurs ont proposé la gliogénèse précoce comme un nouveau mécanisme pour la maladie de HSCR (Ngan et al., 2011). En effet, la délétion *in vivo* du gène *Patched (Ptch1)* chez la souris a entraîné une gliogénèse prématurée et une diminution des CCNe progénitrices dans les intestins des embryons mutants, pouvant mener à la maladie de HSCR. En revanche, ces embryons mutants mourraient à au stade embryonnaire (e)12. Les mutants n'étant pas capables de se développer jusqu'à la naissance, le phénotype de la maladie de HSCR n'a donc jamais pu être confirmé (Ngan et al., 2011). Avec la lignée Spot, nous montrons pour la première fois que la différenciation gliale prématurée des CCNe progénitrices entraîne un défaut de formation du SNE chez l'embryon menant à un mégacôlon aganglionnaire. Ceci souligne l'importance du ratio du nombre de neurones par rapport au nombre de cellules gliales dans le développement du SNE.

Bien que létale embryonnaire, la mutation de *Ptch1* nous invite à investiguer au sujet d'une voie de signalisation impliquée dans le développement du SNE, et plus particulièrement dans la gliogénèse. *Ptch1* code pour le récepteur protéique de la glycoprotéine Shh qui est depuis longtemps connue pour son rôle majeur dans l'embryogénèse. En effet, la voie Shh intervient dans le contrôle de la migration des CCN au niveau de la formation des tissus, de leur innervation et de leur vascularisation (Marigo & Tabin, 1996; Watson, Serrate, & Vignot, 2010). De manière intéressante, il a été montré que la voie Shh régule également de nombreux aspects du développement gastro-intestinal, notamment l'organogénèse de l'intestin et la formation du SNE (Ramalho-Santos, Melton, & McMahon, 2000). Une perturbation dans la voie Shh peut mener à un mégacôlon aganglionnaire ou à la formation de ganglions ectopiques chez la souris (Jin, Martinelli, Zheng, Tessier-Lavigne, & Fan, 2015; Mao, Kim, Rajurkar, Shivdasani, & McMahon, 2010).

Chez les mammifères, les gènes *Gli1*, *Gli2* et *Gli3*, qui encodent les facteurs de transcription de la famille Gli-Kruppel, sont des médiateurs permettant la transduction du signal de la voie Shh.

Gli1 est un activateur constitutif tandis que Gli2 et Gli3 sont à la fois activateur et répresseurs (Hui & Angers, 2011; Ngan et al., 2011). En 1997, un modèle de souris transgénique, dans lequel le gène *GLI1* humain a été surexprimé, présentait le phénotype de la maladie de HSCR, avec une sévérité du phénotype reliée au niveau d'expression du transgène (Yang et al., 1997). A cette époque, ceci suggérait déjà que les niveaux d'expression de Gli étaient importants dans le développement du SNE.

Très récemment, en Août 2015, Liu et ses collaborateurs ont reporté pour la première fois des mutations dans les gènes *GLI* chez des patients atteints de la maladie de HSCR, non syndromiques (Liu et al., 2015). De manière intéressante, toutes les mutations qu'ils ont observées ont mené à une augmentation de l'activité transcriptionnelle des protéines GLI. Ceci a eu pour conséquence l'induction de la différenciation gliale des CCNe, entraînant un retard dans la colonisation de l'intestin par les CCNe (Liu et al., 2015). Ainsi, nous retrouvons exactement le mécanisme qui entraîne le mégacôlon aganglionnaire dans notre lignée transgénique Spot. Si nous faisons le bilan, nous savons, d'une part, que le facteur de transcription *Nr2f1* est connu pour favoriser la gliogénèse dans le SNC (Naka et al., 2008). Nous savons, d'autre part, que le gène *Nr2f2* est régulé par le morphogène *Shh* (Tsai & Tsai, 1997). Puisque la surexpression de *Nr2f1* semble être responsable du phénotype Spot, nous proposons *Nr2f1* comme un nouvel acteur de la voie de signalisation *Shh* dans la régulation de la gliogénèse dans le SNE. Sachant cela, il convient de se demander à quel niveau ce facteur de transcription se place-t-il au sein de la voie de signalisation *Shh* afin de contrôler la différenciation gliale entérique.

Le gène *Shh* code pour le ligand activateur de la voie de signalisation. Quand le ligand *Shh* est sécrété, il se lie à son récepteur *Ptch1*, ce qui inhibe la capacité de celui-ci à réprimer l'activité de *Smo* -- un deuxième récepteur associé à *Shh*. *Smo*, en présence de *Shh*, peut alors migrer à la membrane plasmique, ce qui aboutit à l'activation des facteurs Gli par l'intermédiaire d'acteurs indéterminés. Les facteurs Gli activés vont migrer dans le noyau pour réguler l'expression de gènes cibles de la voie, ce qui aboutit à la régulation de différents processus et

notamment à l'augmentation de la différenciation gliale. Le facteur de transcription Nr2f1 agit-il en amont ou en aval des facteurs Gli ?

Le séquençage du transcriptome de Spot peut nous donner une première réponse à cette question. Nous ne voyons aucune expression aberrante des gènes *Gli* chez Spot par rapport au contrôle, ce qui signifie que le facteur de transcription Nr2f1 se positionne en aval des facteurs Gli dans la voie. Cependant, afin de confirmer nos hypothèses, il est indispensable de mener des expériences, *in vitro* et *in vivo*, afin de voir si les *Gli* sont capables de réguler Nr2f1. Enfin, il serait intéressant de regarder les niveaux d'expression de *Nr2f1* dans la lignée transgénique qui surexprime le gène *GLI1* humain, générée dans le laboratoire de Yang (Yang et al., 1997). Le modèle que nous proposons est représenté dans la **figure 6.1 B**.

En outre, rappelons que *Nr2f2*, au même titre que *Nr2f1*, est nécessaire pour la spécification temporaire des progéniteurs dans le SNC et notamment pour la génération des différents types gliaux durant le développement du SNC (Naka et al., 2008). Puisque *Nr2f2* possède une très grande homologie de séquences avec *Nr2f1* et qu'il est également connu pour son rôle dans la gliogénèse, nous pouvons imaginer que *Nr2f2* s'intègre également dans la voie de signalisation Shh pour réguler la gliogénèse du SNE. De plus, le séquençage du transcriptome montre que *Nr2f2* s'exprime dans les CCNe ce qui va dans la continuité d'un possible rôle dans le développement du SNE. De la même manière que *Nr2f1*, il serait intéressant d'étudier l'expression de *Nr2f2* dans la lignée transgénique murine qui surexprime *GLI1* (Yang et al., 1997) mais aussi dans les mutants Spot.

A la lumière des résultats que nous avons obtenus dans la caractérisation de la lignée transgénique Spot, associés à ce qui est connu dans la littérature, le défaut du SNE Spot peut s'expliquer par l'activité de l'élément conservé 2.5 qui réprime directement *Nr2f1*. En effet, nos expériences nous ont permis de voir que cet élément, hautement conservé dans l'évolution, possède une activité répressive très forte. Dans la lignée transgénique Spot, le transgène – minigène *tyrosinase* de 7 kb (Methot et al., 1995) – s'est inséré dans le locus *Nr2f1-K12*, résultant en une courte délétion de 353 pb. Ceci a donc fort probablement

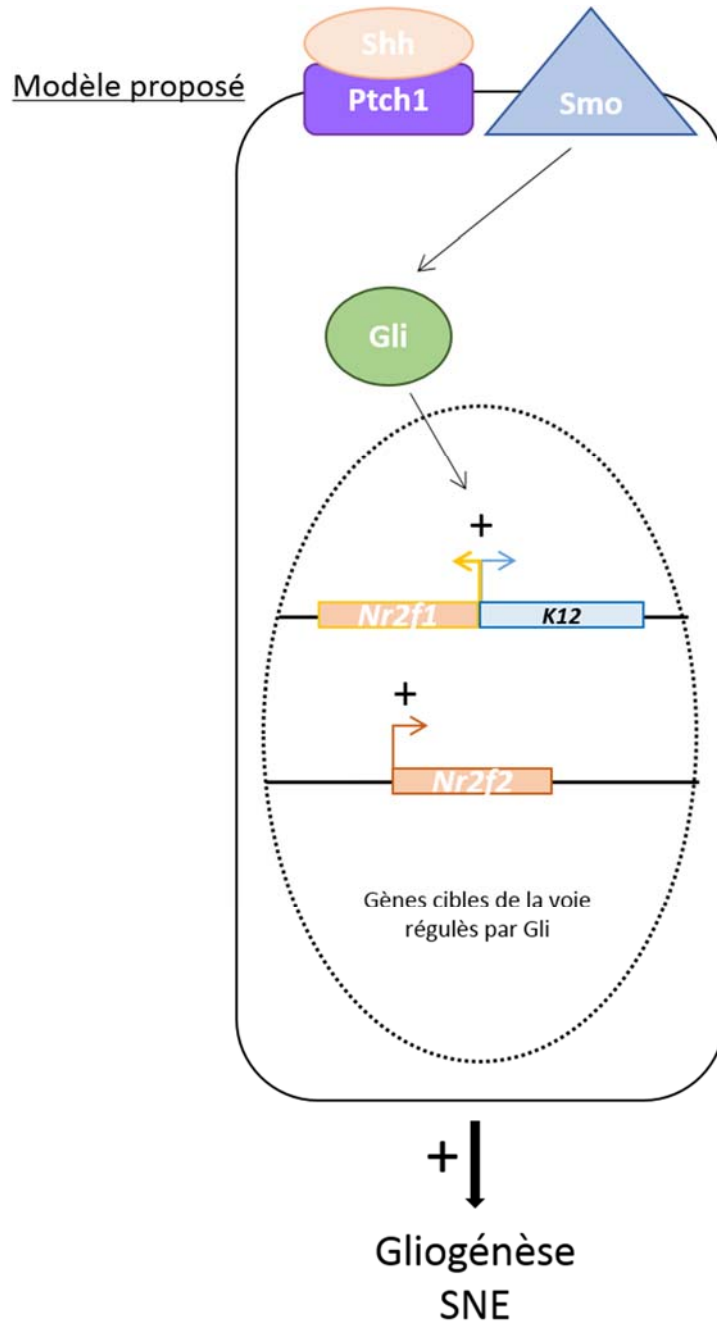


Figure 6.1 : Un modèle pour le facteur de transcription Nr2f1 dans la voie de signalisation Shh et la régulation de la gliogénèse dans le système nerveux entérique. Puisque les gènes *Gli* ne sont pas surexprimés chez Spot, nous proposons un nouveau modèle de la voie Shh dans lequel les facteurs Gli régulent *Nr2f1* pour favoriser la différenciation gliale dans le SNE. Une autre hypothèse peut être fournie quant à *K12* et à son potentiel à réguler *Nr2f1*.

perturbé toute l'organisation du locus et notamment celle de l'élément conservé -- une séquence de 676 pb, situé à environ 2 kb après le site d'insertion du transgène – qui ne peut plus exercer sa fonction de répression. Dans de telles conditions, les formes longues de *K12* sont interrompues par l'insertion et disparaissent. Au contraire, les gènes *Nr2f1* et les formes courtes de *K12*, n'étant plus réprimés par l'EC2.5, sont largement surexprimés et entraînent une gliogénèse prématurée dans le SNE. Afin d'en savoir plus à ce sujet, il serait essentiel de faire des expériences de 3C ou capture de la conformation de la chromatine, pour déterminer si cet élément conservé interagit directement avec l'un ou l'autre des deux gènes, *Nr2f1* et *K12-court* – au sein du chromosome 13. Dans la même idée, une expérience similaire avait été menée dans notre laboratoire sur TashT, une autre lignée de souris transgénique. L'expérience fut concluante et a montré que l'insertion transgénique chez TashT a perturbé des contacts intra-chromosomiques – à l'intérieur du chromosome 10 – qui réprimaient l'expression du gène *Fam162b* dans les CCN (Bergeron et al., 2015).

Pourtant, vous pouvez remarquer que nous avons inclus le gène d'ARN *K12*, antisens de *Nr2f1*, dans le modèle proposé concernant la voie Shh dans la **figure 6.1 B**. En effet, si *Nr2f1* peut agir seul, il est tout aussi possible qu'il intervienne avec l'aide de *K12* pour induire la gliogénèse dans le SNE. Avec l'émergence des ARNInc et leur capacité à réguler la transcription d'autres gènes de nombreuses façons, notre hypothèse de départ résidait dans le fait que l'ARNInc *K12* était capable de réguler l'expression de *Nr2f1*. Rappelons que même si les isoformes courtes de *K12* sont surexprimées chez Spot, elles le sont beaucoup moins que *Nr2f1*. En revanche, les analyses de RT-PCR que nous avons menées ont révélé l'existence de plusieurs isoformes courtes de *K12*, d'une part, surexprimées dans les CCNe et, d'autre part, surexprimées voire exclusivement exprimées dans les CCNe des homozygotes Spot. Ceci suggère donc que *K12-court* joue un rôle dans le phénotype Spot. De la même manière que *Nr2f1*, il serait intéressant d'analyser les niveaux d'expression des formes courtes de *K12* dans la lignée transgénique murine qui surexprime *GLI1* (Yang et al., 1997) afin de voir s'il peut se placer dans la voie Shh pour réguler la gliogénèse du SNE.

En outre, la position de *K12* à proximité de *Nr2f1* laisse penser que cet ARNlnc serait capable de réguler – en cis – la transcription de son voisin, comme c’est le cas de plusieurs exemples dont nous avons parlé en introduction. Plusieurs ARNlnc sont capables d’agir comme des « enhancers », afin d’activer la transcription de gènes voisins (Mattick, 2010; Ong & Corces, 2011; Orom et al., 2010). *K12* est situé dans le noyau et plus particulièrement dans des régions de chromatine ouverte. La chromatine à l’état ouvert – euchromatine – permet l’accès à la machinerie de transcription et donc la transcription. Certaines études ont montré que les ARNlnc étaient capables d’interagir directement avec l’ARN polymérase II afin de réguler son activité (Zhang et al., 2013). Il a été montré que l’ARNlnc, *ci-ankrd52*, qui est un ARN circulaire intronique, s’accumule au niveau de ses sites de transcription, s’associe avec l’ARN polymérase II, et agit comme un régulateur positif de l’activité transcriptionnelle de l’ARN polymérase II. De cette manière, *ci-ankrd52* est capable de réguler – en cis – l’expression de son gène voisin codant (Zhang et al., 2013). Sachant la localisation de l’ARNlnc *K12*, dans la cellule et sur le locus, nous pouvons supposer que celui-ci est capable d’interagir avec l’ARN polymérase II pour réguler – en cis – l’expression de *Nr2f1*. Il serait donc intéressant d’une part de tester l’effet cis-activateur de *K12* par essais luciférase et d’autre part, de mener, sur l’ARN natif, une expérience d’immuno-précipitation avec l’ARN polymérase II afin d’identifier les interactions de *K12* avec la machinerie de transcription.

CONCLUSION

En définitive, la lignée transgénique Spot nous a fourni un modèle unique d'étude pour le mégacôlon aganglionnaire. La caractérisation de ce modèle, aux niveaux cellulaire, moléculaire et génétique nous a permis d'identifier le facteur de transcription Nr2f1 comme un nouvel acteur favorisant la gliogénèse du SNE et menant au mégacôlon aganglionnaire.

Finalement, la compréhension de la génétique complexe de la maladie de HSCR est un enjeu essentiel puisqu'elle pourrait influencer les pratiques cliniques de plusieurs manières. D'abord, l'utilisation de modèles animaux permet à la fois l'étude de gènes spécifiques et l'analyse de la physiopathologie de la maladie. Ensuite, l'étude de mutations dans ces gènes spécifiques chez l'humain permet de mettre en évidence des corrélations génotype-phénotype et d'identifier de nouveaux syndromes afin d'ajuster les soins cliniques pour les patients. Enfin, l'identification de mutations spécifiques au sein d'une famille permettrait d'améliorer le conseil génétique et éventuellement le diagnostic prénatal de la maladie de HSCR.

BIBLIOGRAPHIE

1. Alves, M. M., Sribudiani, Y., Brouwer, R. W., Amiel, J., Antinolo, G., Borrego, S., . . . Hofstra, R. M. (2013). Contribution of rare and common variants determine complex diseases-Hirschsprung disease as a model. *Dev Biol*, *382*(1), 320-329. doi:10.1016/j.ydbio.2013.05.019
2. Amaral, P. P., & Mattick, J. S. (2008). Noncoding RNA in development. *Mamm Genome*, *19*(7-8), 454-492. doi:10.1007/s00335-008-9136-7
3. Amiel, J., & Lyonnet, S. (2001). Hirschsprung disease, associated syndromes, and genetics: a review. *J Med Genet*, *38*(11), 729-739. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11694544>
4. Amiel, J., Sproat-Emison, E., Garcia-Barcelo, M., Lantieri, F., Burzynski, G., Borrego, S., . . . Hirschsprung Disease, C. (2008). Hirschsprung disease, associated syndromes and genetics: a review. *J Med Genet*, *45*(1), 1-14. doi:10.1136/jmg.2007.053959
5. Anderson, R. B., Stewart, A. L., & Young, H. M. (2006). Phenotypes of neural-crest-derived cells in vagal and sacral pathways. *Cell Tissue Res*, *323*(1), 11-25. doi:10.1007/s00441-005-0047-6
6. Anderson, R. B., Turner, K. N., Nikonenko, A. G., Hemperly, J., Schachner, M., & Young, H. M. (2006). The cell adhesion molecule I1 is required for chain migration of neural crest cells in the developing mouse gut. *Gastroenterology*, *130*(4), 1221-1232. doi:10.1053/j.gastro.2006.01.002
7. Antonellis, A., Huynh, J. L., Lee-Lin, S. Q., Vinton, R. M., Renaud, G., Loftus, S. K., . . . Pavan, W. J. (2008). Identification of neural crest and glial enhancers at the mouse Sox10 locus through transgenesis in zebrafish. *PLoS Genet*, *4*(9), e1000174. doi:10.1371/journal.pgen.1000174
8. Aparicio, S., Chapman, J., Stupka, E., Putnam, N., Chia, J. M., Dehal, P., . . . Brenner, S. (2002). Whole-genome shotgun assembly and analysis of the genome of *Fugu rubripes*. *Science*, *297*(5585), 1301-1310. doi:10.1126/science.1072104
9. Badner, J. A., Sieber, W. K., Garver, K. L., & Chakravarti, A. (1990). A genetic study of Hirschsprung disease. *Am J Hum Genet*, *46*(3), 568-580. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2309705>
10. Baetge, G., & Gershon, M. D. (1989). Transient catecholaminergic (TC) cells in the vagus nerves and bowel of fetal mice: relationship to the development of enteric neurons. *Dev Biol*, *132*(1), 189-211. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2563710>
11. Barlow, A., de Graaff, E., & Pachnis, V. (2003). Enteric nervous system progenitors are coordinately controlled by the G protein-coupled receptor EDNRB and the receptor tyrosine kinase RET. *Neuron*, *40*(5), 905-916. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14659090>

12. Bergeron, K. F., Cardinal, T., Toure, A. M., Beland, M., Raiwet, D. L., Silversides, D. W., & Pilon, N. (2015). Male-biased aganglionic megacolon in the TashT mouse line due to perturbation of silencer elements in a large gene desert of chromosome 10. *PLoS Genet*, *11*(3), e1005093. doi:10.1371/journal.pgen.1005093
13. Bergeron, K. F., Silversides, D. W., & Pilon, N. (2013). The developmental genetics of Hirschsprung's disease. *Clin Genet*, *83*(1), 15-22. doi:10.1111/cge.12032
14. Berghoff, E. G., Clark, M. F., Chen, S., Cajigas, I., Leib, D. E., & Kohtz, J. D. (2013). Evf2 (Dlx6as) lncRNA regulates ultraconserved enhancer methylation and the differential transcriptional control of adjacent genes. *Development*, *140*(21), 4407-4416. doi:10.1242/dev.099390
15. Berretta, J., & Morillon, A. (2009). Pervasive transcription constitutes a new level of eukaryotic genome regulation. *EMBO Rep*, *10*(9), 973-982. doi:10.1038/embor.2009.181
16. Bodian, M., & Carter, C. (1963). A family study of Hirschsprung disease. *Ann Hum Genet*, *26*:261.
17. Boesmans, W., Lasrado, R., Vanden Berghe, P., & Pachnis, V. (2015). Heterogeneity and phenotypic plasticity of glial cells in the mammalian enteric nervous system. *Glia*, *63*(2), 229-241. doi:10.1002/glia.22746
18. Bondurand, N., Natarajan, D., Barlow, A., Thapar, N., & Pachnis, V. (2006). Maintenance of mammalian enteric nervous system progenitors by SOX10 and endothelin 3 signalling. *Development*, *133*(10), 2075-2086. doi:10.1242/dev.02375
19. Bondurand, N., Natarajan, D., Thapar, N., Atkins, C., & Pachnis, V. (2003). Neuron and glia generating progenitors of the mammalian enteric nervous system isolated from foetal and postnatal gut cultures. *Development*, *130*(25), 6387-6400. doi:10.1242/dev.00857
20. Breau, M. A., Dahmani, A., Broders-Bondon, F., Thiery, J. P., & Dufour, S. (2009). Beta1 integrins are required for the invasion of the caecum and proximal hindgut by enteric neural crest cells. *Development*, *136*(16), 2791-2801. doi:10.1242/dev.031419
21. Breau, M. A., Pietri, T., Eder, O., Blanche, M., Brakebusch, C., Fassler, R., . . . Dufour, S. (2006). Lack of beta1 integrins in enteric neural crest cells leads to a Hirschsprung-like phenotype. *Development*, *133*(9), 1725-1734. doi:10.1242/dev.02346
22. Brehmer, A., Schrod, F., & Neuhuber, W. (1999). Morphological classifications of enteric neurons -- 100 years after Dogiel. *Anatomy and Embryology*, *200*(2), 125-135. doi:10.1007/s004290050267
23. Britsch, S., Goerich, D. E., Riethmacher, D., Peirano, R. I., Rossner, M., Nave, K. A., . . . Wegner, M. (2001). The transcription factor Sox10 is a key regulator of peripheral glial development. *Genes Dev*, *15*(1), 66-78. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11156606>
24. Broders-Bondon, F., Paul-Gilloteaux, P., Carlier, C., Radice, G. L., & Dufour, S. (2012). N-cadherin and beta1-integrins cooperate during the development of the enteric nervous system. *Dev Biol*, *364*(2), 178-191. doi:10.1016/j.ydbio.2012.02.001

25. Brody, Y., & Shav-Tal, Y. (2011). Measuring the kinetics of mRNA transcription in single living cells. *J Vis Exp*(54), e2898. doi:10.3791/2898
26. Brooks, A. S., Oostra, B. A., & Hofstra, R. M. (2005). Studying the genetics of Hirschsprung's disease: unraveling an oligogenic disorder. *Clin Genet*, 67(1), 6-14. doi:10.1111/j.1399-0004.2004.00319.x
27. Burns, A. J., & Le Douarin, N. M. (2001). Enteric nervous system development: analysis of the selective developmental potentialities of vagal and sacral neural crest cells using quail-chick chimeras. *Anat Rec*, 262(1), 16-28. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11146425>
28. Butler Tjaden, N. E., & Trainor, P. A. (2013). The developmental etiology and pathogenesis of Hirschsprung disease. *Transl Res*, 162(1), 1-15. doi:10.1016/j.trsl.2013.03.001
29. Carmona-Fontaine, C., Matthews, H. K., Kuriyama, S., Moreno, M., Dunn, G. A., Parsons, M., . . . Mayor, R. (2008). Contact inhibition of locomotion in vivo controls neural crest directional migration. *Nature*, 456(7224), 957-961. doi:10.1038/nature07441
30. Carninci, P., Kasukawa, T., Katayama, S., Gough, J., Frith, M. C., Maeda, N., . . . Genome Science, G. (2005). The transcriptional landscape of the mammalian genome. *Science*, 309(5740), 1559-1563. doi:10.1126/science.1112014
31. Chalazonitis, A., Rothman, T. P., Chen, J., & Gershon, M. D. (1998). Age-dependent differences in the effects of GDNF and NT-3 on the development of neurons and glia from neural crest-derived precursors immunoselected from the fetal rat gut: expression of GFRalpha-1 in vitro and in vivo. *Dev Biol*, 204(2), 385-406. doi:10.1006/dbio.1998.9090
32. Chalazonitis, A., Tennyson, V. M., Kibbey, M. C., Rothman, T. P., & Gershon, M. D. (1997). The alpha1 subunit of laminin-1 promotes the development of neurons by interacting with LBP110 expressed by neural crest-derived cells immunoselected from the fetal mouse gut. *J Neurobiol*, 33(2), 118-138. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9240369>
33. Chutkan, R. K. (2001). Inflammatory bowel disease. *Prim Care*, 28(3), 539-556, vi. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11483443>
34. Coelho-Aguiar Jde, M., Bon-Frauches, A. C., Gomes, A. L., Verissimo, C. P., Aguiar, D. P., Matias, D., . . . Moura-Neto, V. (2015). The enteric glia: identity and functions. *Glia*, 63(6), 921-935. doi:10.1002/glia.22795
35. Costagliola, A., Van Nassauw, L., Snyders, D., Adriaensen, D., & Timmermans, J. P. (2009). Voltage-gated delayed rectifier K v 1-subunits may serve as distinctive markers for enteroglial cells with different phenotypes in the murine ileum. *Neurosci Lett*, 461(2), 80-84. doi:10.1016/j.neulet.2009.06.053
36. De Giorgio, R., & Camilleri, M. (2004). Human enteric neuropathies: morphology and molecular pathology. *Neurogastroenterol Motil*, 16(5), 515-531. doi:10.1111/j.1365-2982.2004.00538.x

37. Dickinson, M. E., Selleck, M. A., McMahon, A. P., & Bronner-Fraser, M. (1995). Dorsalization of the neural tube by the non-neural ectoderm. *Development*, *121*(7), 2099-2106. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7635055>
38. Doray, B., Salomon, R., Amiel, J., Pelet, A., Touraine, R., Billaud, M., . . . Lyonnet, S. (1998). Mutation of the RET ligand, neurturin, supports multigenic inheritance in Hirschsprung disease. *Hum Mol Genet*, *7*(9), 1449-1452. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9700200>
39. Druckenbrod, N. R., & Epstein, M. L. (2007). Behavior of enteric neural crest-derived cells varies with respect to the migratory wavefront. *Dev Dyn*, *236*(1), 84-92. doi:10.1002/dvdy.20974
40. Druckenbrod, N. R., & Epstein, M. L. (2009). Age-dependent changes in the gut environment restrict the invasion of the hindgut by enteric neural progenitors. *Development*, *136*(18), 3195-3203. doi:10.1242/dev.031302
41. Dupin, E., & Sommer, L. (2012). Neural crest progenitors and stem cells: from early development to adulthood. *Dev Biol*, *366*(1), 83-95. doi:10.1016/j.ydbio.2012.02.035
42. Durbec, P. L., Larsson-Blomberg, L. B., Schuchardt, A., Costantini, F., & Pachnis, V. (1996). Common origin and developmental dependence on c-ret of subsets of enteric and sympathetic neuroblasts. *Development*, *122*(1), 349-358. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8565847>
43. Edery, P., Attie, T., Amiel, J., Pelet, A., Eng, C., Hofstra, R. M., . . . Lyonnet, S. (1996). Mutation of the endothelin-3 gene in the Waardenburg-Hirschsprung disease (Shah-Waardenburg syndrome). *Nat Genet*, *12*(4), 442-444. doi:10.1038/ng0496-442
44. Emison, E. S., McCallion, A. S., Kashuk, C. S., Bush, R. T., Grice, E., Lin, S., . . . Chakravarti, A. (2005). A common sex-dependent mutation in a RET enhancer underlies Hirschsprung disease risk. *Nature*, *434*(7035), 857-863. doi:10.1038/nature03467
45. Eng, C. (1999). RET proto-oncogene in the development of human cancer. *J Clin Oncol*, *17*(1), 380-393. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10458257>
46. Erickson, C. S., Lee, S. J., Barlow-Anacker, A. J., Druckenbrod, N. R., Epstein, M. L., & Gosain, A. (2014). Appearance of cholinergic myenteric neurons during enteric nervous system development: comparison of different ChAT fluorescent mouse reporter lines. *Neurogastroenterol Motil*, *26*(6), 874-884. doi:10.1111/nmo.12343
47. Fernandez, R. M., Nunez-Ramos, R., Enguix-Riego, M. V., Roman-Rodriguez, F. J., Galan-Gomez, E., Blesa-Sanchez, E., . . . Borrego, S. (2014). Waardenburg syndrome type 4: report of two new cases caused by SOX10 mutations in Spain. *Am J Med Genet A*, *164A*(2), 542-547. doi:10.1002/ajmg.a.36302
48. Fjose, A., Weber, U., & Mlodzik, M. (1995). A novel vertebrate svp-related nuclear receptor is expressed as a step gradient in developing rhombomeres and is affected by retinoic acid. *Mech Dev*, *52*(2-3), 233-246. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8541212>
49. Fu, M., Lui, V. C., Sham, M. H., Cheung, A. N., & Tam, P. K. (2003). HOXB5 expression is spatially and temporarily regulated in human embryonic gut during neural crest cell

- colonization and differentiation of enteric neuroblasts. *Dev Dyn*, 228(1), 1-10. doi:10.1002/dvdy.10350
50. Furness, J. B. (2008). The enteric nervous system: normal functions and enteric neuropathies. *Neurogastroenterol Motil*, 20 Suppl 1, 32-38. doi:10.1111/j.1365-2982.2008.01094.x
 51. Furness, J. B. (2012). The enteric nervous system and neurogastroenterology. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 9(5), 286-294. doi:10.1038/nrgastro.2012.32
 52. Gammill, L. S., & Bronner-Fraser, M. (2003). Neural crest specification: migrating into genomics. *Nat Rev Neurosci*, 4(10), 795-805. doi:10.1038/nrn1219
 53. Gariepy, C. E. (2004). Developmental disorders of the enteric nervous system: genetic and molecular bases. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 39(1), 5-11. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15187773>
 54. Gatta, G., Di Grezia, G., Di Mizio, V., Landolfi, C., Mansi, L., De Sio, I., . . . Grassi, R. (2012). Crohn's disease imaging: a review. *Gastroenterol Res Pract*, 2012, 816920. doi:10.1155/2012/816920
 55. Geisler, S., & Coller, J. (2013). RNA in unexpected places: long non-coding RNA functions in diverse cellular contexts. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 14(11), 699-712. doi:10.1038/nrm3679
 56. Gershon, M. D. (1998). The second brain. *New York: Harper Collins*.
 57. Gianino, S., Grider, J. R., Cresswell, J., Enomoto, H., & Heuckeroth, R. O. (2003). GDNF availability determines enteric neuron number by controlling precursor proliferation. *Development*, 130(10), 2187-2198. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12668632>
 58. Giguere, V. (1999). Orphan nuclear receptors: from gene to function. *Endocr Rev*, 20(5), 689-725. doi:10.1210/edrv.20.5.0378
 59. Glass, C. K., & Ogawa, S. (2006). Combinatorial roles of nuclear receptors in inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol*, 6(1), 44-55. doi:10.1038/nri1748
 60. Griseri, P., Lantieri, F., Puppo, F., Bachetti, T., Di Duca, M., Ravazzolo, R., & Ceccherini, I. (2007). A common variant located in the 3'UTR of the RET gene is associated with protection from Hirschsprung disease. *Hum Mutat*, 28(2), 168-176. doi:10.1002/humu.20397
 61. Gulbransen, B. D., & Sharkey, K. A. (2012). Novel functional roles for enteric glia in the gastrointestinal tract. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 9(11), 625-632. doi:10.1038/nrgastro.2012.138
 62. Gwee, K. A., Bak, Y. T., Ghoshal, U. C., Gonlachanvit, S., Lee, O. Y., Fock, K. M., . . . Motility, A. (2010). Asian consensus on irritable bowel syndrome. *J Gastroenterol Hepatol*, 25(7), 1189-1205. doi:10.1111/j.1440-1746.2010.06353.x
 63. Hanani, M., & Reichenbach, A. (1994). Morphology of horseradish peroxidase (HRP)-injected glial cells in the myenteric plexus of the guinea-pig. *Cell Tissue Res*, 278(1), 153-160. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7954696>

64. Hanney, M., Prasher, V., Williams, N., Jones, E. L., Aarsland, D., Corbett, A., . . . Ballard, C. (2012). Memantine for dementia in adults older than 40 years with Down's syndrome (MEADOWS): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet*, *379*(9815), 528-536. doi:10.1016/s0140-6736(11)61676-0
65. Hao, M. M., & Young, H. M. (2009). Development of enteric neuron diversity. *J Cell Mol Med*, *13*(7), 1193-1210. doi:10.1111/j.1582-4934.2009.00813.x
66. Haricharan, R. N., & Georgeson, K. E. (2008). Hirschsprung disease. *Semin Pediatr Surg*, *17*(4), 266-275. doi:10.1053/j.sempedsurg.2008.07.005
67. Heanue, T. A., & Pachnis, V. (2007). Enteric nervous system development and Hirschsprung's disease: advances in genetic and stem cell studies. *Nat Rev Neurosci*, *8*(6), 466-479. doi:10.1038/nrn2137
68. Herbarth, B., Pingault, V., Bondurand, N., Kuhlbrodt, K., Hermans-Borgmeyer, I., Puliti, A., . . . Wegner, M. (1998). Mutation of the Sry-related Sox10 gene in Dominant megacolon, a mouse model for human Hirschsprung disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *95*(9), 5161-5165. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9560246>
69. Heuckeroth, R. O., Lampe, P. A., Johnson, E. M., & Milbrandt, J. (1998). Neurturin and GDNF promote proliferation and survival of enteric neuron and glial progenitors in vitro. *Dev Biol*, *200*(1), 116-129. doi:10.1006/dbio.1998.8955
70. Hui, C. C., & Angers, S. (2011). Gli proteins in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*, *27*, 513-537. doi:10.1146/annurev-cellbio-092910-154048
71. Iwashita, T., Kruger, G. M., Pardal, R., Kiel, M. J., & Morrison, S. J. (2003). Hirschsprung disease is linked to defects in neural crest stem cell function. *Science*, *301*(5635), 972-976. doi:10.1126/science.1085649
72. Jin, S., Martinelli, D. C., Zheng, X., Tessier-Lavigne, M., & Fan, C. M. (2015). Gas1 is a receptor for sonic hedgehog to repel enteric axons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *112*(1), E73-80. doi:10.1073/pnas.1418629112
73. Jindal, S. K., & Sharma, M. (2010). *Biotechnology in Animal Health and Production: New India Publishing*.
74. Jonk, L. J., de Jonge, M. E., Pals, C. E., Wissink, S., Vervaart, J. M., Schoorlemmer, J., & Kruijer, W. (1994). Cloning and expression during development of three murine members of the COUP family of nuclear orphan receptors. *Mech Dev*, *47*(1), 81-97. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7947324>
75. Joseph, N. M., He, S., Quintana, E., Kim, Y. G., Nunez, G., & Morrison, S. J. (2011). Enteric glia are multipotent in culture but primarily form glia in the adult rodent gut. *J Clin Invest*, *121*(9), 3398-3411. doi:10.1172/JCI58186
76. Kapranov, P., Cheng, J., Dike, S., Nix, D. A., Duttagupta, R., Willingham, A. T., . . . Gingeras, T. R. (2007). RNA maps reveal new RNA classes and a possible function for pervasive transcription. *Science*, *316*(5830), 1484-1488. doi:10.1126/science.1138341

77. Kapranov, P., Drenkow, J., Cheng, J., Long, J., Helt, G., Dike, S., & Gingeras, T. R. (2005). Examples of the complex architecture of the human transcriptome revealed by RACE and high-density tiling arrays. *Genome Res*, *15*(7), 987-997. doi:10.1101/gr.3455305
78. Kapur, R. P., Yost, C., & Palmiter, R. D. (1992). A transgenic model for studying development of the enteric nervous system in normal and aganglionic mice. *Development*, *116*(1), 167-175. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1483385>
79. Karaosmanoglu, T., Aygun, B., Wade, P. R., & Gershon, M. D. (1996). Regional differences in the number of neurons in the myenteric plexus of the guinea pig small intestine and colon: an evaluation of markers used to count neurons. *Anat Rec*, *244*(4), 470-480. doi:10.1002/(SICI)1097-0185(199604)244:4<470::AID-AR5>3.0.CO;2-Z
80. Karin, M. (1998). New twists in gene regulation by glucocorticoid receptor: is DNA binding dispensable? *Cell*, *93*(4), 487-490. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9604923>
81. Kenny, S. E., Tam, P. K., & Garcia-Barcelo, M. (2010). Hirschsprung's disease. *Semin Pediatr Surg*, *19*(3), 194-200. doi:10.1053/j.sempedsurg.2010.03.004
82. Kong, S., Bohl, D., Li, C., & Tuan, D. (1997). Transcription of the HS2 enhancer toward a cis-linked gene is independent of the orientation, position, and distance of the enhancer relative to the gene. *Mol Cell Biol*, *17*(7), 3955-3965. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9199330>
83. Kothary, R., Clapoff, S., Darling, S., Perry, M. D., Moran, L. A., & Rossant, J. (1989). Inducible expression of an hsp68-lacZ hybrid gene in transgenic mice. *Development*, *105*(4), 707-714. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2557196
84. Kovacic, K. (2015). Current concepts in functional gastrointestinal disorders. *Curr Opin Pediatr*. doi:10.1097/MOP.0000000000000262
85. Lake, J. I., & Heuckeroth, R. O. (2013). Enteric nervous system development: migration, differentiation, and disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, *305*(1), G1-24. doi:10.1152/ajpgi.00452.2012
86. Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., . . . International Human Genome Sequencing, C. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, *409*(6822), 860-921. doi:10.1038/35057062
87. Lang, D., & Epstein, J. A. (2003). Sox10 and Pax3 physically interact to mediate activation of a conserved c-RET enhancer. *Hum Mol Genet*, *12*(8), 937-945. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12668617>
88. Laranjeira, C., & Pachnis, V. (2009). Enteric nervous system development: Recent progress and future challenges. *Auton Neurosci*, *151*(1), 61-69. doi:10.1016/j.autneu.2009.09.001
89. Laranjeira, C., Sandgren, K., Kessar, N., Richardson, W., Potocnik, A., Vanden Berghe, P., & Pachnis, V. (2011). Glial cells in the mouse enteric nervous system can undergo

- neurogenesis in response to injury. *J Clin Invest*, 121(9), 3412-3424. doi:10.1172/JCI58200
90. Laudet, V. (1997). Evolution of the nuclear receptor superfamily: early diversification from an ancestral orphan receptor. *J Mol Endocrinol*, 19(3), 207-226. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9460643>
 91. Le Douarin, N. M., & Teillet, M. A. (1973). The migration of neural crest cells to the wall of the digestive tract in avian embryo. *J Embryol Exp Morphol*, 30(1), 31-48. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4729950>
 92. Liu, J. A., Lai, F. P., Gui, H. S., Sham, M. H., Tam, P. K., Garcia-Barcelo, M. M., . . . Ngan, E. S. (2015). Identification of GLI Mutations in Patients with Hirschsprung Disease That Disrupt Enteric Nervous System Development in Mice. *Gastroenterology*. doi:10.1053/j.gastro.2015.07.060
 93. Mao, J., Kim, B. M., Rajurkar, M., Shivdasani, R. A., & McMahon, A. P. (2010). Hedgehog signaling controls mesenchymal growth in the developing mammalian digestive tract. *Development*, 137(10), 1721-1729. doi:10.1242/dev.044586
 94. Marigo, V., & Tabin, C. J. (1996). Regulation of patched by sonic hedgehog in the developing neural tube. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(18), 9346-9351. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8790332>
 95. Martianov, I., Ramadass, A., Serra Barros, A., Chow, N., & Akoulitchev, A. (2007). Repression of the human dihydrofolate reductase gene by a non-coding interfering transcript. *Nature*, 445(7128), 666-670. doi:10.1038/nature05519
 96. Mattick, J. S. (2004). RNA regulation: a new genetics? *Nat Rev Genet*, 5(4), 316-323. doi:10.1038/nrg1321
 97. Mattick, J. S. (2010). Linc-ing Long noncoding RNAs and enhancer function. *Dev Cell*, 19(4), 485-486. doi:10.1016/j.devcel.2010.10.003
 98. McKinney, M. C., Fukatsu, K., Morrison, J., McLennan, R., Bronner, M. E., & Kulesa, P. M. (2013). Evidence for dynamic rearrangements but lack of fate or position restrictions in premigratory avian trunk neural crest. *Development*, 140(4), 820-830. doi:10.1242/dev.083725
 99. Meier, K., & Brehm, A. (2014). Chromatin regulation: how complex does it get? *Epigenetics*, 9(11), 1485-1495. doi:10.4161/15592294.2014.971580
 100. Mercer, T. R., Dinger, M. E., & Mattick, J. S. (2009). Long non-coding RNAs: insights into functions. *Nat Rev Genet*, 10(3), 155-159. doi:10.1038/nrg2521
 101. Methot, D., Reudelhuber, T. L., & Silversides, D. W. (1995). Evaluation of tyrosinase minigene co-injection as a marker for genetic manipulations in transgenic mice. *Nucleic Acids Res*, 23(22), 4551-4556. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8524641>
 102. Mouse Genome Sequencing, C., Waterston, R. H., Lindblad-Toh, K., Birney, E., Rogers, J., Abril, J. F., . . . Lander, E. S. (2002). Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*, 420(6915), 520-562. doi:10.1038/nature01262

103. Muller, G., Ruppert, S., Schmid, E., & Schutz, G. (1988). Functional analysis of alternatively spliced tyrosinase gene transcripts. *EMBO J*, 7(9), 2723-2730. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3141148>
104. Mundt, E., & Bates, M. D. (2010). Genetics of Hirschsprung disease and anorectal malformations. *Semin Pediatr Surg*, 19(2), 107-117. doi:10.1053/j.sempedsurg.2009.11.015
105. Munoz, W. A., & Trainor, P. A. (2015). Neural crest cell evolution: how and when did a neural crest cell become a neural crest cell. *Curr Top Dev Biol*, 111, 3-26. doi:10.1016/bs.ctdb.2014.11.001
106. Murphy, E. M., Defontgalland, D., Costa, M., Brookes, S. J., & Wattchow, D. A. (2007). Quantification of subclasses of human colonic myenteric neurons by immunoreactivity to Hu, choline acetyltransferase and nitric oxide synthase. *Neurogastroenterol Motil*, 19(2), 126-134. doi:10.1111/j.1365-2982.2006.00843.x
107. Naar, A. M., Boutin, J. M., Lipkin, S. M., Yu, V. C., Holloway, J. M., Glass, C. K., & Rosenfeld, M. G. (1991). The orientation and spacing of core DNA-binding motifs dictate selective transcriptional responses to three nuclear receptors. *Cell*, 65(7), 1267-1279. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1648451>
108. Nagy, A., Gertsenstein, M., Vintersten, K., & Behringer, R. (2003). *Manipulating the mouse embryo, A laboratory manual, 3rd Edition*. Cold spring Harbor, New-York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
109. Naka, H., Nakamura, S., Shimazaki, T., & Okano, H. (2008). Requirement for COUP-TFI and II in the temporal specification of neural stem cells in CNS development. *Nat Neurosci*, 11(9), 1014-1023. doi:10.1038/nn.2168
110. Natarajan, D., Marcos-Gutierrez, C., Pachnis, V., & de Graaff, E. (2002). Requirement of signalling by receptor tyrosine kinase RET for the directed migration of enteric nervous system progenitor cells during mammalian embryogenesis. *Development*, 129(22), 5151-5160. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12399307>
111. Newgreen, D. F., Dufour, S., Howard, M. J., & Landman, K. A. (2013). Simple rules for a "simple" nervous system? Molecular and biomathematical approaches to enteric nervous system formation and malformation. *Dev Biol*, 382(1), 305-319. doi:10.1016/j.ydbio.2013.06.029
112. Ngan, E. S., Garcia-Barcelo, M. M., Yip, B. H., Poon, H. C., Lau, S. T., Kwok, C. K., . . . Tam, P. K. (2011). Hedgehog/Notch-induced premature gliogenesis represents a new disease mechanism for Hirschsprung disease in mice and humans. *J Clin Invest*, 121(9), 3467-3478. doi:10.1172/JCI43737
113. Nordeen, S. K. (1988). Luciferase reporter gene vectors for analysis of promoters and enhancers. *Biotechniques*, 6(5), 454-458. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2908509>
114. Nowotschin, S., & Hadjantonakis, A. K. (2014). Live imaging mouse embryonic development: seeing is believing and revealing. *Methods Mol Biol*, 1092, 405-420. doi:10.1007/978-1-60327-292-6_24

115. O'Donnell, A. M., & Puri, P. (2010). Skip segment Hirschsprung's disease: a systematic review. *Pediatr Surg Int*, 26(11), 1065-1069. doi:10.1007/s00383-010-2692-4
116. Ogawa, Y., Sun, B. K., & Lee, J. T. (2008). Intersection of the RNA interference and X-inactivation pathways. *Science*, 320(5881), 1336-1341. doi:10.1126/science.1157676
117. Ong, C. T., & Corces, V. G. (2011). Enhancer function: new insights into the regulation of tissue-specific gene expression. *Nat Rev Genet*, 12(4), 283-293. doi:10.1038/nrg2957
118. Orom, U. A., Derrien, T., Beringer, M., Gumireddy, K., Gardini, A., Bussotti, G., . . . Shiekhattar, R. (2010). Long noncoding RNAs with enhancer-like function in human cells. *Cell*, 143(1), 46-58. doi:10.1016/j.cell.2010.09.001
119. Pastorcic, M., Wang, H., Elbrecht, A., Tsai, S. Y., Tsai, M. J., & O'Malley, B. W. (1986). Control of transcription initiation in vitro requires binding of a transcription factor to the distal promoter of the ovalbumin gene. *Mol Cell Biol*, 6(8), 2784-2791. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3785213>
120. Pereira, F. A., Qiu, Y., Zhou, G., Tsai, M. J., & Tsai, S. Y. (1999). The orphan nuclear receptor COUP-TFII is required for angiogenesis and heart development. *Genes Dev*, 13(8), 1037-1049. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10215630>
121. Pichel, J. G., Shen, L., Sheng, H. Z., Granholm, A. C., Drago, J., Grinberg, A., . . . Westphal, H. (1996a). Defects in enteric innervation and kidney development in mice lacking GDNF. *Nature*, 382(6586), 73-76. doi:10.1038/382073a0
122. Pichel, J. G., Shen, L., Sheng, H. Z., Granholm, A. C., Drago, J., Grinberg, A., . . . Westphal, H. (1996b). GDNF is required for kidney development and enteric innervation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 61, 445-457. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9246473>
123. Pilon, N., Raiwet, D., Viger, R. S., & Silversides, D. W. (2008). Novel pre- and post-gastrulation expression of Gata4 within cells of the inner cell mass and migratory neural crest cells. *Dev Dyn*, 237(4), 1133-1143. doi:10.1002/dvdy.21496
124. Pusch, C. M., Sasiadek, M. M., & Blin, N. (2002). Hirschsprung, RET-SOX and beyond: the challenge of examining non-mendelian traits (Review). *Int J Mol Med*, 10(4), 367-370. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12239580>
125. Qiu, Y., Cooney, A. J., Kuratani, S., DeMayo, F. J., Tsai, S. Y., & Tsai, M. J. (1994). Spatiotemporal expression patterns of chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factors in the developing mouse central nervous system: evidence for a role in segmental patterning of the diencephalon. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(10), 4451-4455. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8183930>
126. Qiu, Y., Pereira, F. A., DeMayo, F. J., Lydon, J. P., Tsai, S. Y., & Tsai, M. J. (1997). Null mutation of mCOUP-TFI results in defects in morphogenesis of the glossopharyngeal ganglion, axonal projection, and arborization. *Genes Dev*, 11(15), 1925-1937. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9271116>
127. Ramalho-Santos, M., Melton, D. A., & McMahon, A. P. (2000). Hedgehog signals regulate multiple aspects of gastrointestinal development. *Development*, 127(12), 2763-2772. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10821773>

128. Rinn, J. L., Kertesz, M., Wang, J. K., Squazzo, S. L., Xu, X., Bruggmann, S. A., . . . Chang, H. Y. (2007). Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs. *Cell*, *129*(7), 1311-1323. doi:10.1016/j.cell.2007.05.022
129. Rothman, T. P., Tennyson, V. M., & Gershon, M. D. (1986). Colonization of the bowel by the precursors of enteric glia: studies of normal and congenitally aganglionic mutant mice. *J Comp Neurol*, *252*(4), 493-506. doi:10.1002/cne.902520406
130. Ruhrberg, C., & Schwarz, Q. (2010). In the beginning: Generating neural crest cell diversity. *Cell Adh Migr*, *4*(4), 622-630. doi:10.4161/cam.4.4.13502
131. Russell, M. B., Russell, C. A., Fenger, K., & Niebuhr, E. (1994). Familial occurrence of Hirschsprung's disease. *Clin Genet*, *45*(5), 231-235. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8076407>
132. Russell, M. B., Russell, C. A., & Niebuhr, E. (1994). An epidemiological study of Hirschsprung's disease and additional anomalies. *Acta Paediatr*, *83*(1), 68-71. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8193476>
133. Sasselli, V., Pachnis, V., & Burns, A. J. (2012). The enteric nervous system. *Dev Biol*, *366*(1), 64-73. doi:10.1016/j.ydbio.2012.01.012
134. Sato, Y., & Heuckeroth, R. O. (2008). Retinoic acid regulates murine enteric nervous system precursor proliferation, enhances neuronal precursor differentiation, and reduces neurite growth in vitro. *Dev Biol*, *320*(1), 185-198. doi:10.1016/j.ydbio.2008.05.524
135. Schuchardt, A., D'Agati, V., Larsson-Blomberg, L., Costantini, F., & Pachnis, V. (1994). Defects in the kidney and enteric nervous system of mice lacking the tyrosine kinase receptor Ret. *Nature*, *367*(6461), 380-383. doi:10.1038/367380a0
136. Selleck, M. A., & Bronner-Fraser, M. (1995). Origins of the avian neural crest: the role of neural plate-epidermal interactions. *Development*, *121*(2), 525-538. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7768190>
137. Simpson, M. J., Zhang, D. C., Mariani, M., Landman, K. A., & Newgreen, D. F. (2007). Cell proliferation drives neural crest cell invasion of the intestine. *Dev Biol*, *302*(2), 553-568. doi:10.1016/j.ydbio.2006.10.017
138. Song, J. J., & Kingston, R. E. (2008). WDR5 interacts with mixed lineage leukemia (MLL) protein via the histone H3-binding pocket. *J Biol Chem*, *283*(50), 35258-35264. doi:10.1074/jbc.M806900200
139. Southard-Smith, E. M., Angrist, M., Ellison, J. S., Agarwala, R., Baxevanis, A. D., Chakravarti, A., & Pavan, W. J. (1999). The Sox10(Dom) mouse: modeling the genetic variation of Waardenburg-Shah (WS4) syndrome. *Genome Res*, *9*(3), 215-225. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10077527>
140. Southard-Smith, E. M., Kos, L., & Pavan, W. J. (1998). Sox10 mutation disrupts neural crest development in Dom Hirschsprung mouse model. *Nat Genet*, *18*(1), 60-64. doi:10.1038/ng0198-60

141. Streit, A., & Stern, C. D. (1999). Establishment and maintenance of the border of the neural plate in the chick: involvement of FGF and BMP activity. *Mech Dev*, 82(1-2), 51-66. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10354471>
142. Stuhlmiller, T. J., & Garcia-Castro, M. I. (2012). Current perspectives of the signaling pathways directing neural crest induction. *Cell Mol Life Sci*, 69(22), 3715-3737. doi:10.1007/s00018-012-0991-8
143. Szyllberg, L., & Marszalek, A. (2014). Diagnosis of Hirschsprung's disease with particular emphasis on histopathology. A systematic review of current literature. *Prz Gastroenterol*, 9(5), 264-269. doi:10.5114/pg.2014.46160
144. Takahashi, Y., Sipp, D., & Enomoto, H. (2013). Tissue interactions in neural crest cell development and disease. *Science*, 341(6148), 860-863. doi:10.1126/science.1230717
145. Takamoto, N., You, L. R., Moses, K., Chiang, C., Zimmer, W. E., Schwartz, R. J., . . . Tsai, S. Y. (2005). COUP-TFII is essential for radial and anteroposterior patterning of the stomach. *Development*, 132(9), 2179-2189. doi:10.1242/dev.01808
146. Tansey, M. G., Baloh, R. H., Milbrandt, J., & Johnson, E. M., Jr. (2000). GFRalpha-mediated localization of RET to lipid rafts is required for effective downstream signaling, differentiation, and neuronal survival. *Neuron*, 25(3), 611-623. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10774729>
147. Taraviras, S., Marcos-Gutierrez, C. V., Durbec, P., Jani, H., Grigoriou, M., Sukumaran, M., . . . Pachnis, V. (1999). Signalling by the RET receptor tyrosine kinase and its role in the development of the mammalian enteric nervous system. *Development*, 126(12), 2785-2797. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10331988>
148. Theveneau, E., Marchant, L., Kuriyama, S., Gull, M., Moepps, B., Parsons, M., & Mayor, R. (2010). Collective chemotaxis requires contact-dependent cell polarity. *Dev Cell*, 19(1), 39-53. doi:10.1016/j.devcel.2010.06.012
149. Torchia, J., Rose, D. W., Inostroza, J., Kamei, Y., Westin, S., Glass, C. K., & Rosenfeld, M. G. (1997). The transcriptional co-activator p/CIP binds CBP and mediates nuclear-receptor function. *Nature*, 387(6634), 677-684. doi:10.1038/42652
150. Torfs, C. P. (1998). An epidemiological study of Hirschsprung disease in a multiracial
151. California population. *The Third International Meetings: Hirschsprung disease and related neurocristopathies., Evian, France.*
152. Tsai, S. Y., & Tsai, M. J. (1997). Chick ovalbumin upstream promoter-transcription factors (COUP-TFs): coming of age. *Endocr Rev*, 18(2), 229-240. doi:10.1210/edrv.18.2.0294
153. Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., Mural, R. J., Sutton, G. G., . . . Zhu, X. (2001). The sequence of the human genome. *Science*, 291(5507), 1304-1351. doi:10.1126/science.1058040
154. Wallace, A. S., Barlow, A. J., Navaratne, L., Delalande, J. M., Tauszig-Delamasure, S., Corset, V., . . . Burns, A. J. (2009). Inhibition of cell death results in hyperganglionosis:

- implications for enteric nervous system development. *Neurogastroenterol Motil*, 21(7), 768-e749. doi:10.1111/j.1365-2982.2009.01309.x
155. Wang, K. C., & Chang, H. Y. (2011). Molecular mechanisms of long noncoding RNAs. *Mol Cell*, 43(6), 904-914. doi:10.1016/j.molcel.2011.08.018
 156. Wang, K. C., Helms, J. A., & Chang, H. Y. (2009). Regeneration, repair and remembering identity: the three Rs of Hox gene expression. *Trends Cell Biol*, 19(6), 268-275. doi:10.1016/j.tcb.2009.03.007
 157. Wang, K. C., Yang, Y. W., Liu, B., Sanyal, A., Corces-Zimmerman, R., Chen, Y., . . . Chang, H. Y. (2011). A long noncoding RNA maintains active chromatin to coordinate homeotic gene expression. *Nature*, 472(7341), 120-124. doi:10.1038/nature09819
 158. Wang, L. H., Tsai, S. Y., Cook, R. G., Beattie, W. G., Tsai, M. J., & O'Malley, B. W. (1989). COUP transcription factor is a member of the steroid receptor superfamily. *Nature*, 340(6229), 163-166. doi:10.1038/340163a0
 159. Wang, X., Arai, S., Song, X., Reichart, D., Du, K., Pascual, G., . . . Kurokawa, R. (2008). Induced ncRNAs allosterically modify RNA-binding proteins in cis to inhibit transcription. *Nature*, 454(7200), 126-130. doi:10.1038/nature06992
 160. Wang, Y. T., Kwok, K. F., Tan, S. M., Yek, M. H., Ong, W. C., Barbier, S., & Ng, B. Y. (2015). Comprehensive psychological intervention to improve outcome in functional gastrointestinal disorder: a cohort study. *Singapore Med J*, 56(7), 385-392. doi:10.11622/smedj.2015109
 161. Watson, S., Serrate, C., & Vignot, S. (2010). [Sonic Hedgehog signaling pathway: from embryology to molecular targeted therapies]. *Bull Cancer*, 97(12), 1477-1483. doi:10.1684/bdc.2010.1231
 162. Wattchow, D., Brookes, S., Murphy, E., Carbone, S., de Fontgalland, D., & Costa, M. (2008). Regional variation in the neurochemical coding of the myenteric plexus of the human colon and changes in patients with slow transit constipation. *Neurogastroenterol Motil*, 20(12), 1298-1305. doi:10.1111/j.1365-2982.2008.01165.x
 163. Werner, T., Hammer, A., Wahlbuhl, M., Bosl, M. R., & Wegner, M. (2007). Multiple conserved regulatory elements with overlapping functions determine Sox10 expression in mouse embryogenesis. *Nucleic Acids Res*, 35(19), 6526-6538. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17897962
 164. Weston, J. A., & Thiery, J. P. (2015). Pentimento: Neural Crest and the origin of mesectoderm. *Dev Biol*, 401(1), 37-61. doi:10.1016/j.ydbio.2014.12.035
 165. Wu, J. J., Chen, J. X., Rothman, T. P., & Gershon, M. D. (1999). Inhibition of in vitro enteric neuronal development by endothelin-3: mediation by endothelin B receptors. *Development*, 126(6), 1161-1173. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10021336>
 166. Yamaguchi, H., Zhou, C., Lin, S.-C., Durand, B., Tsai, S. Y., & Tsai, M.-J. (2004). The nuclear orphan receptor COUP-TFI is important for differentiation of oligodendrocytes. *Developmental Biology*, 266(2), 238-251. doi:10.1016/j.ydbio.2003.10.038

167. Yang, J. T., Liu, C. Z., Villavicencio, E. H., Yoon, J. W., Walterhouse, D., & Iannaccone, P. M. (1997). Expression of human GLI in mice results in failure to thrive, early death, and patchy Hirschsprung-like gastrointestinal dilatation. *Mol Med*, 3(12), 826-835. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9440116>
168. Yntema, C. L., & Hammond, W. S. (1954). The origin of intrinsic ganglia of trunk viscera from vagal neural crest in the chick embryo. *J Comp Neurol*, 101(2), 515-541. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13221667>
169. Young, H. M., Bergner, A. J., Anderson, R. B., Enomoto, H., Milbrandt, J., Newgreen, D. F., & Whittington, P. M. (2004). Dynamics of neural crest-derived cell migration in the embryonic mouse gut. *Dev Biol*, 270(2), 455-473. doi:10.1016/j.ydbio.2004.03.015
170. Young, H. M., Bergner, A. J., & Muller, T. (2003). Acquisition of neuronal and glial markers by neural crest-derived cells in the mouse intestine. *J Comp Neurol*, 456(1), 1-11. doi:10.1002/cne.10448
171. Young, H. M., Hearn, C. J., Ciampoli, D., Southwell, B. R., Brunet, J. F., & Newgreen, D. F. (1998). A single rostrocaudal colonization of the rodent intestine by enteric neuron precursors is revealed by the expression of Phox2b, Ret, and p75 and by explants grown under the kidney capsule or in organ culture. *Dev Biol*, 202(1), 67-84. doi:10.1006/dbio.1998.8987
172. Young, H. M., Turner, K. N., & Bergner, A. J. (2005). The location and phenotype of proliferating neural-crest-derived cells in the developing mouse gut. *Cell Tissue Res*, 320(1), 1-9. doi:10.1007/s00441-004-1057-5
173. Zhang, Y., Zhang, X. O., Chen, T., Xiang, J. F., Yin, Q. F., Xing, Y. H., . . . Chen, L. L. (2013). Circular intronic long noncoding RNAs. *Mol Cell*, 51(6), 792-806. doi:10.1016/j.molcel.2013.08.017
174. Zhao, J., Sun, B. K., Erwin, J. A., Song, J. J., & Lee, J. T. (2008). Polycomb proteins targeted by a short repeat RNA to the mouse X chromosome. *Science*, 322(5902), 750-756. doi:10.1126/science.1163045
175. Zhou, C., Qiu, Y., Pereira, F. A., Crair, M. C., Tsai, S. Y., & Tsai, M. J. (1999). The nuclear orphan receptor COUP-TFI is required for differentiation of subplate neurons and guidance of thalamocortical axons. *Neuron*, 24(4), 847-859. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10624948>
176. Zhou, C., Tsai, S. Y., & Tsai, M. J. (2001). COUP-TFI: an intrinsic factor for early regionalization of the neocortex. *Genes Dev*, 15(16), 2054-2059. doi:10.1101/gad.913601
177. Zhu, L., Lee, H. O., Jordan, C. S., Cantrell, V. A., Southard-Smith, E. M., & Shin, M. K. (2004). Spatiotemporal regulation of endothelin receptor-B by SOX10 in neural crest-derived enteric neuron precursors. *Nat Genet*, 36(7), 732-737. doi:10.1038/ng1371