

Université de Montréal

**Analyse du rôle de la paire de gènes *K12/Nr2f1* dans la
gliogenèse du système nerveux entérique.**

par Baptiste CHARRIER.

Département de biochimie et médecine moléculaire.

Faculté de Médecine.

Mémoire présenté

en vue de l'obtention du grade de M.sc

en Biologie moléculaire

option Maladies complexes chez l'humain

Janvier 2018.

© Charrier, 2018.

Résumé

Les souris Spot qui sont un modèle pour le syndrome de Waardenburg couplé à la maladie de Hirschprung souffrent d'un manque de cellules dérivées de la crête neurale (CCN) incluant les neurones myentériques ainsi que les mélanocytes de la peau et du vestibule. La paire de gènes *Nr2f1* et *A830082k12Rik* (K12) est significativement surexprimée dans les CCN entériques (CCNe) des embryons Spot. De plus, les CCNe des embryons Spot se différencient prématurément en cellules gliales au détriment des progéniteurs non différenciés. Plusieurs études récentes suggèrent que de nombreux cas de maladie de Hirschprung pourraient être expliqués par une différenciation gliale précoce des CCNe induite par Sonic Hedgehog (SHH). Notre premier objectif est donc de déterminer si et comment le facteur de transcription *Nr2f1* et son paralogue *Nr2f2* sont impliqués dans la gliogenèse induite par SHH. Notre second objectif est de déterminer si le lncRNA *K12* est capable de réguler un gène voisin en cis. Nous avons observé que le traitement de cellules P19 (modèle de cellules souches embryonnaires de souris) avec SHH induit effectivement l'expression de *Nr2f1* et *Nr2f2* (mesurée par RT-PCR) ainsi que celle de plusieurs marqueurs gliaux. De plus, le knock-down de *Nr2f1/2* dans les CCN entériques semble effectivement bloquer la gliogenèse entérique. D'autre part, nos premières analyses du lncRNA *A830082k12Rik* montre qu'il est capable de réguler la transcription d'un gène voisin en cis. Le facteur de transcription NR2F1 semble être un facteur clé dans la gliogenèse entérique. Une meilleure compréhension de ses mécanismes d'action ainsi que des voies de signalisation impliqués dans sa régulation semble donc indispensable pour mieux comprendre cette étape clé du développement du système nerveux entérique.

Mots-clés : Système nerveux entérique, Cellules de la crête neurale, Gliogenèse, lncRNA.

Abstract

The Spot mouse line is a model for Waardenburg syndrome associated with Hirschsprung's disease (Waardenburg syndrome type 4). Spot mice suffer from a lack of neural crest cell (NCC)-derived cells including myenteric neurons in the colon and melanocytes in the skin and vestibule. The *Nr2f1-A830082K12Rik (K12)* gene pair is significantly overexpressed in enteric NCC (ENCC) of Spot embryos. In addition, ENCC of Spot embryos prematurely differentiate into glial cells at the expense of undifferentiated progenitors. Several recent studies suggest that some cases of Hirschsprung's disease could be explained by an early glial differentiation of ENCC induced by Sonic Hedgehog (SHH). Our first goal is therefore to determine if and how NR2F1 transcription factor and its paralog NR2F2 are involved in the SHH-induced gliogenesis. Our second goal is to determine if the lncRNA *K12* is able to regulate a neighboring gene in *cis*. We have observed that treatment of P19 cells (mouse embryonic stem cell model) with SHH effectively induces the expression of *Nr2f1* and *Nr2f2* (measured by RT-PCR) as well as several glial markers. In addition, knockdown of *Nr2f1/2* in ENCC appears to effectively block enteric gliogenesis. On the other hand, our first analysis of *K12* shows that this lncRNA is able to regulate the transcription of a neighboring gene in *cis*. NR2F1 transcription factor appears to be a key factor in enteric gliogenesis. A better understanding of its mechanisms of action as well as the signaling pathways involved in its regulation therefore seems essential to better understand this key stage of the development of the enteric nervous system.

Keywords : Enteric Nervous System ; Neural Crest Cells; Gliogenesis; lncRNA.

Table des matières

Résumé	i
Abstract	ii
Table des matières	iii
Liste des tableaux.....	v
Liste des figures.....	vi
Liste des sigles et des abréviations.	viii
CHAPITRE 1: INTRODUCTION.....	2
1.1 Le système nerveux entérique.....	2
1.1.1 Structure et fonction du système nerveux entérique.....	2
1.1.2 Les cellules gliales entériques.....	3
1.1.3 Origine et développement embryonnaire du système nerveux entérique	5
1.2 La lignée de souris <i>Spot</i> comme modèle pour étudier la gliogenèse dans le système nerveux entérique.....	9
1.2.1 Description de la lignée de souris transgénique <i>Spot</i>	9
1.2.2 Les facteurs de transcriptions NR2F1/2 dans la gliogenèse	14
1.2.3 Différentiation des cellules de la crête neurale entériques.....	15
1.3 Le long ARN non codant <i>A830082k12Rik (K12)</i>	19
CHAPITRE 2: HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS.....	24

<u>Objectif 1</u> : Déterminer si l'activation de la voie Sonic Hedgehog induit la différenciation gliale entérique via les facteurs de transcriptions NR2F1/NR2F2.....	25
<u>Objectif 2</u> : Évaluer l'activité régulatrice du lncRNA <i>A830082K12Rik</i> dans des essais luciférase en récapitulant l'organisation génomique de la paire de gène <i>Nr2f1/A830082k12Rik</i>	26
CHAPITRE 3: MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	27
CHAPITRE 4: RÉSULTATS.....	35
4.1 Sonic Hedgehog et NR2F1/NR2F2 dans la différenciation gliale.	35
4.1.1 Induction <i>in vitro</i> de l'expression de <i>Nr2f1</i> , <i>Nr2f2</i> et de plusieurs marqueurs gliaux par Sonic Hedgehog dans des cellules P19.....	35
4.1.2 Une diminution de l'expression de <i>Nr2f1</i> et de <i>Fabp7</i> dans les CCNe à e13.5 est observée après 48 heures de culture en présence de cyclopamine.....	37
4.1.3 Blocage de la différenciation gliale entérique par le knock-down <i>ex vivo</i> de <i>Nr2f1</i> et <i>Nr2f2</i> . 38	
4.2 Le lncRNA <i>A830082K12Rik</i> (<i>K12</i>) est capable de réguler un gène voisin en <i>cis</i>	40
CHAPITRE 5: DISCUSSION	42
CHAPITRE 6: CONCLUSION.....	49
Bibliographie.....	i

Liste des tableaux

Tableau I : Extrait du RNAseq Spot ^{Tg/Tg} vs control à partir des CCN entériques à e12.5.	14
Tableau II : shRNA utilisés pour l'expérience de knock-down de Nr2f1/2.	31
Tableau III : Anticorps utilisés pour l'expérience d'immunofluorescence	31
Tableau IV : Oligos utilisés pour les expériences de PCR et de qPCR.	34

Liste des figures

Figure 1.1 : Formation de la crête neurale	6
Figure 1.2 : Colonisation du tube digestif par les cellules de la crête neurale.....	7
Figure 1.3 : Différentiation des CCN entériques en neurones et en cellules gliales lors de la formation du SNE	8
Figure 1.4 : Génération de la lignée Spot par mutation insertionnelle aléatoire.....	10
Figure 1.5 : Phénotype de la lignée Spot par mutation insertionnelle aléatoire.	12
Figure 1.6 : Les CCN entériques des embryons Spot ^{Tg/Tg} se différencient prématurément en cellules gliales au détriment des progéniteurs non différenciés.....	13
Figure 1.7 : Représentation schématique de la voie Hedgehog.....	18
Figure 1.7 : Catégories de lncRNA en fonction leur position par rapport au gène cible..	20
Figure 1.8 : Organisation du locus de <i>Nr2f1/A830082K12Rik</i>	21
Figure 1.10 : K12 n'active pas la transcription de <i>Nr2f1</i> en trans.....	22
Figure 1.10 : Exemples de régulation en cis par des lncRNA..	23
Figure 3.1 : Production de vecteurs lentiviraux.....	30
Figure 3.2 : Constructions utilisées lors des essais luciférases.....	33
Figure 4.1 : Sonic Hedgehog semble activer la transcription de <i>Nr2f1</i> , <i>Nr2f2</i> et de plusieurs marqueurs gliaux dans des P19.....	36
Figure 4.2 : L'inhibition de la voie Sonic Hedgehog par la cyclopamine semble diminuer l'expression de <i>Nr2f1</i> et <i>Fabp7</i> dans les CCN.....	37
Figure 4.3 : Le knock-down <i>ex-vivo</i> de <i>Nr2f1</i> et <i>Nr2f2</i> par shRNA semble empêcher la différenciation gliale.....	39
Figure 4.4 : <i>K12</i> a un effet en cis sur la transcription d'un gène voisin.	41

Figure 5.1 : Un des transcrit *K12* possède l'organisation caractéristique d'un SINEUP. 48

Liste des sigles et des abréviations.

CBP : CREB binding protein

CCN: Cellules de la crête neurale

CCNe: Cellules de la crête neurale entérique

CGE: Cellules gliales entérique

CSPN: Cellule souches/progénitrices neurales

FABP7: Fatty acid binding protein 7

FACS: Fluorescence activated cell sorting

HH: Hedgehog

MPZ: Myelin protein zero

NR2F1: Nuclear receptor 2 family 1

NR2F1: Nuclear receptor 2 family 2

PLP1: Proteolipid protein 1

PTCH: Patched

S100 β : S100 calcium-binding protein B

SHH: Sonic Hedgehog

SMO: Smoothened

SNC: Système nerveux central

SNE: Système nerveux entérique

SOX10: SRY-related HMG-box 10 protein

SRC1: Steroid coactivator 1

SUFU: Suppressor of fused

CHAPITRE 1: INTRODUCTION

1.1 Le système nerveux entérique

1.1.1 Structure et fonction du système nerveux entérique

Le Système nerveux entérique (SNE) se trouve à l'intérieur de la paroi gastro-intestinale sur tout le long du tube digestif et constitue la division la plus complexe du système nerveux périphérique. Bien qu'il fonctionne en synergie avec le système nerveux central (SNC) pour contrôler de nombreuses fonctions gastro-intestinales, le SNE peut aussi fonctionner indépendamment du SNC et c'est la raison pour laquelle il est parfois qualifié de « second cerveau » (Furness, 2012; Neunlist et al., 2013). Le SNE contient un grand nombre de neurones entériques et de cellules gliales qui sont majoritairement regroupées en ganglions distribués sur 2 plexus nerveux interconnectés. Le plexus myentérique ou plexus d'Auerbach est situé entre les parois de muscle longitudinale et circulaire de la paroi du tube digestif et innerve ces deux couches musculaires afin de contrôler le péristaltisme. Le second plexus, le plexus sous-muqueux, ou plexus de Meissner, se trouve sous la muqueuse épithéliale et est impliqué dans diverses fonctions sensorielles ainsi que dans le contrôle des cellules épithéliales et de la régulation de la circulation sanguine gastro-intestinale (Furness, Callaghan, Rivera et Cho, 2014).

Tout comme le SNC, le SNE est composé d'une grande diversité de neurones. Il existe 3 grandes classes de neurones entériques qui sont : neurones sensitifs (ou neurones afférents primaires intrinsèques), interneurones et neurones moteurs (Furness, 2012). Les neurones sensitifs dans la muqueuse et les muscles possèdent différents types de récepteurs leurs permettant de répondre à des stimuli mécaniques, thermiques, osmotiques, et chimiques. Les

interneurones intègrent l'information sensorielle provenant des neurones sensitifs et l'envoi aux neurones moteurs. Les neurones moteurs interagissent ensuite avec les cellules des muscles de la paroi gastro-intestinale et d'autres cellules effectrices pour contrôler la motilité intestinale, la circulation sanguine et l'activité sécrétrice de l'épithélium. Les neurones entériques moteurs constituent une population hétérogène qui peut être sous-divisée en 5 classes de sous-types neuronaux : neurones excitateurs ou inhibiteurs des muscles intestinaux, neurones sécrétomoteurs/vasodilatateur, neurones sécrétomoteurs non vasodilatateur et neurones innervant les cellules entéroendocrines (Furness, 2000).

1.1.2 Les cellules gliales entériques

Présentes en quantité équivalente et même supérieure dépendamment des espèces, les cellules gliales entériques (CGE) ont longtemps été considérées comme n'ayant qu'un rôle passif de support nourricier et structural pour les neurones entériques. Aujourd'hui, elles sont cependant reconnues comme étant essentielles pour pratiquement toutes les fonctions gastro-intestinales contrôlées par le SNE. L'importance des cellules gliales dans le SNE est notamment soulignée dans une multitude de pathologies digestive (p. ex. colite ulcéreuse, maladie de Crohn, gastro-entérite, constipation de transit) et extra-digestive (p. ex. la maladie de Parkinson et l'obésité) qui sont associées à une altération des cellules gliales entériques (Grubisic et Gulbransen, 2016; Neunlist et al., 2014; Sharkey, 2015).

Comme elles proviennent de la crête neurale, tout comme les cellules de Schwann, les CGE ont initialement été considérées comme étant les cellules de Schwann du tube digestif avant que l'analyse détaillée de leur morphologie ainsi que de leur relation avec les neurones ne révèle plus tard que les cellules gliales entériques sont en fait plus proches des astrocytes (Gabella,

1971). Plus récemment des études ont montré que les CGE ont en fait leur propre profil de transcription et partagent des points communs avec (par ordre d'importance) la signature des cellules de Schwann, des oligodendrocytes et des astrocytes (Rao et al., 2015). Ce profil hybride est très probablement aussi le reflet de l'hétérogénéité au sein des cellules gliales entériques. Par exemple, alors que la plupart des CGE co-expriment SOX10, PLP1 et S100 β , seulement une partie exprime aussi GFAP (Rao et al., 2015). D'autres études se concentrant sur la diversité des cellules gliales entériques ont mené à l'identification de 4 types spécifiques de CGE en se basant sur leur morphologie et leur localisation au sein des différentes couches du tube digestif : les « gliocytes protoplasmiques » en forme d'étoile au sein des ganglions myentériques (type I), les « gliocytes fibreux » de forme allongée qui se situent dans les fibres nerveuses (type II), les gliocytes de la muqueuse et intramusculaires avec 4 prolongement primaires (type III) et les gliocytes bipolaires intramusculaires (Boesmans, Lasrado, Vanden Berghe et Pachnis, 2015) (Gulbransen et Sharkey, 2012) (Figure 1.3). Il n'a pas encore été déterminé clairement si ces différents types de CGE ont un rôle fonctionnel distinct. Cependant certaines observations comme des différences au niveau des transients de calcium ou de l'expression de certains récepteurs suggèrent fortement que ces différents types de CGE sont fonctionnellement distinct (Boesmans et al., 2015; Neunlist et al., 2013).

Une autre caractéristique unique et intéressante des cellules gliales entériques est leur remarquable plasticité. En effet, il a été démontré qu'elles possèdent un potentiel neurogénique *in vitro* et *in vivo* bien qu'elles demeurent toutefois restreintes à leur identité gliale dans leur environnement d'origine (c.-à-d. le système nerveux entérique) (Joseph et al., 2011; Laranjeira et al., 2011). Une meilleure compréhension des conditions et des facteurs impliqués dans la

plasticité des CGEs pourrait potentiellement ouvrir la voie au développement de nouvelles thérapies cellulaires pour de nombreuses pathologies (Grubisic et Gulbransen, 2016).

1.1.3 Origine et développement embryonnaire du système nerveux entérique

Les neurones et cellules gliales entériques dérivent des cellules de la crête neurale (CCN), provenant de l'extrémité dorsale du tube neural (Figure 1.1). Ces cellules qui sont propres aux vertébrés sont caractérisées par leur capacité de migration et leur multipotence. En effet, lors du développement embryonnaire, elles vont migrer à partir du tube neural afin de coloniser différentes régions et générer de nombreux types cellulaires différents. De cette façon, les CCN sont à l'origine de structures et de types cellulaires très variés comme les neurones et les cellules gliales périphériques, les mélanocytes (cellules pigmentaires), une grande partie du cartilage et des os du visage mais aussi certains sous-types cellulaires spécifiques du cœur, de l'oreille interne et du thymus. Cette population de cellules est divisée en plusieurs sous-populations dépendamment de leur origine le long de l'axe antéro-postérieur du tube neural : crâniale, cardiaque, vagale, troncale, et sacrale. La grande majorité des progéniteurs du SNE, aussi appelés CCN entériques (CCNe), proviennent de la région vagale (Bergeron, Silversides et Pilon, 2013) (Figure 1.2). L'autre partie provient de la région sacrale ainsi que des précurseurs des cellules de Schwann dérivés des CCN qui se trouvent dans les fibres nerveuses extrinsèque de l'intestin en développement (Burns, Champeval et Le Douarin, 2000; Uesaka, Nagashimada et Enomoto, 2015).

Chez la souris, les CCN d'origine vagale commencent à migrer dans le mésenchyme de l'œsophage en développement au jour embryonnaire (e) 9.5 puis migrent en direction rostro-

caudale pour atteindre l'intestin postérieur à e14.5, au même moment environ que les CCNe qui proviennent de la région sacrale et des précurseurs des cellules de Schwann.

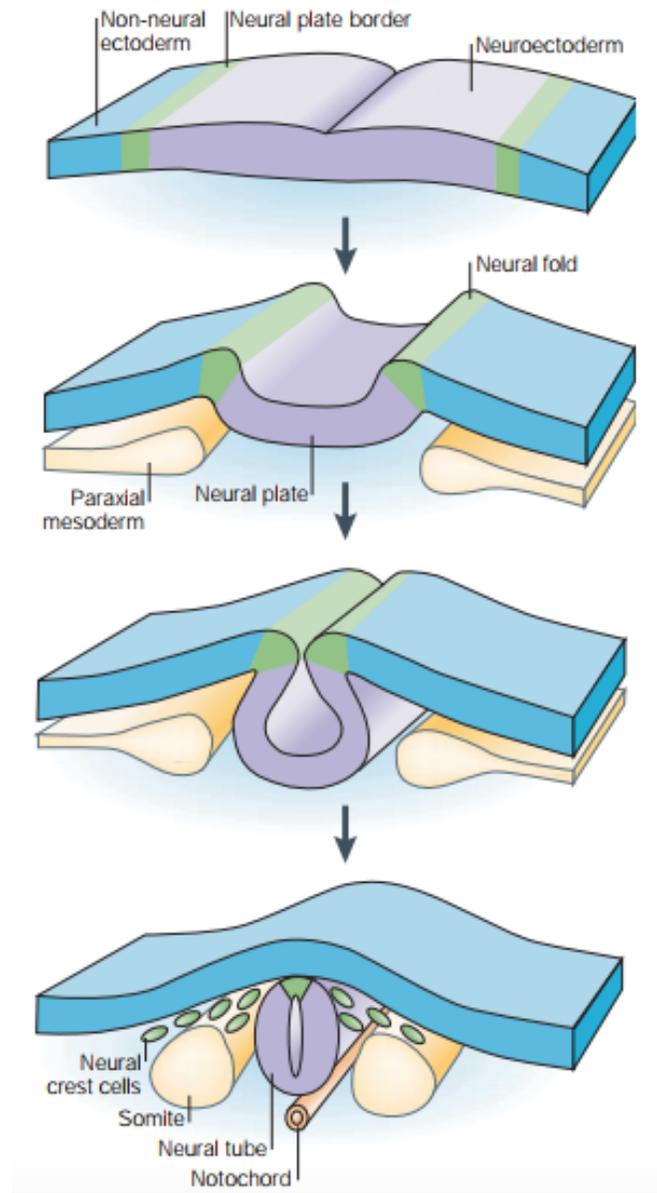


Figure 1.1 : Formation de la crête neurale. Lors de la neurulation les bords de la plaque neurale (violet) s'élèvent pour former les replis neuraux. Les replis neuraux vont ensuite se rapprocher en poussant la plaque neurale à s'enrouler sur elle-même pour former le tube neural. Une partie des cellules de la crête neurale va contribuer à la formation du tube neural tandis que l'autre partie va se détacher pour migrer dans tout l'embryon. Adaptée de (Gammill et Bronner-Fraser, 2003).

La différenciation des CCNe commence dès leur entrée dans l'intestin en développement et, comme dans d'autres divisions du système nerveux, la gliogenèse débute peu après que la neurogenèse ait commencé (Pham, Gershon et Rothman, 1991; Rothman, Tennyson et Gershon, 1986; Young, Bergner et Muller, 2003). Chez la souris les précurseurs de neurones peuvent être détectés dès e10-10.5 juste derrière le front de migration des CCNe d'origine vagale alors que les précurseurs de cellules gliales ne peuvent pas être détectés avant e11.5-e12 (Young et al., 2003) (Figure 1.3). Bien que les marqueurs pouvant distinguer les CCNe non différenciées et les précurseurs neuronaux ou gliaux à différents stades du développement soient aujourd'hui bien connus, les mécanismes contrôlant la différenciation des CCNe ne sont pas encore bien décrits (Goldstein, Hofstra et Burns, 2013; Hao et Young, 2009; Lake et Heuckeroth, 2013).

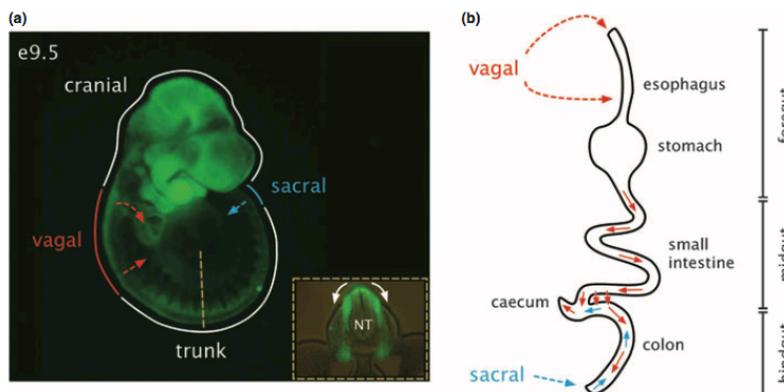


Figure 1.2 : Colonisation du tube digestif par les CCN. (a) Les cellules de la crête neurale (vert) sont divisées en plusieurs sous-populations dépendamment de leur origine le long de l'axe antéro-postérieur du tube neural : crâniale, cardiaque, vagale, troncale, et sacrale. (b) La grande majorité des progéniteurs du SNE, aussi appelés CCN entériques (CCNe), proviennent de la région vagale qui entre dans le tube digestif puis migrent en direction rostro-caudale afin de coloniser le tube digestif. L'autre partie provient de la région sacrale ainsi que des précurseurs des cellules de Schwann dérivés des CCN qui se trouvent dans les fibres nerveuses extrinsèque de l'intestin en développement non représentés sur cette image. Adaptée de (Bergeron et al., 2013)

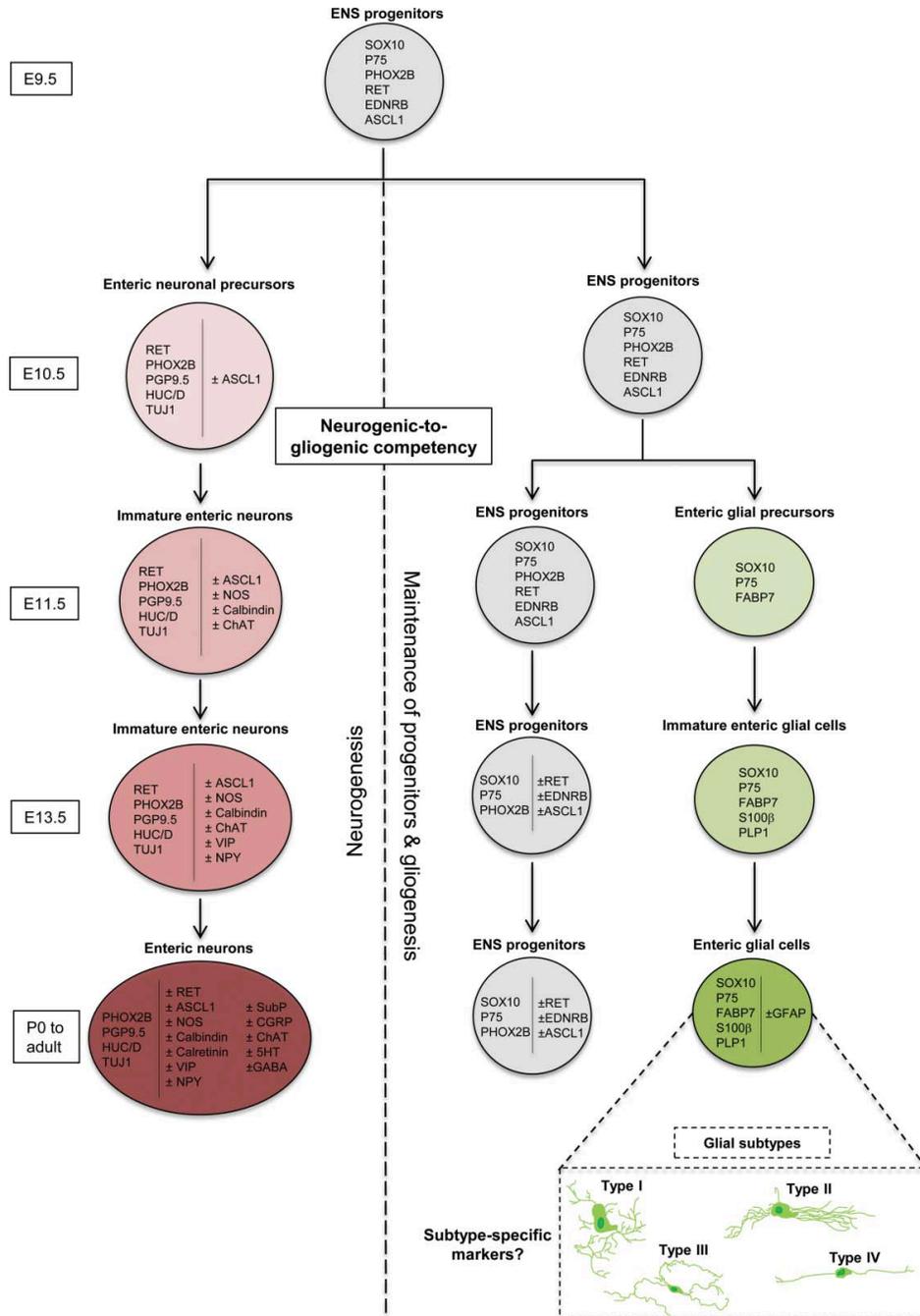


Figure 1.3 : Différentiation des CCN entériques en neurones et en cellules gliales lors de la formation du SNE. (a) Peu après leur arrivée dans l'œsophage à e9.5, une partie des progéniteurs du SNE commencent à se différencier en neurones alors que la majorité est maintenue dans un état indifférencié et continue de proliférer. La compétence d'une partie des progéniteurs à se différencier en cellules gliales n'est acquise qu'à partir de e11.5. À partir de e.15,5 la colonisation de tube digestif est complétée mais la différenciation gliale et neuronale continue jusqu'à la naissance et pendant une courte période post-natale. Adaptée de (Charrier et Pilon, 2017).

1.2 La lignée de souris *Spot* comme modèle pour étudier la gliogenèse dans le système nerveux entérique.

1.2.1 Description de la lignée de souris transgénique *Spot*.

Notre laboratoire a généré plusieurs lignées de souris transgénique par mutation insertionnelle aléatoire dans le but de trouver de nouveaux gènes impliqués dans le développement des CCN. L'approche qui a été utilisée est basée sur le fait que la pigmentation est contrôlée par la sécrétion de pigments de mélanine par les mélanocytes, qui sont dérivés des CCN, et que les souris FVB albinos sont dépourvues de pigmentation dû à l'inactivation du gène qui code pour la tyrosinase (*Tyr*), l'enzyme clé dans la production de mélanine (Yokoyama et al., 1990). Lorsqu'un transgène qui contient un enhancer, le promoteur et la séquence d'ADN complémentaire de la tyrosinase est micro-injecté dans un embryon FVB, le sauvetage de la pigmentation peut donc servir de marqueur pour la transgénèse (Methot, Reudelhuber et Silversides, 1995). En effet, si à la naissance les souriceaux sont albinos c'est que la transgénèse n'a pas fonctionné alors qu'une pigmentation uniforme est le signe que la transgénèse a été efficace. Toutefois, lorsque le gène *Tyr* s'insère dans un locus important pour le développement des CCN, le sauvetage de la pigmentation n'est pas uniforme à cause d'un manque de mélanocytes dérivé des CCN dans l'épiderme. Dans ce cas, le défaut de pigmentation est le signe que l'insertion du transgène a perturbé un gène important pour le développement des mélanocytes et donc pour le développement des CCN. Cette approche permet donc d'utiliser la pigmentation comme un marqueur de transgénèse mais aussi pour identifier des anomalies dans le développement des CCN (Pilon, 2016) (Figure 1.4). Cette méthode a ainsi permis d'obtenir

cinq lignées transgéniques hypopigmentées sur un total de 200 lignées générées. La lignée Spot qui sera discuté dans ce mémoire est l'une de ces lignées.

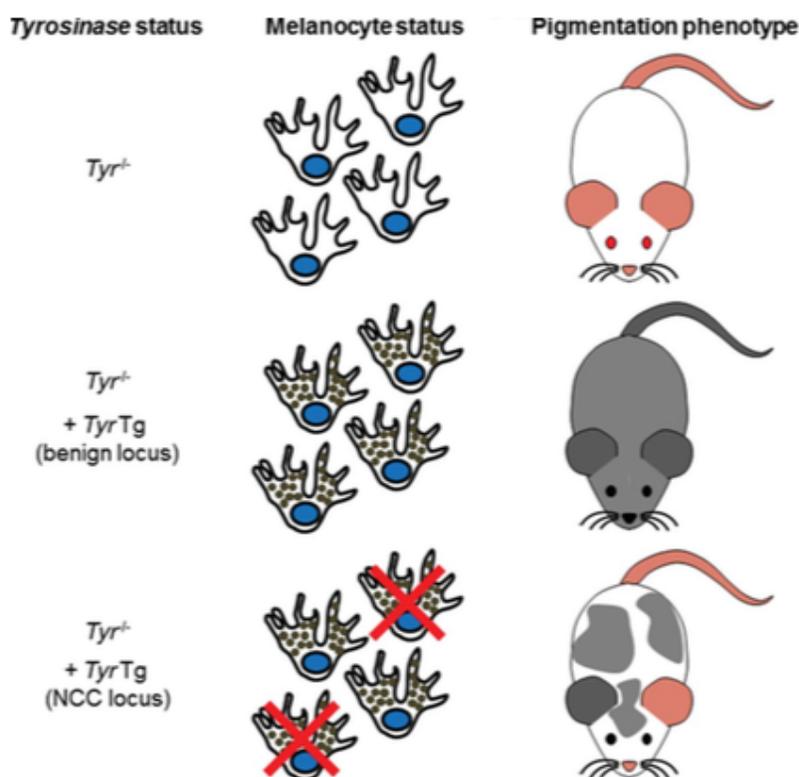


Figure 1.4 : Génération de la lignée Spot par mutation insertionnelle aléatoire. Les souris FVB albinos sont dépigmentées à cause d'une mutation dans le gène de la tyrosinase (*Tyr*). La réintroduction d'un gène fonctionnel de la tyrosinase par transgénèse peut sauver le phénotype albinos. Si la pigmentation induite par le gène de la tyrosinase est uniforme, alors le gène ne s'est pas inséré dans un locus important pour le développement des CCN. Si la pigmentation n'est pas uniforme, alors le gène de la *Tyr* s'est inséré dans un locus important pour le développement des CCN. Adaptée de (Pilon, 2016).

Les souris Spot hétérozygotes ($Spot^{Tg/+}$) sont majoritairement blanches avec de larges taches grises claires et ont les yeux pigmentés (Figure 1.5). Les taches apparaissent plus foncées lorsque la mutation Spot est dans le fond génétique G4-GFP ou -RFP, lignée dont les CCN sont marquées de manière endogène grâce à l'expression de la GFP ou de la RFP sous le contrôle du

promoteur de *Gata4* (Pilon, Raiwet, Viger et Silversides, 2008). Les souris Spot homozygotes ($Spot^{Tg/Tg}$) ont également d'autres phénotypes complètement pénétrant dont l'absence totale de pigmentation au niveau du pelage, un comportement de « tournis » hyperactif ainsi que les marques caractéristiques de mégacôlon aganglionnaire chez les rongeurs (c.-à-d. retard de croissance, léthargie, posture courbée, abdomen gonflé et mort prématurée) (Figure 1.5). Au sevrage on peut observer une importante accumulation de matière fécale dans le colon proximal et le cæcum, un blocage dans le colon distal ainsi qu'un manque de ganglions myentériques dans cette région ce qui confirme le mégacôlon aganglionnaire (Figure 1.5). Au sevrage, les souris $Spot^{Tg/Tg}$ ont donc un phénotype très similaire aux personnes atteintes du syndrome de Waardenburg couplé à la maladie de Hirschprung: elles sont dépigmentées et présentent des défauts d'orientation spatiale combinés à un mégacôlon aganglionnaire (Bergeron et al., 2016). Une partie des $Spot^{Tg/Tg}$ meurent toutefois peu après la naissance (P1-P2) probablement dû à l'incapacité à se nourrir correctement comme le suggère la quantité réduite de lait dans leur estomac ainsi que l'analyse des nerfs crâniens impliqués dans la succion et la déglutition. En effet, une connexion anormale entre le nerf spinal I et le nerf crânien XII (hypoglossal) a été observée dans 71% des embryons $Spot^{Tg/Tg}$ testés (Bergeron et al., 2016).

Les analyses embryonnaires ont révélé une origine commune pour ces différents problèmes : un manque de dérivés des CCN incluant les neurones myentériques et les mélanocytes de la peau et de l'oreille interne. Dans ce mémoire, nous nous intéresserons uniquement au défaut au niveau du SNE. La mutation *Spot* affecte négativement la migration et la prolifération des CCN en cause de leur différenciation prématurée en cellules gliales (Bergeron et al., 2016) (Figure 1.6).

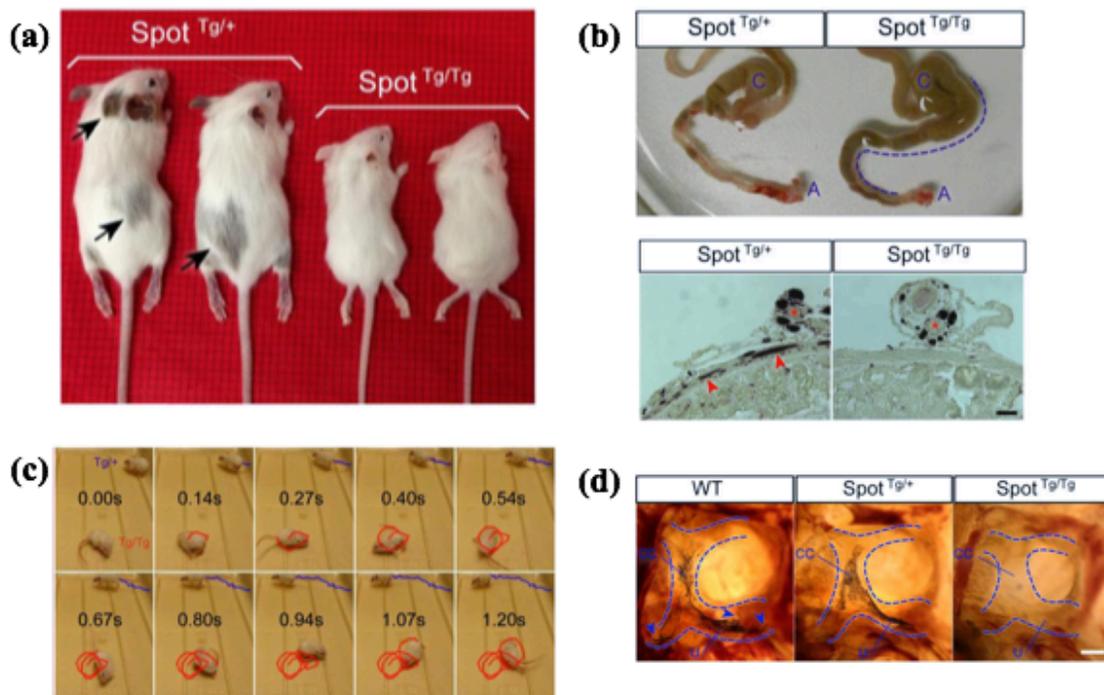


Figure 1.5 : Phénotype de la lignée Spot. (a) Au sevrage les souris Spot sont majoritairement blanches avec de grosse taches grises claires. Les souris Spot homozygotes sont plus petite et complètement dépigmentée. (b) Les souris Spot^{Tg/Tg} développent un mégacôlon aganglionnaire causé par l'absence de ganglions myentérique (flèches). (c et d) Les souris Spot^{Tg/Tg} présente un défaut au niveau de l'oreille interne caractérisé par un comportement de « circling » hyperactif associé à l'absence de mélanocyte dans le vestibule. Adaptée de (Bergeron et al., 2016).

L'absence de neurones myentériques dans le colon des souris Spot^{Tg/Tg} est due au fait que les CCNe des embryons Spot^{Tg/Tg} se différencient prématurément en cellules gliales au détriment des progéniteurs non-différenciés (Figure 1.6). Ce phénotype est causé par la perturbation d'un élément répresseur causée par l'insertion du transgène, ce qui mène à la surexpression du gène codant pour *Nr2f1* et son long ARN non codant antisens *A830083k12Rik* spécifiquement dans les CCN entériques (Tableau I). La surexpression de *Nr2f1* dans les CCN a révélé que le gain de *Nr2f1* peut causer une aganglionose indépendamment de *A830083k12Rik* ce qui a permis de conclure que le facteur de transcription NR2F1 possède un rôle clé dans la gliogenèse entérique.

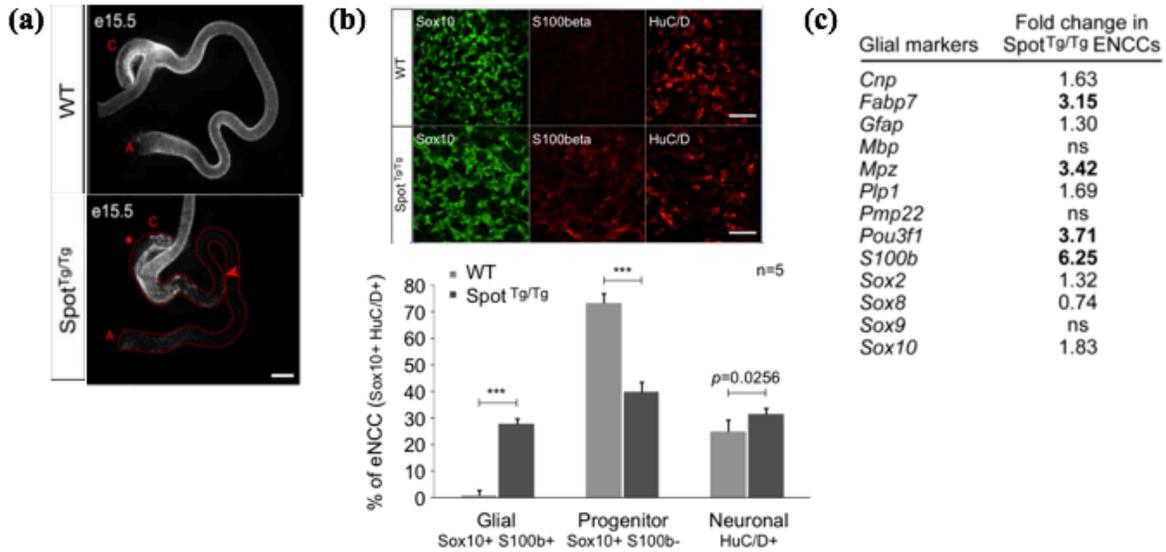


Figure 1.6 : Les CCN entériques des embryons Spot^{Tg/Tg} se différencient prématurément en cellules gliales au détriment des progéniteurs non différenciés. (a) La colonisation du tube digestif par les CCN s'arrête juste après le caecum chez les embryons Spot^{Tg/Tg} (flèche). (b) Les CCN des embryons Spot^{Tg/Tg} se différencient prématurément en cellules gliales (Sox10+; S100β+) au détriment des progéniteurs non différenciés (Sox10+) alors que la quantité de neurones (HuC/D+) ne change pas significativement. (c) Plusieurs marqueurs gliaux sont régulés à la hausse dans les CCN entérique des Spot^{Tg/Tg}. Adaptée de (Bergeron et al., 2016).

Tableau I : Extrait du RNAseq Spot^{Tg/Tg} vs control à partir des CCN entériques à e12.5.

	Transcript isoform	FPKM		Fold Change	Significant ($P \leq 0.01$)
		Spot ^{Tg/Tg}	Ctl		
Nr2f1 locus	<i>A830082K12Rik-001</i>	9.10	2.07	+4.4	yes
	<i>Nr2f1-001</i>	94.92	7.07	+13.4	yes
Selected glial markers	<i>Cnp-001</i>	48.96	31.36	+1.6	yes
	<i>Erb3-001</i>	81.34	46.32	+1.8	yes
	<i>Fabp7-001</i>	190.92	62.34	+3.1	yes
	<i>Foxd3-001</i>	55.92	33.54	+1.8	yes
	<i>Mbp-003</i>	3.47	5.24	-1.4	yes
	<i>Mpz-001</i>	3.56	0.95	+3.9	yes
	<i>Nr2f2-001</i>	7.31	6.25	+1.2	no
	<i>Pip1-002</i>	25.74	14.79	+1.8	yes
	<i>Pmp22-001</i>	4.24	4.66	-1.1	no
	<i>Pou3f1-001</i>	0.67	0.18	+3.7	yes
	<i>S100b-001</i>	3.20	0.56	+5.6	yes
	<i>Sox2-001</i>	27.91	21.66	+1.3	yes
	<i>Sox8-001</i>	17.27	23.69	-1.4	yes
	<i>Sox10-201</i>	64.41	36.05	+1.8	yes
	<i>Zeb2-002</i>	22.87	17.49	+1.3	no
Selected components of the Notch pathway	<i>Dll1-001</i>	7.36	10.44	-1.4	yes
	<i>Dll3-001</i>	7.62	7.49	-	no
	<i>Dll4-001</i>	0.59	1.33	-2.2	yes
	<i>Hes1-001</i>	14.89	25.72	-1.7	yes
	<i>Hes5-001</i>	0.11	0.81	-7.1	yes
	<i>Hes6-001</i>	29.32	36.63	-1.2	no
	<i>Hey1-001</i>	4.04	6.16	-1.5	yes
	<i>Hey2-001</i>	3.70	3.45	+1.1	no
	<i>Jag1-001</i>	5.67	3.08	+1.8	yes
	<i>Jag2-201</i>	1.23	2.86	-2.2	yes
	<i>Notch1-001</i>	15.49	10.63	+1.5	yes
	<i>Notch2-001</i>	13.95	17.42	-1.2	yes
	<i>Notch3-001</i>	6.24	5.16	+1.2	yes
	<i>Notch4-001</i>	0.28	0.41	+1.6	no
Selected components of the Hedgehog pathway	<i>Gas1-001</i>	8.03	10.19	-1.3	yes
	<i>Gli1-201</i>	1.08	2.31	-2.1	yes
	<i>Gli2-001</i>	1.23	1.70	-1.4	yes
	<i>Gli3-001</i>	7.86	5.93	+1.3	yes
	<i>Ptch1-001</i>	5.92	9.22	-1.5	yes
	<i>Ptch2-001</i>	0.47	0.90	-1.9	yes
	<i>Smo-001</i>	37.18	27.86	+1.4	yes
	<i>Sufu-001</i>	4.01	3.91	-	no

1.2.2 Les facteurs de transcriptions NR2F1/2 dans la gliogenèse

Bien que le mécanisme d'action de NR2F1, aussi connu sous le nom de COUP-TFI (« Chicken Ovalbumin Upstream Promoter Transcription Factor ») dans la gliogenèse entérique soit pour l'instant inconnu, son paralogue NR2F2, avec lequel il est co-exprimé, est probablement lui aussi normalement impliqué (Tableau I). En effet, NR2F1 et NR2F2 ont tous les deux été associés au contrôle du passage de la neurogenèse vers la gliogenèse pendant la spécification des cellules souches/progénitrices neurales (CSPN). Cette étude a révélé que *Nr2f1/2* sont

temporairement régulés à la hausse dans les CSPN au début de la neurogenèse afin de rendre ces cellules réceptives aux cytokines gliogéniques LIF et BMP2 (Naka, Nakamura, Shimazaki et Okano, 2008). Les données du séquençage du transcriptome des CCN de Spot^{Tg/Tg} à e12.5 montrent que *ErbB3*, qui code pour le récepteur du facteur de croissance gliogénique GGF-2, est 1,8 fois plus exprimé que dans le contrôle (Tableau I). Cela suggère que *Nr2f1/2* pourraient avoir un rôle similaire dans les CSPN et les CCNe. Un rôle plus direct est aussi possible. En effet, *Fabp7*, un des marqueurs de CGE le plus précoce a été démontré comme étant une cible directe de NR2F1 dans le cerveau et l'oreille interne et est significativement surexprimé dans les CCNe des embryons Spot^{Tg/Tg} (Tableau I) (Montemayor et al., 2010). De plus, de récentes études montrent que certains micro-ARNs sont les effecteurs des facteurs de transcriptions NR2F1/2 dans l'oreille interne et les CSPN (Chiang, Cuthbertson, Ruiz, Li et Pereira, 2013; Naka-Kaneda et al., 2014). À ce jour, le mécanisme d'action et les effecteurs de NR2F1/2 dans les CCNe reste encore méconnu mais toutes les observations mentionnées ici suggèrent fortement que NR2F1/2 déclencherait la transition de la neurogenèse vers la gliogenèse en jouant à la fois un rôle instructif et un rôle permissif.

1.2.3 Différentiation des cellules de la crête neurale entériques.

Les décisions cellulaires dans le SNE sont très probablement orchestrées par une combinaison de facteurs extrinsèques provenant du mésenchyme de l'intestin et de la communication directe entre des CCNe adjacentes. Dans le cas de la gliogenèse cette combinaison est particulièrement bien illustrée par l'interaction fonctionnelle entre les voies de signalisation Hedgehog et Notch (Liu et al., 2015; Ngan et al., 2011; Okamura et Saga, 2008; Taylor, Yeager et Morrison, 2007).

1.2.3.1 La Voie de signalisation Notch dans le développement des cellules de la crête neurale entériques

Avec à la fois un ligand et un récepteur transmembranaire, la voie de signalisation Notch permet la communication directe entre deux cellules adjacentes. Après l'interaction avec son ligand, le domaine intracellulaire de Notch est clivé puis passe dans le noyau où il s'associe avec la protéine de liaison à l'ADN RBPJ pour activer la transcription de gènes cibles comme les membres de la famille *Hes* (Liu et Ngan, 2014). Pendant le développement du SNE, plusieurs récepteurs et ligands (de la famille JAG ou DLL) de la voie Notch sont présent au bon endroit et au bon moment pour influencer la différenciation gliale (Tableau I). Comme dans d'autres parties du système nerveux Notch semble être indispensable dans les CCNe pour le maintien des progéniteurs non différenciés ainsi que pour le passage de la neurogenèse à la gliogenèse (Morrison et al., 2000; Ngan et al., 2011; Okamura et Saga, 2008; Taylor et al., 2007; Wakamatsu, Maynard et Weston, 2000). L'analyse de souris avec une délétion spécifique aux CCN de *Pofut1* (qui code pour une fucosyltransférase modifiant les récepteurs Notch pour une activité optimale) suggère que ce double rôle pourrait être dû à la régulation négative indirecte de l'expression de *Sox10* (Okamura et Saga, 2008). *Sox10* code pour un facteur de transcription à domaine HMG connu pour être lui aussi requis à la fois pour le maintien du pool de progéniteurs et pour l'acquisition de l'identité gliale (Bondurand et Sham, 2013). Dans d'autres études, il a été proposé que *Sox10* pourrait normalement être réprimé par le facteur de transcription pro-neuronal ASCL1 (MASH1), qui serait lui-même régulé négativement au niveau de sa transcription par le facteur de transcription HES1 en aval de la voie Notch (Chen et al., 1997; Kim, Lo, Dormand et Anderson, 2003). Cependant, d'autres travaux plus récents

suggèrent un mécanisme plus complexe impliquant également la voie de signalisation Hedgehog (Liu et al., 2015; Ngan et al., 2011).

1.2.3.2 La Voie de signalisation Hedgehog dans le développement des cellules de la crête neurale entériques

Sonic Hedgehog (Shh) et *Indian Hedgehog (Ihh)* sont tous les deux exprimés dans l'endoderme de l'intestin dès les premiers stades de la fermeture du tube digestif (Bitgood et McMahon, 1995; Echelard et al., 1993; Ramalho-Santos, Melton et McMahon, 2000). L'absence des ligands Hedgehog chez la souris affecte toutes les couches du tube digestif incluant le SNE en développement (Ramalho-Santos et al., 2000). Les CCNe expriment tous les acteurs nécessaires à la signalisation Hedgehog (Tableau I). La suppression des protéines sécrétées IHH ou SHH (via une mutation de type perte de fonction) résulte respectivement en une aganglionose partielle ou dans la formation ectopique de ganglions (Ramalho-Santos et al., 2000). Dans la signalisation canonique, la liaison des ligands au récepteur PTCH libère l'inhibition de SMO dont le rôle est de contrer SUFU en promouvant la formation de la forme activatrice de GLI au détriment de la forme répressive (Liu et Ngan, 2014). L'activation constitutive de la voie Hedgehog dans les CCN via la perturbation de *Ptch1* ou *Sufu* chez la souris suggère un rôle important dans la régulation de la gliogenèse entérique (Liu et al., 2015; Ngan et al., 2011). En effet, il a été montré que l'activation de la voie Hedgehog déclenche prématurément la différenciation gliale des CCNe et que cet effet passe notamment par l'activation de la voie Notch (Ngan et al., 2011). De récents travaux suggèrent que la gliogenèse induite par Hedgehog pourrait également impliquer l'activation directe de l'expression de Sox10 par les facteurs de transcription GLI (Liu et al.,

2015). En résumé, les connaissances actuelles suggèrent fortement que les voies de signalisation Hedgehog et Notch sont toutes les deux à la tête du réseau de régulation génétique contrôlant la différenciation gliale entérique. D'autres voies pro-gliogénique comme GGF2/ERBB3 et LGI4/ADAM22 sont nécessaires pour la maturation et le maintien des cellules gliales entériques (Chalazonitis, D'Autreaux, Pham, Kessler et Gershon, 2011; Nishino, Saunders, Sagane et Morrison, 2010).

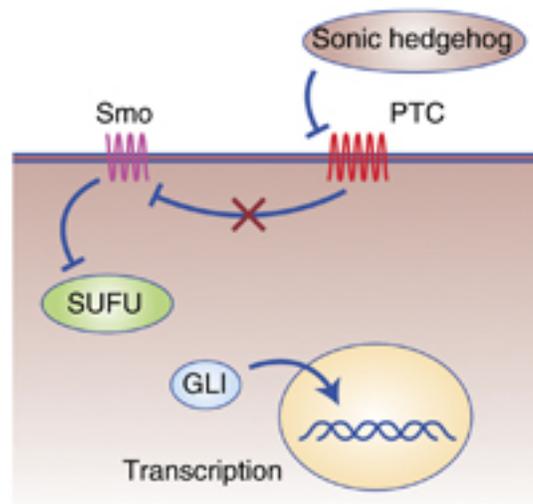


Figure 1.7 : Représentation schématique de la voie Hedgehog. La liaison des ligands Hedgehog au récepteur PTCH libère l'inhibition de SMO dont le rôle est de contraindre SUFU en favorisant la formation de la forme activatrice de GLI au détriment de la forme répressive (Adaptée de (Lear et al., 2014)).

1.3 Le long ARN non codant *A830082k12Rik* (*K12*).

Depuis la découverte que la grande majorité (70-90%) du génome des mammifères est transcrit en ARN non codant (ARNnc) alors que seulement 2% ne code pour des protéines, il y a eu un intérêt grandissant pour une catégorie particulière d'ARNnc : les longs ARN non codants (LncRNAs). Les lncRNAs, qui sont arbitrairement définis comme étant les ARNnc d'une longueur supérieure à 200 nucléotides, représente la plus grande classe d'ARN non codants (Kapranov et al., 2007). Les lncRNAs partagent beaucoup de points communs avec les ARNm : ils sont transcrits par l'ARN polymérase II (ARNpol II) à partir de loci possédant une signature de chromatine similaire à celles des ARNm ; ils possèdent souvent une coiffe à l'extrémité 5' ; et ils sont épissés et polyadénylés. Dans beaucoup de cas, l'absence de cadre de lecture ouvert (suite de codons comprenant un codon start et un codon stop) est la seule différence avec les ARNm. De manière générale, les lncRNA tendent à être plus courts que les ARNm, possédant généralement de plus grands exons que les ARNm mais en moins grand nombre. Ils aussi généralement plus faiblement exprimés et leur séquence est peu conservée à travers les espèces (Quinn et Chang, 2016).

Les gènes des lncRNA peuvent être catégorisés en fonction de leur position et de leur orientation relative aux gènes codants qui sont situés à proximité (Figure 1.8)(Villegas et Zaphiropoulos, 2015b). Le lncRNA *A830082K12Rik* appartient à la catégorie de lncRNA antisens 'head-to-head' car il est situé sur le brin opposé (antisens) et transcrit en direction opposé de *Nr2f1* (divergent), et les séquences des deux gènes se chevauchent sur 200pb à l'extrémité 5'(head-to-head)(Figure 1.9).

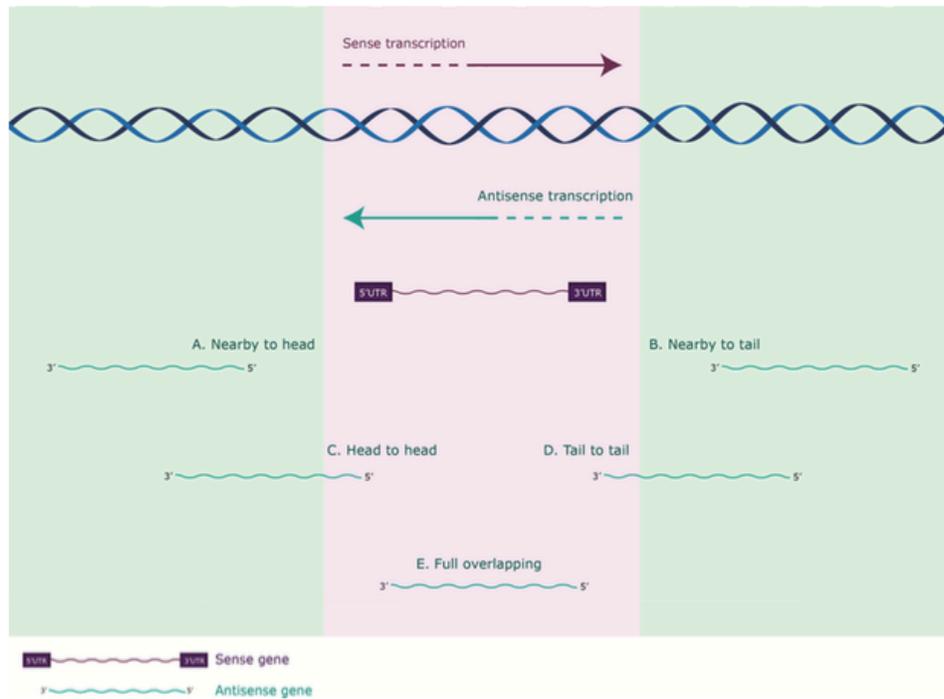


Figure 1.8 : Catégories de lncRNA en fonction de leur position par rapport au gène voisin.

(A) *Nearby to head*, l'extrémité 5' du gène antisens est à proximité de l'extrémité 3' du gène sens (B) *Nearby to tail*, l'extrémité 3' du gène sens est à proximité de l'extrémité 3' du gène antisens (C) *Head to head* ou divergent, les extrémités 5' des gènes sens et antisens se chevauchent ; (D) *Tail to tail* ou convergent, l'extrémité 3' des gènes sens et antisens se chevauchent (E) Complètement chevauchant (Adaptée de (Villegas et Zaphiropoulos, 2015a).

Les ARN non codants antisens ont longtemps été considérés comme n'étant seulement que du bruit transcriptionnel à cause du fait que leur séquence n'est que très peu conservée à travers les espèces et que leur niveau d'expression est relativement bas. Toutefois, il est maintenant clair que les transcrit antisens peuvent agir à tous les niveaux de l'expression génique : de la transcription et traduction jusqu'à la dégradation de l'ARNm (Yang, Froberg et Lee, 2014). Ils peuvent être impliqués dans la régulation de gènes voisins en *cis* ou dans la régulation de gènes distants via une action en *trans*, par l'intermédiaire de mécanismes très variés pouvant impliquer une interaction lncRNA-ADN, lncRNA-ARN ou lncRNA-protéine (Villegas et Zaphiropoulos, 2015b).

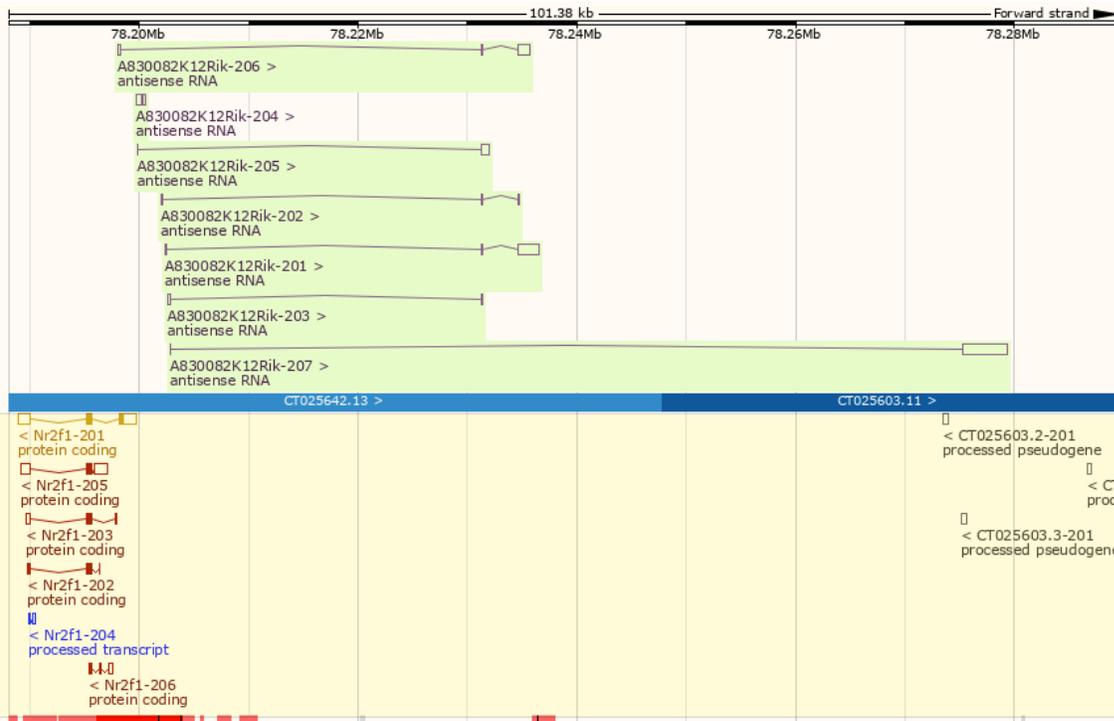


Figure 1.9 : Organisation du locus de *Nr2f1/A830082K12Rik*. Le gène de lncRNA K12 est transcrit en 6 différents isoformes dans la direction opposée du gène codant pour le facteur de transcription NR2F1 (Image obtenue à partir des prédictions de Ensembl.org).

K12 possède 14 exons et peut générer 7 isoformes par épissage alternatif. Il existe 6 formes courtes qui mesurent entre 418 pb et 2203 pb ainsi qu'une forme longue de 4176 pb. Une des formes courtes partage 200 pb avec *Nr2f1* alors que les 6 autres isoformes sont situés entre 1000 et 4000 pb du site de départ de la transcription de *Nr2f1*.

La possibilité que le lncRNA *A830082k12Rik* puisse réguler la transcription de *Nr2f1* en *trans* a précédemment été testée dans notre laboratoire. La surexpression de *A830082k12Rik* n'augmente pas le niveau d'ARNm de *Nr2f1* dans les différentes lignées cellulaires testées (Figure 1.10). Toutefois, l'organisation génomique de la paire de gènes *A830082k12Rik/Nr2f1* et la localisation de *K12* dans des régions transcriptionnellement actives du noyau n'exclue pas la possibilité d'un mécanisme de régulation en *cis*. En effet, certains lncRNA ont été démontrés

comme étant capables de recruter des complexes de régulation via des interactions ARN-protéines pour affecter l'expression de gènes voisins (Lee, 2009; Wang et al., 2011). Par exemple, le lncRNA HOTTIP interagit avec des remodeleurs de la chromatine pour activer les gènes *HoxA* distaux en maintenant une conformation active de la chromatine à proximité du locus duquel il est transcrit (Wang et al., 2011) (Figure 1.11). Beaucoup d'autres gènes de lncRNA pourraient aussi agir en tant que régulateur 'locaux' via d'autres mécanismes qui ne dépendent pas d'une séquence d'ARN transcrite particulière (Engreitz et al., 2016; Guil et Esteller, 2012; Orom et al., 2010). Par exemple, le lncRNA *Uph* active le gène *Hand2* à proximité mais dans ce cas la régulation est indépendante de la séquence du transcrit et repose plutôt sur l'acte de la transcription. En effet, les enhancer de *Hand2* sont contenus dans le gène *Uph* et la transcription d'*Uph* est requise pour maintenir une signature active d'initiation et d'élongation par l'ARN Pol II à travers le locus des enhancer de *Hand2* (Anderson et al., 2016) (Figure 1.11).



Figure 1.10 : *K12* n'active pas la transcription de *Nr2f1* en trans. Lorsque *K12* est exprimé en trans dans des cellules P19 ou N2a, la quantité d'ARNm de *Nr2f1* ne change pas (Résultats non publiés).

Une autre possibilité est que des éléments de régulations en *cis* se trouvent dans un gène de lncRNA. Par exemple le lncRNA *Lockd* régule positivement la transcription de *Cdkn1b* grâce à un élément semblable à un enhancer et donc, dans ce cas, ni le transcrit ni la transcription de *Lockd* ne sont requises (Paralkar et al., 2016). Ces trois exemples de mécanisme de régulation par des loci de lncRNA montrent à quel point il est important de bien distinguer si les effets de régulation en *cis* sont médiés par l'ARN, l'ADN ou l'acte de la transcription. Il ne serait donc pas surprenant que le lncRNA *A830082k12Rik* soit impliqué dans la régulation de *Nr2f1* en *cis* compte tenu de leur organisation génomique.

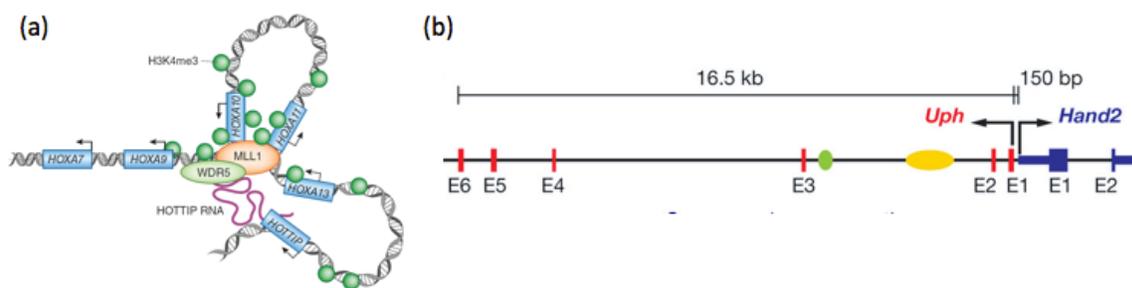


Figure 1.11 : Exemples de régulation en *cis* par des lncRNA. (a) Le lncRNA HOTTIP interagit avec le complexe WDR5-MLL1 pour activer les gènes *HoxA* distaux en maintenant une conformation active de la chromatine à proximité du locus duquel il est transcrit. (b) La transcription de *Uph* est requise pour maintenir une signature active d'initiation et d'élongation par l'ARN Pol II à travers le locus contenant les enhancers de *Hand2* (en jaune et vert) (Adapté de (Anderson et al., 2016; Wang et al., 2011)).

CHAPITRE 2: HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS

Les connaissances actuelles suggèrent que la voie Sonic Hedgehog joue un rôle important dans le contrôle de la différenciation gliale entérique.

Nos études sur la lignée Spot ont montré que la surexpression du facteur de transcription NR2F1 dans les CCN provoque un mégacôlon aganglionaire causé par la différenciation gliale précoce des CCN entérique (Bergeron et al., 2016). Ces observations sont en accord avec le fait que *Nr2f1* et son paralogue *Nr2f2* ont tous les deux été démontrés comme étant important dans le contrôle de la gliogenèse du système nerveux central (Naka et al., 2008; Yamaguchi et al., 2004). De manière intéressante, d'autres études suggèrent qu'environ 25% des cas de mégacôlon aganglionaire chez l'homme pourraient être expliqués par une induction précoce de la différenciation gliale des CCN entériques par SHH (Liu et al., 2015; Ngan et al., 2011). Sachant que chez les souris Spot, les effecteurs de la voie Sonic Hedgehog ne sont que faiblement dérégulés (fold change $\leq 2,1$) dans les CCNe et que la régulation de *Nr2f2* par SHH à déjà été mis en évidence (Krishnan, Pereira, et al., 1997; Naka et al., 2008) nous avons émis l'hypothèse suivante :

Hypothèse 1 : La gliogenèse des CCN entérique induite par Sonic Hedgehog est médiée par les facteurs de transcriptions NR2F1/NR2F2.

Objectif 1 : Déterminer si l'activation de la voie Sonic Hedgehog induit la différenciation gliale entérique via les facteurs de transcriptions NR2F1/NR2F2.

Objectif 1.a :

Déterminer *in vitro* si l'activation de la voie Sonic Hedgehog affecte l'expression de *Nr2f1/2* et des marqueurs gliaux qui sont dérégulés dans les CCN des embryons *Spot^{Tg/Tg}*.

Objectif 1.b :

Déterminer *ex vivo* si l'inactivation de la voie Sonic Hedgehog affecte l'expression de *Nr2f1/2* et des marqueurs gliaux dérégulés dans les CCN des embryons *Spot^{Tg/Tg}*.

Objectif 1.c :

Étudier l'effet du knockdown de *Nr2f1/2* par des shRNAs sur la gliogenèse entérique.

La possibilité que le lncRNA *K12* puisse réguler la transcription de *Nr2f1* en agissant en *trans* a été écartée mais un mécanisme de régulation en *cis* est toujours possible. En effet, différents mécanismes sont envisageables : par exemple *K12* pourrait affecter l'expression de *Nr2f1* en interagissant avec différentes protéines de la machinerie de transcription ou des protéines régulatrices. La transcription de *K12* pourrait affecter la transcription de *Nr2f1* via un mécanisme similaire à celui de la paire de gènes *Uph/Hand2* ou encore la séquence du gène de *K12* pourrait contenir des éléments régulateurs. Nous avons émis l'hypothèse suivante :

Hypothèse 2 : Le locus du lncRNA A830082k12Rik est capable de réguler l'expression d'un gène voisin via un mécanisme en *cis*

Objectif 2 : Évaluer l'activité régulatrice du lncRNA *A830082K12Rik* dans des essais luciférase en récapitulant l'organisation génomique de la paire de gène *Nr2f1/A830082k12Rik*.

Afin d'évaluer l'activité régulatrice de *K12*, une cassette d'expression contenant le cDNA de *K12* sous le contrôle du promoteur CMV a été placée en direction opposée du gène de la luciférase sous le contrôle du promoteur minimal de la thymidine kinase (TK) pour effectuer des essais luciférase permettant d'évaluer l'activité régulatrice de *K12* sur un gène voisin.

CHAPITRE 3: MATÉRIELS ET MÉTHODES

Traitement de cellules P19 avec Sonic Hedgehog recombinant

Les cellules de carcinome embryonnaire de souris P19 (ATCC, CRL-1825) ont été cultivées dans du AMEM supplémenté de 2,5% de FBS et 7,5% de CBS pendant 24h en présence ou absence de différentes concentrations de SHH (Sonic Hedgehog recombinant de souris C25II, R&D Systems).

Après 24h, les cellules ont été récoltées pour procéder à l'extraction d'ARN selon la trousse RNAeasy Plus purification » disponible chez Qiagen ». 500 ng d'ARN ont ensuite été pour effectuer une transcription inverse avec la transcriptase inverse Superscript II afin d'obtenir 20 µL d'ADNc dont 1µL a été utilisé pour l'amplification des cibles par PCR avec l'ADN polymérase Feldan. Les oligos utilisés sont indexés dans le

Tableau IV. La réaction est composée de 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.

Souris et culture d'explants

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). 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 e0.5.

Les souris Gata4p-RFP ont été utilisées dans nos expériences parce que les CCN de ces souris sont marquées de manière endogène par la protéine RFP et que ces souris ne présentent aucun défaut au niveau du développement de leur SNE (Pilon et al., 2008). Ainsi cette lignée permet l'étude du développement normal du SNE. Le stade e13.5 a été utilisé car il correspond au stade de l'apparition des premières cellules gliales immatures.

Pendant la dissection, les embryons ont été maintenus dans un pétri contenant du PBS 1X stérile froid sur glace. Après avoir coupé la tête de l'embryon, les membranes extra-embryonnaires et la cavité abdominale ont été ouvertes puis la totalité du tractus gastro-intestinal a été sorti de la cavité abdominale et coupé au niveau de l'estomac. La section de la sortie de l'estomac jusqu'à l'extrémité distale du tube digestif en formation a ensuite été placée dans un pétri contenant du DMEM/F12 supplémenté avec 10% de FBS et pénicilline/streptomycine. Les explants ont ensuite été cultivés pendant 48h à 37°C avec 5% de CO₂. Lors des expériences d'inhibition de la voie Hedgehog, 2µM de cyclopamine (Tocris Biosciences) a été utilisé.

Tri cellulaire par FACS ('Fluorescence Activated Cell Sorting') et RT-qPCR

Les explants Gata4-RFP ont été disséqués à e13.5 et traités individuellement pour leur dissociation dans une solution de collagénase (0.4 mg/ml ; Sigma), dispase II (1.3 mg/ml ; Technologies) et DNase I (0.5 mg/ml ; Sigma). Un trieur cellulaire (MoFlo XDP, Beckman Coulter) nous a permis de collecter les cellules RFP-positives de chaque intestin, soit 25 000 cellules par intestin. Chaque échantillon de cellules est conservé à -80°C avant de procéder à l'extraction d'ARN selon la trousse « RNeasy Plus purification » disponible Qiagen. 50 ng d'ARN ont ensuite été utilisés pour effectuer une transcription inverse avec

l'ADN polymérase Superscript II (Invitrogen) afin d'obtenir 20 µL d'ADNc dont 1µL a été utilisé pour l'amplification des cibles par qPCR en utilisant le protocole « Sso-Fast EvaGreen Supermix Green » (Bio-Rad). Les oligos utilisés sont indexés dans le

Tableau IV.

Production de lentivirus et infection des explants

Pour l'expérience de knock-down de *Nr2f1/2* médiée par shRNA (short hairpin RNA), la méthode de transduction lentivirale a été utilisée. Les constructions de shRNA contre et de shRNA contrôle ont été fournies par le groupe du Dr Okano (Japon) (

Tableau II). Les particules lentivirales ont été produites avec la trousse « ViraPower Lentiviral Packaging Mix » (ThermoFisher) (Figure 3.1). Brièvement des cellules 293FT (ATCC, PTA-5077) ont été cultivées dans du DMEM supplémenté de 10% de FBS puis transfectées avec trois plasmides d'encapsidation pLP1, pLP2 et pLP/VSVG en plus du plasmide contenant la cassette d'expression de shRNA (Figure 3.1). Ces plasmides fournissent en trans les protéines structurelles et les protéines de réplication requises pour produire des lentivirus. Cette méthode permet de produire des lentivirus capables d'infecter tout type de cellules mammifères mais incapables de se répliquer. Comme le shRNA est intégré dans le génome de la cellule infectée par le lentivirus, cette cellule, ainsi que tous ses dérivés, exprimeront le shRNA. Après 72h le surnageant contenant les particules lentivirales a été récolté puis filtré à travers un filtre 0,45µm. Les préparations lentivirales ont ensuite été titrées sur des cellules 293FT puis une MOI (« multiplicity of infection ») d'environ 20 a été utilisée pour infecter les explants. La MOI est défini par le ratio entre le nombre de particules infectieuses et le nombre de cellules cibles et

permet d'estimer la quantité de virus à utiliser pour obtenir une bonne efficacité de transduction. Après 48h, les explants ont été fixés au paraformaldéhyde (4% dans du PBS1X) à température ambiante pendant 1 heure, déshydratés au méthanol puis conservés à -20°C en attendant d'être utilisés.

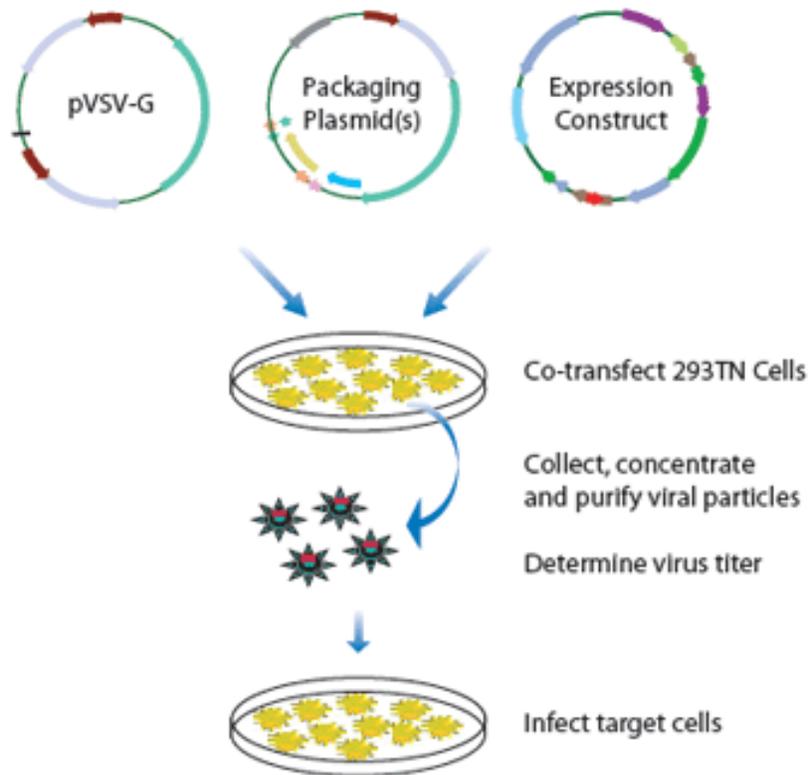


Figure 3.1 : Production de vecteurs lentiviraux. Des plasmides d'expression pour les protéines nécessaire à la formation des lentivirus sont co-transfectés avec le plasmide contenant la cassette d'expression puis le surnageant est récolté et filtré avant d'être titré préalablement à l'infection des cellules cibles.

Tableau II : shRNA utilisés pour l'expérience de knock-down de Nr2f1/2.

shRNA	Cibles	Séquence
Control	Aucune	ACTACCGTTGTTATAGGTGttcaagagaCACCTATAACAACGGTAGT
Nr2f1/2	Nr2f1 + Nr2f2	GTCGAGCGGCAAGCACTACTtcaagagaGTAGTGCTTGCCGCTCGAC

Immunomarquages et microscopie confocale

Après réhydratation au PBS, les intestins ont été incubés à température ambiante pendant 2 heures 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 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 III. Les solutions d'anticorps utilisées ont été diluées dans la solution de blocage. Suite aux immunomarquages, les tissus marqués ont été étalés et montés entre lame et lamelle, dans du glycérol, en prenant soin de ne pas écraser les tissus. Après 1H de séchage, les tissus étaient prêts à être observés au microscope confocal.

Tableau III : Anticorps utilisés pour l'expérience d'immunofluorescence

	Anticorps	Dilution	Source
Anticorps primaire	Goat anti-Sox10	1:500	Santa Cruz Biotechnologies (sc-17342)
	Rabbit anti-S100β	1:500	Dako (Z0311)
Anticorps secondaire	Bovine anti-goat	1:500	Jackson Immuno Research (805-545-180)
	Alexa Fluor 488	1:500	Jackson Immuno Research (711-585-152)
	Donkey anti-rabbit	1:500	Jackson Immuno Research (711-585-152)
	Alexa Fluor 594		

Essais Luciférase

Trois différentes constructions ont été réalisées pour les essais luciférase (Figure 3.2).

Deux différents isoformes de *K12* ont été testés : *K12_F3R4* et *K12_F6R4* (Figure 3.3). Ces deux transcrits sont exprimés dans l'intestin entier à e12,5 et *K12_F6R4* est d'avantage exprimé dans les CCN entérique. Les ADNc de ces transcrits proviennent d'intestin entier d'embryons FVB à e12.5. Une cassette d'expression contenant l'ADNc de *K12_F3R4* ou *K12_F6R4* sous le contrôle du promoteur CMV a été placée en direction opposée du gène rapporteur de la luciférase sous le contrôle du promoteur minimal du gène de la thymidine kinase (TK). La séquence de *K12* est absente dans le contrôle. 200 ng d'ADN plasmidique ont été transfectés dans des cellules Neuro-2a, P19 ou Cos-7, puis l'expression de la luciférase a été déterminée 48 heures plus tard par essais luciférase. Les cellules ont d'abord été lysées à température ambiante 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 a ensuite été incubé pendant 5 secondes dans un luminomètre – dans le noir - avec la solution d'essai (Glycylglycine 25 mM, MgSO₄ 15 mM, KPO₄ 15 mM, EGTA 4 mM, ATP 2 mM et DTT 2 mM) et la luciférine (0,3mg/mL). Les cellules neuroblastiques de souris Neuro2a (ATCC, CCL-131) ont été cultivées dans du EMEM supplémenté de 10% de FBS. Les cellules de carcinome embryonnaire de souris P19 (ATCC, CRL-1825) ont été cultivées dans du AMEM supplémenté de 2,5% de FBS et 7,5% de CBS, et les cellules rénales de singe COS7 (ATCC, CRL-1651)) ont été cultivées dans du DMEM supplémenté de 10% de FBS. Les données quantitatives sont présentées comme la moyenne de *n* tests réalisés ± l'erreur type. Le test t de Student a été utilisé

pour évaluer la significativité des résultats. Les résultats ont été considérés comme significatifs lorsque la *p-value* était inférieure à 0,05 ($p \leq 0.05$). 3 tests ont été réalisés sur les cellules P19 et Neuro2a et 4 sur les cellules COS7.

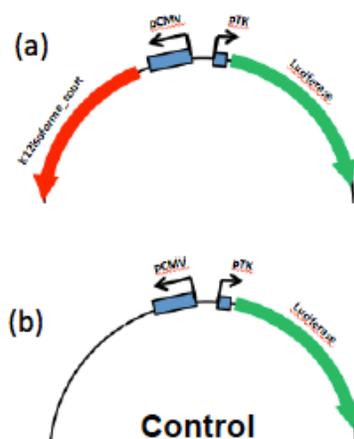


Figure 3.2 : Constructions utilisées lors des essais luciférase. (a) Une cassette d’expression contenant l’ADNc de *K12_F3R4* ou *K12_F6R4* sous le contrôle du promoteur CMV a été placé en direction opposé du gène rapporteur de la luciférase sous le contrôle du promoteur minimal du gène de la thymidine kinase (TK). (b) La séquence de *K12* est absente dans le contrôle.



Figure 3.3 : Structure des deux isoformes de *K12* testés dans les essais luciférase. *K12_F3R4* et *K12_F6R4* possèdent l’exon 2b (200 pb) et l’exon 3 (1900 pb) en commun. Le premier exon de *K12_F3R4* est différents de celui de *K12_F6R4* et *K12_F6R4* possède un exon supplémentaire de 250 pb.

Tableau IV : Oligos utilisés pour les expériences de PCR et de qPCR.

Gène	Oligo sens (F)	Oligo antisens (R)
Nr2f1	AAG CCA TCG TGC TAT TCA CGT CAG	CGA AGA GAG GGC AAT CGC AGC AG
Nr2f2	AGT GGA GAA GCT CAA GGC ACT GC	TAC TCT TCC AAA GCA CAC ACT GGG
Ptch1	TTT GGT TGT GGG TCT CCT CAT ATT	TAG ACG TGC ACA CGA CTG GC
Fabp7	AAA TTA AGG ATG GCA AGA TGG TCG	TGC ATA TCA AAA TCC CAT GAA TTG C
Plp1	GTC AGT CTA TTG CCT TCC CTA GC	TTA GAC AAA GGG GAG TTT CTA TGG G
Gapdh	CTG TGG CGT GAT GGC CGT GG	CCT CAG TGT AGC CCA AGA TG

CHAPITRE 4: RÉSULTATS

4.1 Sonic Hedgehog et NR2F1/NR2F2 dans la différenciation gliale.

4.1.1 Induction *in vitro* de l'expression de *Nr2f1*, *Nr2f2* et de plusieurs marqueurs gliaux par Sonic Hedgehog dans des cellules P19.

Afin de déterminer s'il existe un lien entre la voie Sonic Hedgehog, l'expression des facteurs de transcriptions NR2F1/NR2F2 et la différenciation gliale, nous avons choisi de vérifier d'abord *in vitro* si l'activation de la voie Hedgehog par SHH dans des cellules P19 induit l'expression de *Nr2f1/2* et de plusieurs marqueurs gliaux qui sont dérégulés chez Spot (**Figure 4.1** et Figure 1.6c). La lignée P19 a été utilisée dans cette expérience car cette lignée a déjà été utilisée dans plusieurs études pour étudier l'induction de *Nr2f1/2* (Jonk et al., 1994; Krishnan, Elberg, Tsai et Tsai, 1997; Qiu, Krishnan, Pereira, Tsai et Tsai, 1996). La voie Hedgehog a été activée par les différentes concentrations de SHH comme en témoigne les résultats de RT-PCR semi-quantitative sur lesquels nous pouvons observer l'induction du gène codant le récepteur *Patched1* (*Ptch1*), une cible connue (Walterhouse, Yoon et Iannaccone, 1999) (**Figure 4.1**). Nous avons remarqué que l'expression de *Nr2f2* augmente de manière linéaire quand la concentration de SHH augmente cependant ce n'est pas le cas pour l'expression de *Nr2f1*. En effet, l'expression de *Nr2f1* est plus importante à 200ng/mL de SHH que pour 100ng/mL mais lorsque la concentration est augmentée à 500ng/mL, l'expression de *Nr2f1* se retrouve plus faible que à 100ng/mL (**Figure 4.1**). Les gènes *Fabp7*, *Mpz*, et *Plp1* ont été choisis car ce sont trois marqueurs gliaux dérégulés chez Spot (**Figure 1.6**). *Fabp7* code pour la protéine « Fatty acid binding protein » (FABP7) et est considéré comme le marqueur le plus précoce de cellules

gliales immatures (Ruhl, 2005). *Plp1* code pour la protéine « proteolipid protein 1 » (PLP1) et est le marqueur le plus communément exprimé par les cellules gliales entériques (CGE) (Rao et al., 2015). *Mpz* code pour la protéine « myelin protein zero » est une protéine retrouvée en abondance dans la myéline du système nerveux périphérique mais qui est aussi produite par les CGE (Rao et al., 2015). L'expression de ces trois gènes semble induite par SHH mais n'augmente pas de manière linéaire en fonction de la concentration de Sonic Hedgehog ni de l'expression de *Nr2f1* ou *Nr2f2*. Les patrons d'expression de *Fabp7* et *Ptch1* sont similaires, l'induction est observable dès 100ng/mL de SHH mais ne semble pas augmenter avec de plus fortes concentrations (**Figure 4.1**).

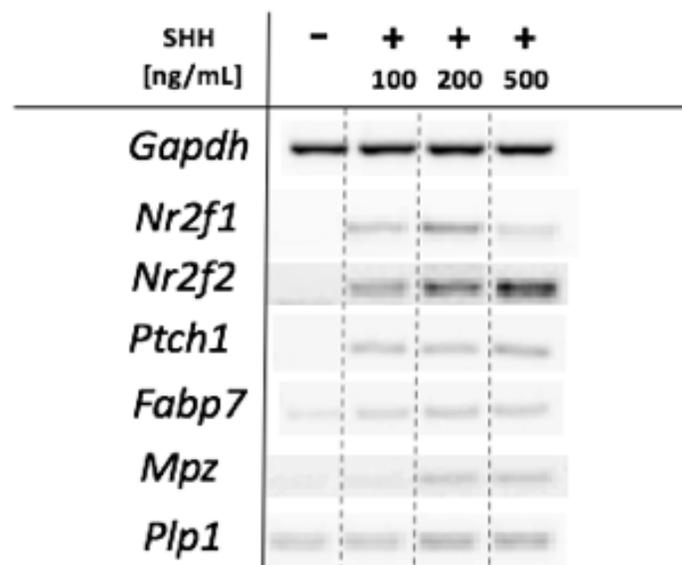


Figure 4.1 : Sonic Hedgehog semble activer la transcription de *Nr2f1*, *Nr2f2* et de plusieurs marqueurs gliaux dans des cellules P19. Le traitement de P19 avec SHH semble activer l'expression de *Nr2f1*, *Nr2f2*, *Fabp7* et *Plp1* dès 100ng/mL. Alors que l'expression de *Nr2f2* semble augmenter de manière linéaire en fonction de la concentration de SHH, celle de *Nr2f1* est plus importante à 200 ng/mL qu'à 500ng/mL. L'expression des marqueurs gliaux *Fabp7*, *Mpz* et *Plp1* est augmentée avec le traitement SHH mais l'augmentation ne suit pas celle de *Nr2f1* ou *Nr2f2* ni la concentration de SHH. L'induction de *Ptch1* permet de confirmer que la voie Hedgehog a été activée.

4.1.2 Une diminution de l'expression de *Nr2f1* et de *Fabp7* dans les CCNe à e13.5 est observée après 48 heures de culture en présence de cyclopamine.

Afin de se rapprocher du contexte *in vivo*, nous avons choisi d'utiliser une approche *ex vivo* afin de vérifier si l'inhibition de la voie Hedgehog avait une influence sur l'expression de *Nr2f1* et *Fabp7* dans les CCNe. Pour cela, nous avons pris avantage de la fluorescence endogène des CCN dans la lignée pG4-RFP en réalisant des cultures d'explants d'intestins à e13.5 pendant 48h en présence ou non de cyclopamine (2 μ M) puis en récupérant les CCN par FACS afin d'analyser l'expression de *Nr2f1* et *Fabp7* par RT-qPCR.

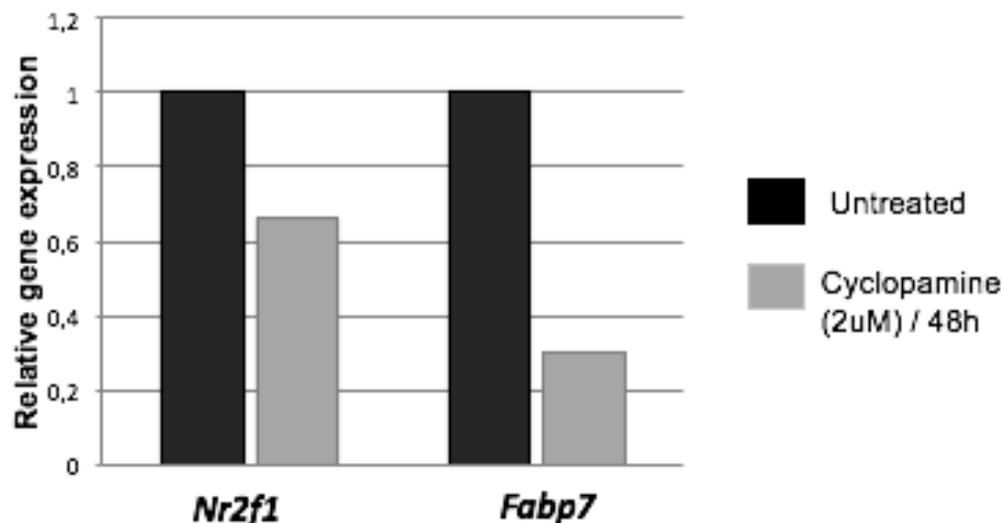


Figure 4.2 : L'inhibition de la voie Sonic Hedgehog par la cyclopamine semble diminuer l'expression de *Nr2f1* et *Fabp7* dans les CCN. Le traitement d'explants d'intestins d'embryons pG4-RFP à e13.5 avec de la cyclopamine (2 μ M) semble diminuer l'expression de *Nr2f1* et *Fabp7* dans les CCN récupérées par FACS. Le niveau d'expression relatif a été mesuré par rapport à l'expression du gène de référence *Gapdh*. (n=1).

La cyclopamine inhibe la réponse cellulaire aux ligands de la famille Hedgehog en se liant directement à SMO et en l'inactivant ce qui empêche la transduction du signal (Chen, Taipale, Cooper et Beachy, 2002) (**Figure 1.7**). Nous avons observé que la présence de cyclopamine, et donc l'inhibition de la voie Hedgehog, a un effet négatif sur l'expression de *Nr2f1* et *Fabp7* dans les CCN entérique des explants d'intestins comme en témoigne les résultats de qPCR après 48 heures de culture (**Figure 4.2**).

4.1.3 Blocage de la différenciation gliale entérique par le knock-down *ex vivo* de *Nr2f1* et *Nr2f2*.

Afin d'observer l'effet du knock-down de *Nr2f1/2* sur la différenciation gliale entérique nous avons choisi d'utiliser des cultures d'explants pG4-RFP à e13.5 pour réprimer l'expression de *Nr2f1* et *Nr2f2* en utilisant un shRNA dirigé contre ses deux gènes qui a été délivré par transduction lentivirale. Après avoir infecté une cellule, le lentivirus libère l'ADN du shRNA ainsi que les protéines nécessaires à son intégration dans le génome de la cellule hôte. Une fois que le shRNA est transcrit il supprime l'expression de son gène cible par interférence ARN (RNAi). Comme le gène du shRNA est intégré de manière stable dans le génome de la cellule hôte, tous ses dérivés exprimeront aussi le shRNA (Rubinson et al., 2003). Cette méthode nous a donc permis de faire un knock-down de *Nr2f1* et *Nr2f2* sur les cultures d'explants d'intestin à e13.5. Après 48h nous avons regardé par immunofluorescence les marqueurs SOX10 et S100 β qui marquent respectivement les progéniteurs et les cellules gliales. Nous avons remarqué une forte diminution de l'expression de S100 β avec l'explant sur lequel nous avons effectué le knock-down par rapport aux explants contrôles (Figure 4.3).

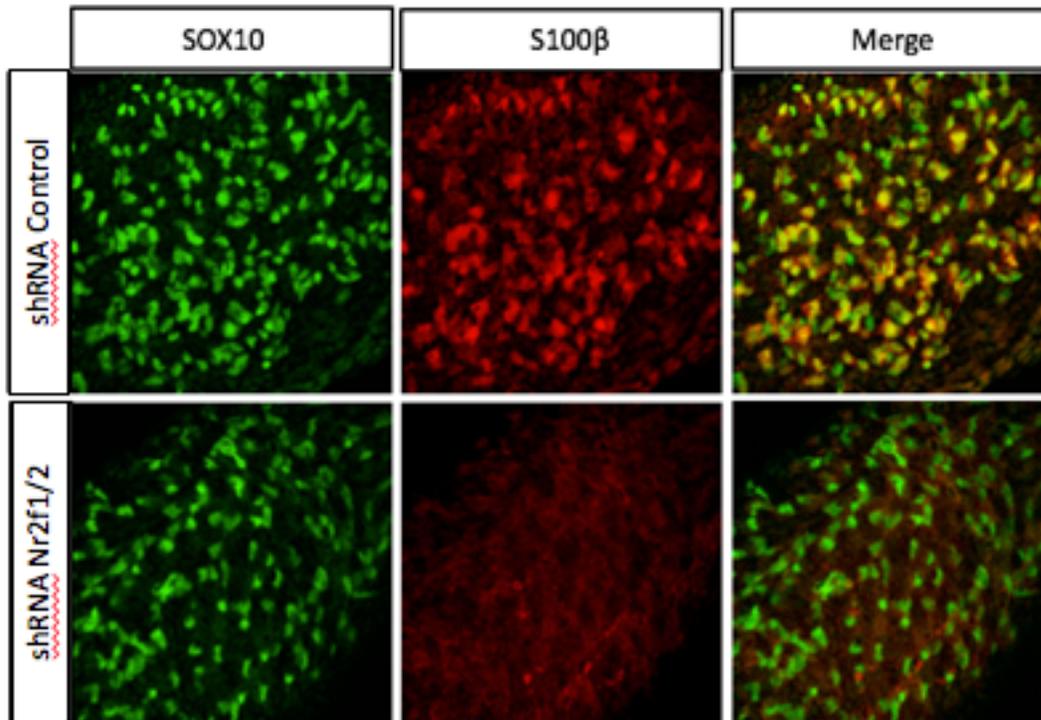


Figure 4.3 : Le knock-down *ex vivo* de *Nr2f1* et *Nr2f2* par shRNA semble empêcher la différenciation gliale. Les marqueurs SOX10 (vert) et S100β (rouge) sont utilisés pour marquer les cellules gliales (jaune). Après 48h de culture, aucune cellule n'exprime S100β dans l'explants d'intestins pG4-RFP à e13.5 qui a reçu les shRNA dirigés contre *Nr2f1* et *Nr2f2* contrairement à ceux qui ont reçu les shRNA contrôle. (n=1).

4.2 Le lncRNA *A830082K12Rik* (*K12*) est capable de réguler un gène voisin en *cis*.

Afin de vérifier si le lncRNA *K12* possède une activité régulatrice sur l'expression d'un gène voisin nous avons récapitulé l'organisation génomique de la paire de gènes *Nr2f1/K12* (**Figure 1.9**) en plaçant une cassette d'expression contenant l'ADNc de *K12* sous le contrôle du promoteur CMV en direction opposé du gène rapporteur de la luciférase sous le contrôle du promoteur minimal TK pour réaliser des essais luciférase. Cette méthode nous permet d'évaluer l'effet en *cis* de *K12* sur l'expression de la luciférase en mesurant son activité relative par rapport au contrôle. Pour le contrôle, nous avons utilisé la même construction mais l'ADNc de *K12* en aval du promoteur CMV a été retiré (Figure 4.4). Deux transcrits de *K12* qui sont exprimés dans l'intestin à e12.5 ont été choisis pour cette expérience: le transcrit *K12_F3R4* semble être exprimé dans tout l'intestin alors que *K12_F6R4* semble être exprimé davantage dans les CCNe. La lignée Neuro2a a été utilisée car c'est le modèle murin le plus proche des CCN. Dans ce modèle, les deux isoformes testés multiplient par deux l'activité de la luciférase suggérant un effet activateur (Figure 4.4). L'effet de *K12* sur la luciférase a aussi été testé dans des cellules P19 (modèle de cellules souches embryonnaires de souris) et des cellules COS7 (cellules rénales de singe) afin de pouvoir déterminer si l'effet observé dans les Neuro2a est spécifique, respectivement, au type cellulaire et/ou à l'espèce. Dans les cellules P19, seul l'isoforme *K12_F3R4* a un effet sur l'expression de la luciférase. De manière surprenante cet effet est opposé à celui observé dans les cellules Neuro2a. Aucun effet n'a été observé lorsque les essais ont été réalisés sur les cellules COS7.

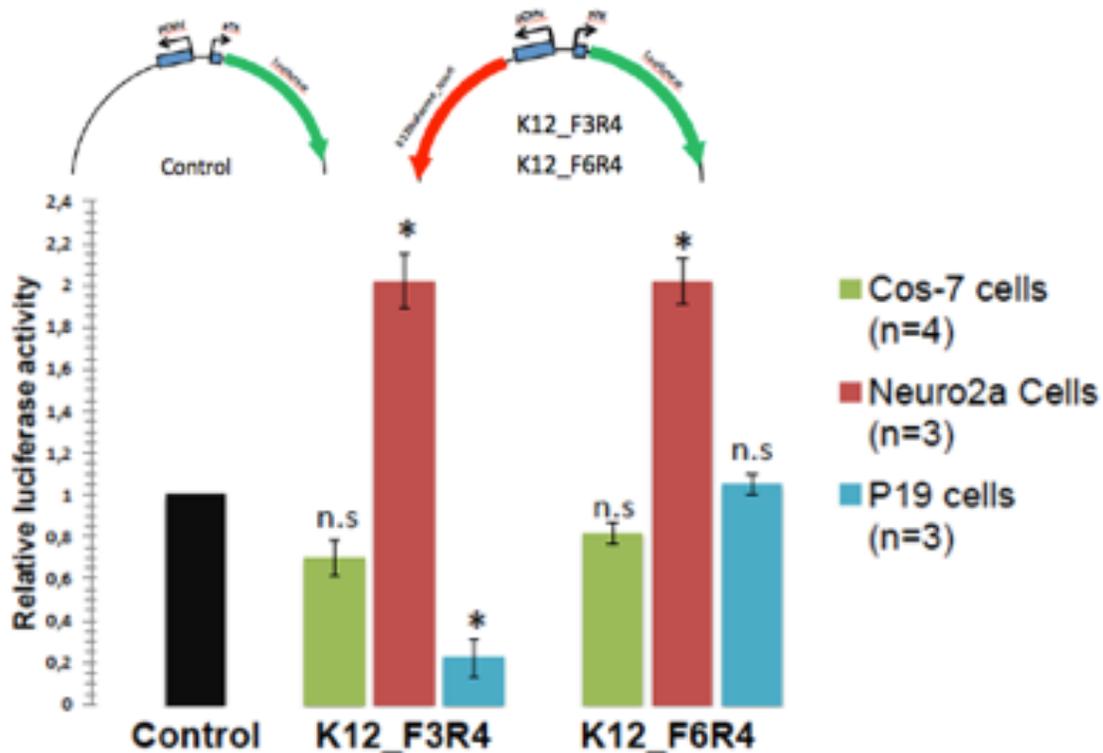


Figure 4.4 : *K12* a un effet en *cis* sur la transcription d'un gène voisin. Les essais luciférase ont été réalisés avec une construction qui contient une cassette d'expression contenant l'ADNc de *K12* sous le contrôle du promoteur CMV en direction opposé du gène rapporteur de la luciférase sous le contrôle du promoteur minimal TK. Les deux isoformes de *K12* testés augmentent l'expression de la luciférase par 2 dans les Neuro2a (n=3, $p \leq 0.05$). En revanche, dans les P19 seul un des deux isoformes testé (F3R4) semble avoir un effet sur l'expression de la luciférase et l'effet est opposé de celui observé dans les Neuro2a: dans les P19, *K12_F3R4* réprime l'expression de la luciférase (n=3, $p \leq 0.05$). Aucun effet n'est observable dans les COS7 (n=4).

CHAPITRE 5: DISCUSSION

La lignée Spot est un nouveau modèle pour la maladie de Hirschsprung (HSCR ou mégacôlon aganglionnaire). Dans ce modèle, le mégacôlon aganglionnaire est dû au fait que les CCNe des embryons Spot^{Tg/Tg} se différencient prématurément en cellules gliales au détriment des progéniteurs non-différenciés à cause de la surexpression de la paire de gènes *Nr2f1/K12* (Bergeron et al., 2016). De manière intéressante un phénotype similaire a déjà été observé dans une autre étude qui s'intéresse à la voie Hedgehog dans les mécanismes pathogéniques de HSCR. Cette étude a montré que la délétion de *Ptch1* chez la souris entraîne, comme chez Spot, une gliogenèse prématurée au détriment des progéniteurs suggérant ainsi que l'activation de la voie Hedgehog mènerait à une différenciation gliale précoce (Ngan et al., 2011). Cette observation a été renforcée par une autre étude qui a récemment permis d'identifier des mutations activatrices dans les gènes *GLI* chez des patients atteints de HSCR. De plus, ce groupe a montré que le ratio du nombre de neurones par rapport au nombre de cellules gliales était inversement corrélé avec l'activité de Gli suggérant ainsi que l'activation de la voie Hedgehog serait impliquée dans la gliogenèse entérique (Liu et al., 2015). Sachant que les acteurs de la voie Hedgehog ne sont que faiblement dérégulés chez Spot (Tableau I), nous avons émis l'hypothèse que *Nr2f1* serait en aval dans la voie de signalisation contrôlant la différenciation gliale entérique. Bien que le rôle du facteur de transcription NR2F1 pendant le développement du SNE ne soit pas encore connu, il a déjà été associé au contrôle de la différenciation neurale dans d'autres divisions du système nerveux, tout comme son paralogue NR2F2 (Naka et al., 2008; Yamaguchi et al., 2004). Sachant que NR2F1 et NR2F2 sont pratiquement identiques en termes de fonction moléculaire (Tsai et Tsai, 1997), que ces fonctions semblent pouvoir se

compenser (Naka et al., 2008; Tsai et Tsai, 1997) et que leurs gènes sont co-exprimés dans les CCN (Tableau I) nous pensons que NR2F2 est également impliquée dans la gliogenèse du SNE. Il est intéressant de noter que bien qu'aucun lien ne soit connu entre *Nr2f1* et la voie Hedgehog, il a été démontré que SHH active l'expression de *Nr2f2* dans des cellules P19 (Krishnan, Pereira, et al., 1997).

Les résultats de nos traitements avec différentes concentrations de SHH sur des cellules P19 semblent confirmer que *Nr2f2* est régulé par Sonic Hedgehog. De plus, *Nr2f1* est lui aussi activé par SHH mais contrairement à *Nr2f2*, son expression diminue à partir d'une certaine concentration de SHH comprise entre 200 et 500 ng/mL (Figure 4.1). Il est possible que *Nr2f1* soit donc sous le contrôle d'une boucle de rétroaction négative. Une autre possibilité est que *Nr2f1* et *Nr2f2* ne répondent pas de la même manière à SHH. En effet, il a été montré que l'induction de *Nr2f2* par SHH dans les cellules P19 est dépendante de la liaison d'un facteur distinct de Gli à son promoteur et que cette liaison est médiée par une phosphatase (Krishnan, Pereira, et al., 1997). Si l'expression de *Nr2f1* est quand à elle induite par la voie canonique de Sonic Hedgehog (c.à.d. dépendante de Gli) alors cela pourrait expliquer la différence observée avec *Nr2f2*. De plus, il est connu que cette voie est soumise à une boucle de rétroaction négative ce qui pourrait expliquer le fait que le niveau d'induction n'est pas proportionnel à la concentration de SHH pour *Nr2f1* (Cohen et al., 2015) (Figure 4.1). Il serait possible de distinguer ces deux effets en bloquant l'induction médiée par une phosphatase grâce à un inhibiteur de phosphatase afin de pouvoir observer uniquement l'effet de la voie canonique (Krishnan, Pereira, et al., 1997). Bien que les marqueurs de cellules gliales entériques *Fabp7*, *Plp1* et *Mpz* soient tous les trois activés par le traitement SHH, leur niveau d'induction n'est pas

proportionnel à celui *Nr2f1* ou *Nr2f2* ou à la concentration de SHH utilisée (Figure 4.1). Il est surprenant que l'expression de *Fabp7* ne suive pas celle de *Nr2f1* car *Fabp7* est une cible directe de NR2F1 dans le système nerveux central (Montemayor et al., 2010). En effet, il a été démontré que NR2F1 se lie au promoteur de *Fabp7* et que sa liaison est associée avec une chromatine active (acétylation H3K9) et un enrichissement des protéines co-activatrices CBP et SRC1 (Montemayor et al., 2010). Il est cependant possible que des mécanismes de régulation ou des partenaires d'interactions différents entrent en jeu dans la régulation de *Fabp7* dans les cellules P19.

Mpz et *Plp1* ne sont pas des cibles connues de la voie Hedgehog ni des facteurs de transcription NR2F1 et NR2F2, il est donc intéressant d'avoir observé leur activation pour des concentration de SHH de 200 et 500 ng/mL (Figure 4.1). Le fait que leur niveau d'induction ne semble pas suivre ni la concentration de SHH ni le niveau d'expression de *Nr2f1* ou *Nr2f2* suggère une relation indirecte et l'existence d'autres intermédiaires dans cette voie. De plus, cette expérience ne permet pas de déterminer si l'effet observé est dû à l'activation de la voie Hedgehog ou est un effet secondaire provoqué par l'induction d'autres gènes incluant *Nr2f1* et *Nr2f2*. Comme mentionné dans l'introduction, il a été suggéré dans d'autres études que, dans les CCN entérique, Hedgehog contrôlerait la différenciation gliale en activant la voie Notch par la régulation à la hausse du ligand membranaire DLL1 (Ngan et al., 2011). Il serait donc intéressant de regarder si l'activation des différents gènes induits par SHH observée dans nos expériences est dépendante ou non de cette voie.

Dans la signalisation Hedgehog, les protéines de la famille Hedgehog se lient au récepteur PTCH ce qui perturbe la suppression de SMO par PTCH. L'activation de SMO déclenche ensuite une série d'événements qui mènent à la transcription des cibles dépendantes de Gli

(**Figure 1.7**). La cyclopamine est une petite molécule qui se lie à SMO et l'inactive, inhibant ainsi la voie Hedgehog en aval de PTCH (Chen, Taipale, Cooper et Beachy, 2002). Nous avons voulu vérifier si l'inhibition de la voie Hedgehog pendant le développement du SNE a un effet sur l'expression de *Nr2f1* ainsi que du marqueur glial le plus précoce *Fabp7* par les CCN entériques (Figure 4.2). L'inhibition de la voie Hedgehog par la cyclopamine diminue effectivement l'expression de *Nr2f1* et *Fabp7* renforçant notre hypothèse que la voie Hedgehog est impliquée dans la régulation de *Nr2f1* et ultimement dans la gliogenèse des CCN entériques (**Figure 4.2**). Cependant, la cyclopamine inhibe complètement la signalisation Hedgehog et il serait donc intéressant de réaliser cette expérience avec de la robotnikinin qui est une petite molécule qui se lie à la queue N-terminal de SHH afin d'inhiber la voie en aval de SMO ce qui permettrait de déterminer si l'effet est dépendant du ligand SHH ou d'un autre ligand de la famille Hh (Stanton et Peng, 2010).

Enfin, la troisième expérience réalisée suggère que les facteurs de transcriptions NR2F1 et/ou NR2F2 sont requis pour la différenciation des cellules gliales entériques. Il serait intéressant de répéter cette expérience en inhibant seulement l'un de ces deux gènes afin de pouvoir découpler leurs effets respectifs.

En résumé nos résultats soutiennent notre modèle dans lequel la gliogenèse entérique induite par l'activation de la voie Hedgehog passe par l'activation de *Nr2f1* et/ou *Nr2f2* mais d'autres travaux seront nécessaires pour mieux décrire le réseau de régulation complexe qui est à la tête de la différenciation gliales des CCN entérique.

Nos résultats d'essais luciférase montrent que, conformément à notre hypothèse, *K12* possède la capacité de réguler un gène voisin en cis (**Figure 4.4**) L'absence d'effet dans les cellules COS7 qui sont des cellules rénales de singes suggère que l'effet de *K12* est spécifique au type cellulaire ou à l'espèce. De manière intéressante nous avons observé que l'isoforme *K12_F3R4* a un effet opposé dans les cellules P19 et les cellules Neuro2a alors que *K12_F6R4* est activateur dans les cellules Neuro2a mais n'a pas d'effet dans les cellules P19. Cette observation suggère que l'effet de *K12* sur la luciférase pourrait être dépendant du contexte cellulaire et donc par exemple de la présence de partenaire d'interactions spécifique ou de protéines régulatrices présentes dans un type cellulaire mais absente de l'autre. D'autre part, cela suggère aussi que les transcrits des isoformes *K12_F3R4* et *K12_F6R4* n'ont pas le même effet ou alors que l'effet ne serait pas dépendant du transcrit mais d'un ou plusieurs élément(s) d'ADN présent dans la séquence de l'un mais absent de celle de l'autre. En effet, comme mentionné dans l'introduction plusieurs mécanismes sont envisageables dans la régulation en cis d'un gène par un lncRNA. Afin de déterminer si l'effet observé est dépendant ou non du transcrit mature, il serait intéressant de bloquer la transcription de *K12* en insérant un signal de polyadénylation directement en aval du promoteur CMV puis regarder si l'effet persiste (Paralkar et al., 2016). Il est aussi possible que le lncRNA *K12* interagisse avec des protéines régulatrices à proximité de son TSS pendant ou peu après sa transcription ce qui affecterait la transcription de la luciférase. Pour tester cette hypothèse, il serait intéressant d'utiliser la méthode CRISPR-Display afin de diriger le lncRNA *K12* à proximité du promoteur de la luciférase (ou éventuellement directement sur le locus de *Nr2f1*) permettant ainsi de n'observer que l'effet vient du transcrit et non de celui de l'ADN (Shechner, Hacısüleyman, Younger et Rinn, 2015). De plus, après avoir identifié des partenaires d'interactions par isolation, purification et analyse

par spectrométrie de masse (Gumireddy, Yan et Huang, 2016), il serait possible de tester l'effet de l'interaction entre ces différentes protéines et le lncRNA en effectuant des co-recrutements. Par exemple, dans une expérience similaire à celle que nous avons effectuée le lncRNA *HOTTIP* est exprimé en *trans* et n'a un effet régulateur que s'il est recruté avec la protéine WDR5 à proximité du promoteur de la luciférase (Wang et al., 2011). Plus récemment un nouveau type de lncRNA divergent et chevauchant qui est capable d'augmenter la traduction d'un ARNm cible sans en affecter sa transcription a été identifié. Ce type de lncRNA a été nommé SINEUP, car il repose sur la présence d'une séquence **SINEB2** inversée pour réguler à la hausse (**UP-regulate**) la traduction de l'ARNm cible. La spécificité du SINEUP repose sur sa complémentarité avec une partie de l'ARNm (Zucchelli et al., 2015). Nous avons remarqué qu'un des transcrits de *K12* que nous n'avons pas encore testé possède l'organisation caractéristique d'un SINEUP (Figure 5.1). Il est intéressant de noter que ce transcrit partage aussi une certaine complémentarité avec *Nr2f2* et pourrait donc être également impliqué sa régulation. Afin de déterminer si ce transcrit de *K12* est effectivement un SINEUP, il serait nécessaire de l'exprimer en cellules, avec ou sans délétion de l'élément SINEB2 ou du domaine complémentaire à *Nr2f1*, puis de mesurer l'expression de *Nr2f1* et *Nr2f2* au niveau de la transcription et de la traduction par RT-PCR et Western Blot.

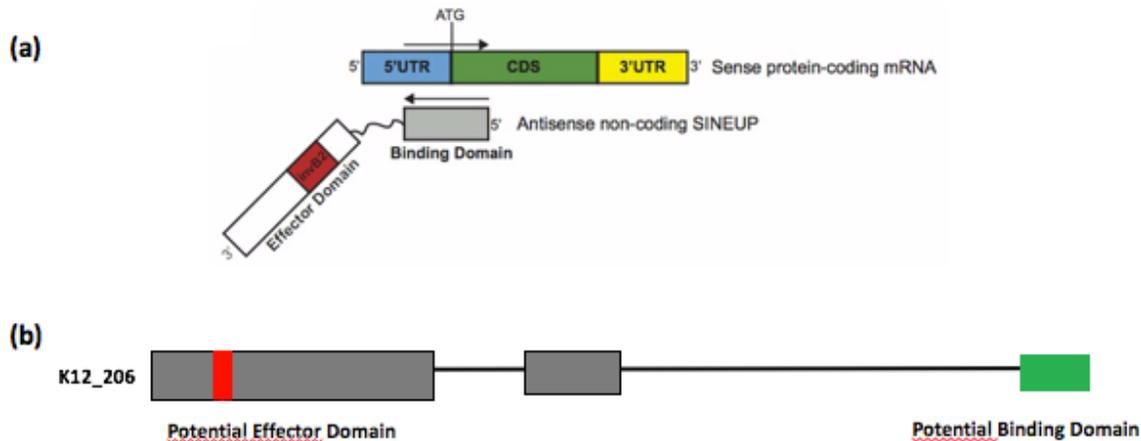


Figure 5.1 : Un des transcrit *K12* possède l'organisation caractéristique d'un SINEUP. (a) Un SINEUP est composé d'un domaine de liaison complémentaire à l'ARNm du gène sens et d'un domaine effecteur qui contient une séquence SINEB2 inversée. (b) Un des transcrit de *K12* (*K12_206*) possède un domaine de liaison potentiel (vert) de 208 nt et un domaine effecteur potentiel qui contient une séquence SINEB2 inversée (rouge). Adapté de (Zucchelli et al., 2015)

Ainsi, bien que nos résultats indiquent que *K12* est capable de réguler un gène voisin en cis, le ou les mécanismes impliqués reste encore inconnus. Les différentes possibilités de mécanismes discutées ici sont toutes envisageables et ne sont pas mutuellement exclusives. Plus d'expériences comme celles qui ont été proposées seront nécessaires pour mieux comprendre le mécanisme impliqué dans la régulation de *Nr2f1* et possiblement *Nr2f2* par *K12*.

Enfin, il est intéressant de noter que le locus de *Nr2f2* présente une organisation très similaire à celle du locus de *Nr2f1/K12* et qu'il contient lui aussi un gène de lncRNA. De plus, une étude récente suggère que ce lncRNA aurait un rôle régulateur important bien que les évidences restent minces (Wang et al., 2017). Il serait donc intéressant de vérifier si les lncRNA respectif de *Nr2f1* et *Nr2f2* partagent des mécanismes de régulation communs.

CHAPITRE 6: CONCLUSION

En résumé les résultats obtenus semblent en accord avec nos hypothèses. En effet, bien que d'autres expériences soient nécessaires pour mieux comprendre les mécanismes et la relation entre les différents acteurs impliqués dans la régulation de la différenciation gliale des CCN entérique, nos résultats suggèrent que la gliogenèse entérique induite par Sonic Hedgehog est effectivement médiée par les facteurs de transcription NR2F1/2. D'autre part, nos résultats montrent que le lncRNA K12 est effectivement capable de réguler un gène voisin en *cis* mais d'autres expériences seront nécessaires pour déterminer plus précisément par quel(s) mécanisme(s) cette régulation s'effectue.

Bibliographie

1. Anderson, K. M., Anderson, D. M., McAnally, J. R., Shelton, J. M., Bassel-Duby, R. et Olson, E. N. (2016). Transcription of the non-coding RNA upperhand controls Hand2 expression and heart development. *Nature*, 539(7629), 433-436. doi: 10.1038/nature20128
2. Bergeron, K. F., Nguyen, C. M., Cardinal, T., Charrier, B., Silversides, D. W. et Pilon, N. (2016). Upregulation of the Nr2f1-A830082K12Rik gene pair in murine neural crest cells results in a complex phenotype reminiscent of Waardenburg syndrome type 4. *Dis Model Mech*, 9(11), 1283-1293. doi: 10.1242/dmm.026773
3. Bergeron, K. F., Silversides, D. W. et Pilon, N. (2013). The developmental genetics of Hirschsprung's disease. *Clin Genet*, 83(1), 15-22. doi: 10.1111/cge.12032
4. Bitgood, M. J. et McMahon, A. P. (1995). Hedgehog and Bmp genes are coexpressed at many diverse sites of cell-cell interaction in the mouse embryo. *Dev Biol*, 172(1), 126-138. doi: 10.1006/dbio.1995.0010
5. Boesmans, W., Lasrado, R., Vanden Berghe, P. et 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
6. Bondurand, N. et Sham, M. H. (2013). The role of SOX10 during enteric nervous system development. *Dev Biol*, 382(1), 330-343. doi: 10.1016/j.ydbio.2013.04.024
7. Burns, A. J., Champeval, D. et Le Douarin, N. M. (2000). Sacral neural crest cells colonise aganglionic hindgut in vivo but fail to compensate for lack of enteric ganglia. *Dev Biol*, 219(1), 30-43. doi: 10.1006/dbio.1999.9592
8. Chalazonitis, A., D'Autreaux, F., Pham, T. D., Kessler, J. A. et Gershon, M. D. (2011). Bone morphogenetic proteins regulate enteric gliogenesis by modulating ErbB3 signaling. *Dev Biol*, 350(1), 64-79. doi: 10.1016/j.ydbio.2010.11.017
9. Charrier, B. et Pilon, N. (2017). Toward a better understanding of enteric gliogenesis. *Neurogenesis (Austin)*, 4(1), e1293958. doi: 10.1080/23262133.2017.1293958
10. Chen, H., Thiagalingam, A., Chopra, H., Borges, M. W., Feder, J. N., Nelkin, B. D., . . . Ball, D. W. (1997). Conservation of the Drosophila lateral inhibition pathway in human lung cancer: a hairy-related protein (HES-1) directly represses achaete-scute homolog-1 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(10), 5355-5360.

11. Chen, J. K., Taipale, J., Cooper, M. K. et Beachy, P. A. (2002). Inhibition of Hedgehog signaling by direct binding of cyclopamine to Smoothed. *Genes Dev*, 16(21), 2743-2748. doi: 10.1101/gad.1025302
12. Chiang, D. Y., Cuthbertson, D. W., Ruiz, F. R., Li, N. et Pereira, F. A. (2013). A coregulatory network of NR2F1 and microRNA-140. *PLoS One*, 8(12), e83358. doi: 10.1371/journal.pone.0083358
13. Cohen, M., Kicheva, A., Ribeiro, A., Blassberg, R., Page, K. M., Barnes, C. P. et Briscoe, J. (2015). Ptch1 and Gli regulate Shh signalling dynamics via multiple mechanisms. *Nat Commun*, 6, 6709. doi: 10.1038/ncomms7709
14. Echelard, Y., Epstein, D. J., St-Jacques, B., Shen, L., Mohler, J., McMahon, J. A. et McMahon, A. P. (1993). Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell*, 75(7), 1417-1430.
15. Engreitz, J. M., Haines, J. E., Perez, E. M., Munson, G., Chen, J., Kane, M., . . . Lander, E. S. (2016). Local regulation of gene expression by lncRNA promoters, transcription and splicing. *Nature*, 539(7629), 452-455. doi: 10.1038/nature20149
16. Furness, J. B. (2000). Types of neurons in the enteric nervous system. *J Auton Nerv Syst*, 81(1-3), 87-96.
17. Furness, J. B. (2012). The enteric nervous system and neurogastroenterology. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 9(5), 286-294. doi: 10.1038/nrgastro.2012.32
18. Furness, J. B., Callaghan, B. P., Rivera, L. R. et Cho, H. J. (2014). The enteric nervous system and gastrointestinal innervation: integrated local and central control. *Adv Exp Med Biol*, 817, 39-71. doi: 10.1007/978-1-4939-0897-4_3
19. Gabella, G. (1971). Glial cells in the myenteric plexus. *Z Naturforsch B*, 26(3), 244-245.
20. Gammill, L. S. et Bronner-Fraser, M. (2003). Neural crest specification: migrating into genomics. *Nat Rev Neurosci*, 4(10), 795-805. doi: 10.1038/nrn1219
21. Goldstein, A. M., Hofstra, R. M. et Burns, A. J. (2013). Building a brain in the gut: development of the enteric nervous system. *Clin Genet*, 83(4), 307-316. doi: 10.1111/cge.12054
22. Grubisic, V. et Gulbransen, B. D. (2016). Enteric glia: the most alimentary of all glia. *J Physiol*. doi: 10.1113/JP271021
23. Guil, S. et Esteller, M. (2012). Cis-acting noncoding RNAs: friends and foes. *Nat Struct Mol Biol*, 19(11), 1068-1075. doi: 10.1038/nsmb.2428
24. Gulbransen, B. D. et 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

25. Gumireddy, K., Yan, J. et Huang, Q. (2016). Isolation of Protein Complexes Associated with Long Noncoding RNAs. *Methods Mol Biol*, 1402, 27-32. doi: 10.1007/978-1-4939-3378-5_4
26. Hao, M. M. et 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
27. Jonk, L. J., de Jonge, M. E., Pals, C. E., Wissink, S., Vervaart, J. M., Schoorlemmer, J. et 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.
28. Joseph, N. M., He, S., Quintana, E., Kim, Y. G., Nunez, G. et 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
29. Kapranov, P., Cheng, J., Dike, S., Nix, D. A., Dutttagupta, 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
30. Kim, J., Lo, L., Dormand, E. et Anderson, D. J. (2003). SOX10 maintains multipotency and inhibits neuronal differentiation of neural crest stem cells. *Neuron*, 38(1), 17-31.
31. Krishnan, V., Elberg, G., Tsai, M. J. et Tsai, S. Y. (1997). Identification of a novel sonic hedgehog response element in the chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor II promoter. *Mol Endocrinol*, 11(10), 1458-1466. doi: 10.1210/mend.11.10.9992
32. Krishnan, V., Pereira, F. A., Qiu, Y., Chen, C. H., Beachy, P. A., Tsai, S. Y. et Tsai, M. J. (1997). Mediation of Sonic hedgehog-induced expression of COUP-TFII by a protein phosphatase. *Science*, 278(5345), 1947-1950.
33. Lake, J. I. et 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
34. Laranjeira, C., Sandgren, K., Kessaris, N., Richardson, W., Potocnik, A., Vanden Berghe, P. et 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
35. Lear, J. T., Corner, C., Dziewulski, P., Fife, K., Ross, G. L., Varma, S. et Harwood, C. A. (2014). Challenges and new horizons in the management of advanced basal cell carcinoma: a UK perspective. *Br J Cancer*, 111(8), 1476-1481. doi: 10.1038/bjc.2014.270
36. Lee, J. T. (2009). Lessons from X-chromosome inactivation: long ncRNA as guides and tethers to the epigenome. *Genes Dev*, 23(16), 1831-1842. doi: 10.1101/gad.1811209

37. 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*, *149*(7), 1837-1848 e1835. doi: 10.1053/j.gastro.2015.07.060
38. Liu, J. A. et Ngan, E. S. (2014). Hedgehog and Notch signaling in enteric nervous system development. *Neurosignals*, *22*(1), 1-13. doi: 10.1159/000356305
39. Methot, D., Reudelhuber, T. L. et 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.
40. Montemayor, C., Montemayor, O. A., Ridgeway, A., Lin, F., Wheeler, D. A., Pletcher, S. D. et Pereira, F. A. (2010). Genome-wide analysis of binding sites and direct target genes of the orphan nuclear receptor NR2F1/COUP-TFI. *PLoS One*, *5*(1), e8910. doi: 10.1371/journal.pone.0008910
41. Morrison, S. J., Perez, S. E., Qiao, Z., Verdi, J. M., Hicks, C., Weinmaster, G. et Anderson, D. J. (2000). Transient Notch activation initiates an irreversible switch from neurogenesis to gliogenesis by neural crest stem cells. *Cell*, *101*(5), 499-510.
42. Naka, H., Nakamura, S., Shimazaki, T. et 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
43. Naka-Kaneda, H., Nakamura, S., Igarashi, M., Aoi, H., Kanki, H., Tsuyama, J., . . . Okano, H. (2014). The miR-17/106-p38 axis is a key regulator of the neurogenic-to-gliogenic transition in developing neural stem/progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *111*(4), 1604-1609. doi: 10.1073/pnas.1315567111
44. Neunlist, M., Rolli-Derkinderen, M., Latorre, R., Van Landeghem, L., Coron, E., Derkinderen, P. et De Giorgio, R. (2014). Enteric glial cells: recent developments and future directions. *Gastroenterology*, *147*(6), 1230-1237. doi: 10.1053/j.gastro.2014.09.040
45. Neunlist, M., Van Landeghem, L., Mahe, M. M., Derkinderen, P., des Varannes, S. B. et Rolli-Derkinderen, M. (2013). The digestive neuronal-glial-epithelial unit: a new actor in gut health and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, *10*(2), 90-100. doi: 10.1038/nrgastro.2012.221
46. 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
47. Nishino, J., Saunders, T. L., Sagane, K. et Morrison, S. J. (2010). Lgi4 promotes the proliferation and differentiation of glial lineage cells throughout the developing peripheral nervous system. *J Neurosci*, *30*(45), 15228-15240. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2286-10.2010

48. Okamura, Y. et Saga, Y. (2008). Notch signaling is required for the maintenance of enteric neural crest progenitors. *Development*, 135(21), 3555-3565. doi: 10.1242/dev.022319
49. 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
50. Paralkar, V. R., Taborda, C. C., Huang, P., Yao, Y., Kossenkov, A. V., Prasad, R., . . . Weiss, M. J. (2016). Unlinking an lncRNA from Its Associated cis Element. *Mol Cell*, 62(1), 104-110. doi: 10.1016/j.molcel.2016.02.029
51. Pham, T. D., Gershon, M. D. et Rothman, T. P. (1991). Time of origin of neurons in the murine enteric nervous system: sequence in relation to phenotype. *J Comp Neurol*, 314(4), 789-798. doi: 10.1002/cne.903140411
52. Pilon, N. (2016). Pigmentation-based insertional mutagenesis is a simple and potent screening approach for identifying neurocristopathy-associated genes in mice. *Rare Dis*, 4(1), e1156287. doi: 10.1080/21675511.2016.1156287
53. Pilon, N., Raiwet, D., Viger, R. S. et 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
54. Qiu, Y., Krishnan, V., Pereira, F. A., Tsai, S. Y. et Tsai, M. J. (1996). Chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factors and their regulation. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 56(1-6 Spec No), 81-85.
55. Quinn, J. J. et Chang, H. Y. (2016). Unique features of long non-coding RNA biogenesis and function. *Nat Rev Genet*, 17(1), 47-62. doi: 10.1038/nrg.2015.10
56. Ramalho-Santos, M., Melton, D. A. et McMahon, A. P. (2000). Hedgehog signals regulate multiple aspects of gastrointestinal development. *Development*, 127(12), 2763-2772.
57. Rao, M., Nelms, B. D., Dong, L., Salinas-Rios, V., Rutlin, M., Gershon, M. D. et Corfas, G. (2015). Enteric glia express proteolipid protein 1 and are a transcriptionally unique population of glia in the mammalian nervous system. *Glia*. doi: 10.1002/glia.22876
58. Rothman, T. P., Tennyson, V. M. et 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
59. Rubinson, D. A., Dillon, C. P., Kwiatkowski, A. V., Sievers, C., Yang, L., Kopinja, J., . . . Van Parijs, L. (2003). A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference. *Nat Genet*, 33(3), 401-406. doi: 10.1038/ng1117

60. Ruhl, A. (2005). Glial cells in the gut. *Neurogastroenterol Motil*, 17(6), 777-790. doi: 10.1111/j.1365-2982.2005.00687.x
61. Sharkey, K. A. (2015). Emerging roles for enteric glia in gastrointestinal disorders. *J Clin Invest*, 125(3), 918-925. doi: 10.1172/JCI76303
62. Shechner, D. M., Hacısüleyman, E., Younger, S. T. et Rinn, J. L. (2015). CRISPR Display: A modular method for locus-specific targeting of long noncoding RNAs and synthetic RNA devices in vivo. *Nature methods*, 12(7), 664-670. doi: 10.1038/nmeth.3433
63. Stanton, B. Z. et Peng, L. F. (2010). Small-molecule modulators of the Sonic Hedgehog signaling pathway. *Mol Biosyst*, 6(1), 44-54. doi: 10.1039/b910196a
64. Taylor, M. K., Yeager, K. et Morrison, S. J. (2007). Physiological Notch signaling promotes gliogenesis in the developing peripheral and central nervous systems. *Development*, 134(13), 2435-2447. doi: 10.1242/dev.005520
65. Tsai, S. Y. et 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
66. Uesaka, T., Nagashimada, M. et Enomoto, H. (2015). Neuronal Differentiation in Schwann Cell Lineage Underlies Postnatal Neurogenesis in the Enteric Nervous System. *J Neurosci*, 35(27), 9879-9888. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1239-15.2015
67. Villegas, V. E. et Zaphiropoulos, P. G. (2015a). Neighboring gene regulation by antisense long non-coding RNAs. *Int J Mol Sci*, 16(2), 3251-3266. doi: 10.3390/ijms16023251
68. Villegas, V. E. et Zaphiropoulos, P. G. (2015b). Neighboring Gene Regulation by Antisense Long Non-Coding RNAs. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(2), 3251-3266. doi: 10.3390/ijms16023251
69. Wakamatsu, Y., Maynard, T. M. et Weston, J. A. (2000). Fate determination of neural crest cells by NOTCH-mediated lateral inhibition and asymmetrical cell division during gangliogenesis. *Development*, 127(13), 2811-2821.
70. Walterhouse, D. O., Yoon, J. W. et Iannaccone, P. M. (1999). Developmental pathways: Sonic hedgehog-Patched-GLI. *Environ Health Perspect*, 107(3), 167-171.
71. Wang, J., Hua, L., Chen, J., Zhang, J., Bai, X., Gao, B., . . . Xing, B. (2017). Identification and characterization of long non-coding RNAs in subcutaneous adipose tissue from castrated and intact full-sib pair Huainan male pigs. *BMC Genomics*, 18(1), 542. doi: 10.1186/s12864-017-3907-z
72. 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

73. Yamaguchi, H., Zhou, C., Lin, S.-C., Durand, B., Tsai, S. Y. et Tsai, M.-J. (2004). The nuclear orphan receptor COUP-TFI is important for differentiation of oligodendrocytes. *Dev Biol*, 266(2), 238-251. doi: 10.1016/j.ydbio.2003.10.038
74. Yang, L., Froberg, J. E. et Lee, J. T. (2014). Long Noncoding RNAs: Fresh Perspectives into the RNA world. *Trends in biochemical sciences*, 39(1), 35-43. doi: 10.1016/j.tibs.2013.10.002
75. Yokoyama, T., Silversides, D. W., Waymire, K. G., Kwon, B. S., Takeuchi, T. et Overbeek, P. A. (1990). Conserved cysteine to serine mutation in tyrosinase is responsible for the classical albino mutation in laboratory mice. *Nucleic Acids Res*, 18(24), 7293-7298.
76. Young, H. M., Bergner, A. J. et 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
77. Zucchelli, S., Fasolo, F., Russo, R., Cimatti, L., Patrucco, L., Takahashi, H., . . . Gustincich, S. (2015). SINEUPs are modular antisense long non-coding RNAs that increase synthesis of target proteins in cells. *Front Cell Neurosci*, 9, 174. doi: 10.3389/fncel.2015.00174