

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

ANALYSE DE L'EFFET DES FACTEURS GÉNÉTIQUES ET
ENVIRONNEMENTAUX SUR LA SÉVÉRITÉ DU DÉFAUT DU SYSTÈME
NERVEUX ENTÉRIQUE CHEZ UN MODÈLE MURIN POUR LA MALADIE DE
HIRSCHSPRUNG

THÈSE
PRÉSENTÉE
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DU DOCTORAT EN BIOCHIMIE

PAR
ABOUBACRINE MAHAMANE TOURÉ

MARS 2019

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de cette thèse se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.07-2011). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Cette thèse de doctorat est le fruit du travail d'un vaste réseau de personnes, impliquant l'apport combiné des professeurs, des collègues de laboratoire, de la famille et des amis. Tout d'abord, je voudrais remercier mon directeur de recherche, le Dr Nicolas Pilon pour ses conseils, son soutien et sa patience tout au long de ces années. J'ai particulièrement apprécié les discussions sur mon sujet et ses nombreux conseils en matière de méthodologie de travail et pour mes recherches futures.

De plus, je voudrais remercier Dre Claire Bénard, Dr Marc Lussier et Dre Elyanne Ratcliffe pour avoir rejoint le comité d'évaluation et d'avoir révisé cette thèse.

Un merci spécial à mes collègues qui ont travaillé très fort pour faire avancer ce projet : Ouliana Souchkova, Baptiste Charrier, Dr Karl-F Bergeron, Tatiana Cardinal, Vanessa Deschambault, Marina Cefis, Emilie Beauvais et Dre Mélanie Béland. Je remercie également pour leur soutien et patience, les autres membres anciens et actuels du laboratoire Pilon : Guillaume Bernas, Dr Rodolphe Soret, Dre Oraly Sanchez-Ferras, Daniel Aguire, Dr Omar Farnos, Chloé Nguyen, Emilie Laberge-Perrault, Dr Benoît Grondin, Félix Antoine Bérubé, Catherine Bélanger, Grégoire Bonnamour et Dr Mostafa Esmael.

Je tiens également à remercier Dr Steven W. Kembel et son laboratoire, spécialement Mathieu Landry, pour leur collaboration sur le projet microbiote. De plus, je remercie pour leur soutien et conseils les autres membres du Centre de recherche BioMed – notamment Denis Flipo.

Enfin, un merci très spécial à mes ami(e)s et ma famille, mes professeurs tout au long de mon parcours académique, pour m'avoir aidé et encouragé à atteindre mon but.

DÉDICACE

À ma mère Mariame Diallo et ma
meilleure amie Dre Mélanie Grondin,
ma plus sincère et profonde reconnaissance
pour votre soutien et vos encouragements.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	ix
LISTE DES TABLEAUX.....	xiii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xiv
RÉSUMÉ	xvii
CHAPITRE I : REVUE DE LITTÉRATURE	1
1.1 Le système nerveux entérique (SNE)	1
1.1.1 Fonction et organisation	1
1.1.2 Composition du SNE.....	3
1.1.3 Régulation de la motricité intestinale par le SNE	16
1.1.4 Participation des cellules interstitielles de Cajal (CIC) dans la régulation de la motricité intestinale contrôlée par le SNE.....	22
1.2 Développement du SNE	25
1.2.1 Origine du SNE : Les cellules de la crête neurale (CCN)	25
1.2.2 La colonisation de l'intestin par les CCN	31
1.2.3 Les mécanismes cellulaires de la colonisation de l'intestin par les CCN.....	35
1.3 La maladie de Hirschsprung (HSCR)	40
1.3.1 Définition, épidémiologie, symptômes, classification et traitement	40
1.3.2 Contribution des facteurs génétiques dans HSCR.....	42
1.3.3 Contribution des facteurs environnementaux dans HSCR	50
1.4 Le microbiote intestinal	54
1.4.1 Définition et fonction du microbiote intestinal	54
1.4.2 Établissement du microbiote : Effet sur le développement postnatal du SNE	55
1.5 Hypothèses et Objectifs	57

1.5.1	Hypothèses	57
1.5.2	Objectif global	58
1.5.3	Objectifs spécifiques	58
CHAPITRE II : MALE-SPECIFIC COLON MOTILITY DYSFUNCTION IN THE <i>TASHT</i> MOUSE LINE.....		
2.1	Résumé	59
2.2	Abstract.....	60
2.3	Introduction.....	62
2.4	Materials and methods.....	63
2.4.1	Animals	65
2.4.2	Staining of acetylcholinesterase activity	66
2.4.3	Immunofluorescence	66
2.4.4	GI motility assays.....	67
2.4.5	Statistical analysis	68
2.5	Results	68
2.5.1	Male-specific impairment of colonic motility in adult <i>TashT^{Tg/Tg}</i> mice	68
2.5.2	Adult <i>TashT^{Tg/Tg}</i> mice exhibit male-biased hypoganglionosis and/or short-segment aganglionosis in the colon	69
2.5.3	Correlation between impaired colonic motility and aganglionosis/hypoganglionosis in adult <i>TashT^{Tg/Tg}</i> mice	71
2.5.4	Male-specific regional alteration of the neurochemical coding of myenteric ganglia in the distal colon of adult <i>TashT^{Tg/Tg}</i> mice.....	72
2.5.5	Status of interstitial cells of Cajal networks in the colon of adult <i>TashT^{Tg/Tg}</i> mice.....	73
2.6	Discussion.....	73
2.6.1	Role of myenteric plexus density in the male-biased colonic motility defect of <i>TashT^{Tg/Tg}</i> mice	74

2.6.2	Role of myenteric neuronal subtypes imbalance in the male-biased colonic motility defect of <i>TashT^{Tg/Tg}</i> mice	75
2.6.3	Implications for HSCR and other enteric neuropathies.....	76
2.7	Figures	79
2.8	Tables.....	104

CHAPITRE III : GUT MICROBIOTA-MEDIATED GENE-ENVIRONMENT INTERACTION IN THE *TASHT* MOUSE MODEL OF HIRSCHSPRUNG DISEASE

		106
3.1	Résumé	107
3.2	Abstract.....	109
3.3	Introduction.....	110
3.4	Results	113
3.4.1	Taxonomic composition of the colonic microbiota in wild-type, <i>TashT^{Tg/Tg}</i> and <i>Holstein^{Tg/Tg}</i> mice.....	113
3.4.2	Impact of early continuous antibiotic treatment on the fecal microbiota of wild-type and <i>TashT^{Tg/Tg}</i> male pups	114
3.4.3	Impact of antibiotics-induced dysbiosis on motility parameters in <i>TashT^{Tg/Tg}</i> male mice.....	115
3.4.4	Impact of antibiotics-induced dysbiosis on the density and composition of the myenteric plexus in <i>TashT^{Tg/Tg}</i> male pups	117
3.4.5	Impact of NO signaling inhibition on dysbiosis-induced fecal retention and life expectancy of <i>TashT^{Tg/Tg}</i> male mice	119
3.5	Discussion.....	120
3.5.1	A common microbiome signature independent of bowel obstruction in HSCR?.....	121
3.5.2	Prolonged course of antibiotics in early life periods impacts both the ENS and bowel motility	122
3.5.3	Antibiotic treatment in the context of HSCR	123

3.5.4	Contribution of the transition zone to the megacolon phenotype: implication for HSCR.....	123
3.6	Materials and methods.....	124
3.6.1	Animals	124
3.6.2	Sampling and quantification of fecal bacteria.....	125
3.6.3	Amplicon sequencing and bioinformatics.....	126
3.6.4	Tissue preparation and immunofluorescence	128
3.6.5	Gastrointestinal (GI) motility assays.....	129
3.6.6	Statistical analysis	129
3.7	Figures	132
3.8	Supplemental tables.....	161

CHAPITRE IV : THE *TASHT* LOCUS GENETICALLY INTERACTS WITH OTHER HIRSCHSPRUNG DISEASE-ASSOCIATED LOCI....

4.1	Résumé	165
4.2	Abstract.....	167
4.3	Introduction.....	168
4.4	Materials and methods.....	171
4.4.1	Animals	171
4.4.2	Staining of acetylcholinesterase activity	172
4.4.3	Statistical analysis	172
4.5	Results	172
4.5.1	Interaction between <i>TashT</i> and <i>Spot</i> loci	172
4.5.2	Interaction between <i>TashT</i> and <i>Holstein</i> loci	173
4.6	Discussion.....	174
4.6.1	Interactions between the <i>TashT</i> locus and <i>Spot</i> or <i>Holstein</i> loci: implication for ENS formation.....	175
4.6.2	Is the <i>Holstein</i> locus a modifier for the <i>TashT</i> locus?.....	176
4.6.3	Role of non-coding sequences in the pathogenesis of HSCR	176
4.7	Figures	179

4.8	Tables.....	182
CHAPITRE V : DISCUSSION, CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....		183
5.1	Les complications post-opératoires de HSCR : Implication de la zone de transition (ZT).....	183
5.2	La constipation associée à HSCR : Rôle de la densité neuronale et des neurones nitrergiques du plexus myentérique dans la ZT	184
5.3	L'antibiothérapie dans le contexte de HSCR.....	186
5.4	La dysbiose associée à HSCR : Cause ou conséquence de l'occlusion intestinale?	188
5.5	Le rôle des séquences non-codantes dans la pathogénèse de HSCR.....	190
5.6	Conclusion	191
5.7	Perspectives	192
APPENDICE A : AUTRES CONTRIBUTIONS SCIENTIFIQUES.....		194
APPENDICE B : PARTICIPATION À DES CONGRÈS SCIENTIFIQUES		196
APPENDICE C : PRIX ET DISTINCTIONS		199
BIBLIOGRAPHIE		200

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 Le système nerveux entérique (SNE).....	2
1.2 Organisation et topologie du SNE.	3
1.3 Ganglions entériques.....	4
1.4 Les principaux types morphologiques des neurones entériques dans l'intestin grêle du cobaye selon la classification Dogiel.....	6
1.5 Les différents types de neurones qui contrôlent la motricité du petit intestin.....	7
1.6 La morphologie des cellules gliales entériques (CGE).....	13
1.7 Les principaux marqueurs des CGE.....	14
1.8 L'innervation extrinsèque du tractus gastrointestinal (TGI).....	17
1.9 Représentation schématique du microcircuit neuronal à la base du reflexe péristaltique.....	20
1.10 Dessin des différentes sous populations des cellules interstitielles de Cajal (CIC) dans la paroi du tractus gastrointestinal.	24
1.11 Formation du tube neural et de la crête neurale.	26
1.12 Les différentes régions de la crête neurale et le devenir des cellules qui en dérivent.....	28
1.13 Illustration du réseau de gènes régulateurs qui contrôlent le développement de la crête neurale ainsi que ses dérivés cellulaires.....	29
1.14 Les étapes de développement du SNE.	34
1.15 Représentation schématiques illustrant les voies de la biosynthèse, l'action et le catabolisme de l'acide rétinoïque (AR).	53
2.1 Fecal retention in the colon of adult <i>TashT^{Tg/Tg}</i> males.	80
2.2. Impaired gastrointestinal (GI) motility in adult <i>TashT^{Tg/Tg}</i> males.	82

2.3	Adult <i>TashT^{Tg/Tg}</i> mice exhibit male-biased short-segment aganglionosis and hypoganglionosis.....	84
2.4	Correlation between distal colonic transit time and extent of hypoganglionosis or aganglionosis exhibited by adult <i>TashT^{Tg/Tg}</i> mice.....	86
2.5	The proportion of Calretinin ⁺ myenteric neurons is unaffected in adult <i>TashT^{Tg/Tg}</i> mice.	88
2.6	Male-specific and regionally-restricted increase of nNos ⁺ neuron numbers in myenteric ganglia of adult <i>TashT^{Tg/Tg}</i> mice.	90
S2.1	Illustration of a mouse gastrointestinal tract showing the position of the subregions that were used in this study.....	91
S2.2	Complete visual analysis of fecal impaction in <i>TashT^{Tg/Tg}</i> mice.....	91
S2.3	Colonic distention cannot explain the robust decrease in myenteric plexus density displayed by adult <i>TashT^{Tg/Tg}</i> males.....	92
S2.4	Male-biased reduced myenteric neuronal density in the colon of adult <i>TashT^{Tg/Tg}</i> mice.	93
S2.5	The myenteric neuronal density is unaffected in the duodenum of adult <i>TashT^{Tg/Tg}</i> mice.	95
S2.6	Inter-sex comparative analyses of myenteric plexus density and neuron numbers in age-matched <i>TashT^{Tg/Tg}</i> mice.....	96
S2.7	The neuron: glia ratio within myenteric ganglia is unchanged in the distal colon of adult <i>TashT^{Tg/Tg}</i> mice.....	98
S2.8	The proportion of nNos ⁺ myenteric neurons is unaffected in the hypoganglionic DC of adult <i>TashT^{Tg/Tg}</i> females.....	100
S2.9	The proportion of nNos ⁺ myenteric neurons is not altered in the proximal MC of adult <i>TashT^{Tg/Tg}</i> males.....	102
S2.10	Distribution of interstitial cells of Cajal (ICC) in hypoganglionic distal DC of adult <i>TashT^{Tg/Tg}</i> mice.....	103

3.1	Basal bacterial composition of colonic content from wild-type, <i>TashT^{Tg/Tg}</i> (with or without megacolon) and <i>Holstein^{Tg/Tg}</i> mice at P21-22.	133
3.2	Antibiotics-induced dysbiosis in wild-type and <i>TashT^{Tg/Tg}</i> mice at P28-30.	135
3.3	Antibiotics-induced dysbiosis specifically impacts survival and motility parameters of <i>TashT^{Tg/Tg}</i> male mice.	137
3.4	Impact of antibiotics-induced dysbiosis on neuronal density and proportion of nitrergic neurons in the myenteric plexus of wild-type and <i>TashT^{Tg/Tg}</i> male mice at P22-23.	138
3.5	Impact of antibiotics-induced dysbiosis on neuronal density and proportion of nitrergic neurons in the myenteric plexus of wild-type and <i>TashT^{Tg/Tg}</i> male mice at P30-36.	139
3.6	Impact of antibiotics-induced dysbiosis on the proportion of cholinergic neurons in the myenteric plexus of <i>TashT^{Tg/Tg}</i> male mice at P30-36.	140
3.7	Correlations between neuronal density, increased proportion of nitrergic neurons and fecal retention in <i>TashT^{Tg/Tg}</i> male mice at P30-36.	142
3.8	Impact of inhibition of NO signaling on fecal retention and life expectancy of <i>TashT^{Tg/Tg}</i> male mice exposed or not to antibiotics.	143
S3.1	Sex-stratified analysis of colonic bacterial composition in wild-type mice at P21-22.	145
S3.2	Genotype- and phenotype-stratified analysis of colonic bacterial composition in wild-type, <i>TashT^{Tg/Tg}</i> and <i>Holstein^{Tg/Tg}</i> male mice at P21-22.	147
S3.3	Sex- and phenotype-stratified analysis of colonic bacterial composition in <i>TashT^{Tg/Tg}</i> mice at P21-22.	149
S3.4	Alpha- and beta-diversity comparisons of gut microbiomes of wild-type and megacolon mouse lines at P21-22.	151

S3.5	Alpha- and beta-diversity comparisons of gut microbiomes of wild-type and <i>TashT^{Tg/Tg}</i> P28-30 mice exposed or not to antibiotics.....	153
S3.6	Genotype-stratified analysis of colonic bacterial composition as a function of antibiotic treatment in WT and <i>TashT^{Tg/Tg}</i> mice at P28-30.	155
S3.7	Impact of antibiotic treatment on bodyweight, cecum size and mucosal glia.....	156
S3.8	Representative images of the quantification of neuronal density and proportion of nitrergic and cholinergic neurons.	157
S3.9	Impact of antibiotics-induced dysbiosis on myenteric neuronal density and proportion of nitrergic neurons in the mid-colon of P30-36 wild-type and <i>TashT^{Tg/Tg}</i> male mice.	158
S3.10	Proportion of myenteric Calretinin ⁺ neurons, neuron: glia ratio and number of interstitial cells of Cajal in the distal colon of P30-36 wild-type and <i>TashT^{Tg/Tg}</i> male mice exposed or not to antibiotics.	160
4.1	The extent of ganglionosis in the colon of <i>TashT^{Tg/+};Spot^{Tg/+}</i> and <i>TashT^{Tg/Tg};Hol^{Tg/+}</i> mice between P20 and P40.....	179
4.2	The density of the myenteric plexus in the colon of <i>TashT^{Tg/+}</i> , <i>Hol^{Tg/+}</i> , <i>Spot^{Tg/+}</i> , <i>TashT^{Tg/+};Spot^{Tg/+}</i> and <i>TashT^{Tg/+};Hol^{Tg/+}</i> mice between P40 and P43.....	181

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
1.1 Les types de neurones entériques.....	8
2.1 Comparison of body weight between wild-type and <i>TashT^{Tg/Tg}</i> mice at P21, P28 and 2-3 months.	104
S2.1 List of primary and secondary antibodies used in this study.	105
S3.1 Information on samples used for amplicon sequencing analysis of the gut microbiota	161
S3.2 List of primary and secondary antibodies used in this study	163
4.1 Incidence of aganglionic megacolon in <i>TashT^{Tg/+};Spot^{Tg/+}</i> mice between P20 and P40	182
4.2 Incidence of aganglionic megacolon in <i>TashT^{Tg/Tg};Hol^{Tg/+}</i> mice between P20 and P40	182

LISTE DES ABRÉVIATIONS

5-HT	5-hydroxytryptamine (Sérotonine)
ACh	Acetylcholine
AR	Acide rétinoïque
ARTN	Artemin
ATP	Adenosine triphosphate
BACE1	Beta-secretase 1
BACE2	Beta-secretase 2
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
B-FABP	Brain fatty acid-binding protein
CCN	Cellules de la crête neurale
CCNe	Cellules de la crête neurale entérique
CGE	Cellules gliales entériques
CGRP	Calcitonin gene-related peptide
ChAT	Choline acetyltransferase
CIC	Cellules interstitielles de Cajal
CMM	Complexe migrant moteur
CO	Monoxyde de carbone
CRABP	Cellular retinoic acid-binding protein
CRABP1	Cellular retinoic acid-binding protein 1
ECE	Endothelin converting enzyme
ECCs	Enterochromaffin cells
EDN-3	Endothelin-3
EDNRB	Endothelin receptor, type B
ECAH	Entérocolite associée à la maladie de Hirschsprung
GAT-2	γ -aminobutyric acid (GABA) transporteur 2

GDNF	Glial cell-line derived neurotrophic factor
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
GFR α	GDNF family receptor α
TGI	Tractus gastro-intestinal
HMG	High motility group
HSCR	Hirschsprung disease
IPANs	Intrinsic primary afferent neurons
KBP	Kinesin binding protein
NGF	Nerve growth factor
NO	Nitric oxide
NOS	Nitric oxyde synthase
NPY	Neuropeptide Y
NTN	Neurturin
PACAP	Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide
PCS	Précurseurs des cellules de Schwann
PEPT2	Peptide transporter 2
PLD1	Phospholipase D1
PLP1	Proteolipid protein 1
PHOX2B	Paired-like homeobox 2b
PSP	Persephin
RALDHs	Retinaldehyde dehydrogenases
RAR	Retinoic acid receptor
RBP4	Retinol binding protein 4
RDH10	Retinol dehydrogenase 10
RXR	Retinoid X receptor
S100 β	S100 calcium binding protein B
SCF	Stem cell factor
SIP1	Smad-interacting protein 1

SNC	Système nerveux central
SNE	Système nerveux entérique
SOM	Somatostatin
SOX10	Sry-related HMG-box 10
SP	Substance P
STRA6	Stimulated by retinoic acid 6
VIP	Vasoactive intestinal peptide
ZFHX1B	Zinc finger homeobox 1b
ZT	Zone de transition
β NAD	β -nicotinamide adenine dinucleotide

RÉSUMÉ

Avec une incidence d'un nouveau-né sur 5000 et un biais sexuel (4 garçons vs 1 fille), la maladie de Hirschsprung (HSCR) ou mégacôlon aganglionnaire est une anomalie congénitale du système nerveux entérique (SNE). Elle se traduit par l'absence des ganglions nerveux (aganglionose) dans le côlon distal due à l'arrêt prématuré de la colonisation du tube digestif par les cellules de la crête neurale (CCN) – précurseurs du SNE – au cours du développement. L'origine de HSCR est multifactorielle. On estime que la contribution des facteurs génétiques est plus importante que celle des facteurs environnementaux. Toutefois, l'incomplétude de la pénétrance de la majorité des mutations connues indique non seulement l'existence et l'implication d'autres gènes et/ou loci modificateurs mais aussi la contribution des facteurs non-génétiques. Ainsi, l'amélioration de la prise en charge des patients atteints de HSCR requiert : (i) d'un côté, la découverte de nouveaux gènes et l'analyse de leur potentiel à interagir soit entre eux soit avec des gènes connus ; et (ii) de l'autre côté, l'identification des facteurs environnementaux nuisibles au SNE.

TashT, *Spot* et *Holstein* sont des modèles murins pour HSCR générés dans notre laboratoire par insertion aléatoire de transgènes dans le génome afin de découvrir de nouveaux gènes importants au développement des CCN. Pour chacun des trois modèles, les transgènes se sont insérés au même endroit dans une séquence non-codante localisée sur les chromosomes 10 (*TashT*), 9 (*Holstein*) et 13 (*Spot*). Les animaux hétérozygotes pour l'insertion transgénique (*TashT*^{Tg/+}, *Hol*^{Tg/+} et *Spot*^{Tg/+}) ne montrent aucune forme d'aganglionose colique. Cependant, les homozygotes (*TashT*^{Tg/Tg}, *Spot*^{Tg/Tg} et *Hol*^{Tg/Tg}) développent et meurent d'un mégacôlon aganglionnaire autour de l'âge du sevrage. Alors que ce phénotype est 100% pénétrant sans biais sexuel chez les souris *Spot*^{Tg/Tg} et *Hol*^{Tg/Tg}, seulement ~ 13% des *TashT*^{Tg/Tg} en succombent avec un fort biais mâle (~ 15 : 1). Pour les trois lignées, via des mécanismes moléculaires différents, l'aganglionose résulte d'un retard de migration des CCN durant l'hystogénèse du SNE.

Ma thèse s'inscrit dans le cadre du projet visant à caractériser les souris de la lignée *TashT*. Plus précisément, elle constitue la suite des travaux de Bergeron *et al.*, (Bergeron *et al.*, 2015) dans lesquels nous avons montré que le phénotype de mégacôlon chez les souris *TashT*^{Tg/Tg} est corrélé à l'étendue de leur l'aganglionose colique. Ainsi les animaux dont le côlon est aganglionnaire au-delà de ~ 20% sont plus à risque de développer le mégacôlon. Nous avons également montré, par opposition au mégacôlon, que toutes les souris *TashT*^{Tg/Tg} montrent l'aganglionose et/ou l'hypoganglionose (i.e. une réduction de la densité neuronale) dans le côlon distal. Dans la présente thèse, au cours d'une première étude, nous dévoilons l'existence exclusive de la constipation chronique chez les souris *TashT*^{Tg/Tg} mâles adultes. Un

phénotype que nous trouvons comme corrélé à l'hypoganglionose sévère accompagnée d'une augmentation de la proportion des neurones nitrergiques (nNos⁺) au niveau du plexus myentérique dans le côlon distal. Dans une deuxième étude, nous montrons que l'exposition continue à long-terme aux antibiotiques cause la survenue prématurée de la constipation chronique chez les souris *TashT^{Tg/Tg}* mâles immatures en aggravant la sévérité de l'hypoganglionose et en engendrant une augmentation supplémentaire du nombre des neurones myentériques nNos⁺ – deux défauts pré-existants – dans le côlon. De plus, nous découvrons que l'inhibition colique de la signalisation nitrergique non seulement atténue la sévérité de cette constipation mais aussi retarde la survenue des décès associés au mégacôlon chez les *TashT^{Tg/Tg}* mâles dans les conditions normales. Enfin, dans une troisième étude, nous démontrons le potentiel du locus *TashT* à interagir séparément avec les loci *Spot* et *Holstein*. Environ 20.37% des souris double hétérozygotes *TashT^{Tg/+} ; Spot^{Tg/+}* développent et succombent d'un mégacôlon vers l'âge du sevrage avec un biais de ~ 2 mâles vs 1 femelle. Nous montrons également que la présence d'un allèle *Holstein* dans le background de *TashT^{Tg/Tg}* (*TashT^{Tg/Tg} ; Hol^{Tg/T+}*) augmente drastiquement de 375% la pénétrance du mégacôlon aganglionnaire chez les souris *TashT^{Tg/Tg}* en aggravant la sévérité de l'aganglionose colique. En conclusion, Cette étude est la première dans le domaine à démontrer chez un modèle murin pour HSCR : (i) que l'exposition continue aux antibiotiques peut à long-terme amplifier la sévérité des neuropathies entériques d'origine génétique ; (ii) le potentiel d'une thérapie moléculaire pour atténuer l'impact des anomalies du SNE sur la motricité du côlon ; et enfin (iii) des interactions génétiques impliquant des séquences non-codantes.

Mots clés : Système nerveux entérique, Cellule de la crête neurale, Maladie de Hirschsprung, Signalisation nitrergique, Antibiothérapie, Séquences non-codantes Interactions génétiques, Souris.

CHAPITRE I

REVUE DE LITTÉRATURE

1.1 Le système nerveux entérique (SNE)

1.1.1 Fonction et organisation

Le tractus gastro-intestinal (TGI) – qui s'étend de la cavité buccale à l'anus et qui comprend l'œsophage, l'estomac, le petit intestin, le côlon (ou gros intestin) et le rectum – se distingue des autres organes viscéraux du fait qu'il possède son propre cerveau, le système nerveux entérique (SNE). Le SNE gouverne la régulation fine et permanente des diverses fonctions vitales du TGI à savoir le péristaltisme intestinal qui assure le déplacement des nutriments vers les sites de digestion et d'absorption ainsi que l'évacuation des résidus de la digestion et/ou des substances nocives (e.g. bactéries, toxines, etc.) du TGI. Il régule également les sécrétions gastriques, l'absorption intestinale, le flux sanguin local, participe à la maintenance de la barrière épithéliale intestinale et interagit avec le système immunitaire et endocrinien (Furness, 2012).

Au niveau structural et topologique, le SNE constitue un réseau neural dense intégré dans la paroi du TGI sur toute sa longueur (Figure 1.1). Chez les mammifères, les corps cellulaires des neurones et des cellules gliales de ce réseau sont regroupés en ganglions interconnectés via des prolongements axonaux et dendritiques, lesquels sont aussi associées aux cellules gliales mais sans myéline, pour former deux principaux plexus :

le plexus myentérique (ou plexus d'Auerbach) et le plexus sous-muqueux (également nommé plexus de Meissner) (Figure 1.2). Le plexus myentérique est situé entre les couches musculaires longitudinale et circulaire tout le long du TGI et contrôle les fonctions motrices de l'intestin. Quant au plexus sous-muqueux, il est localisé en profondeur, flanqué par la couche musculaire circulaire et la muqueuse intestinale. Contrairement au plexus myentérique, le plexus sous-muqueux n'est présent que dans le petit intestin et le côlon (Furness, 2012) où il régule les fonctions épithéliales évoquées plus haut. Ainsi, les deux plexus interagissent non seulement entre eux mais aussi avec de nombreux composants cellulaires de l'intestin tels que les myocytes, les cellules sécrétrices, les cellules épithéliales et les cellules interstitielles de Cajal.

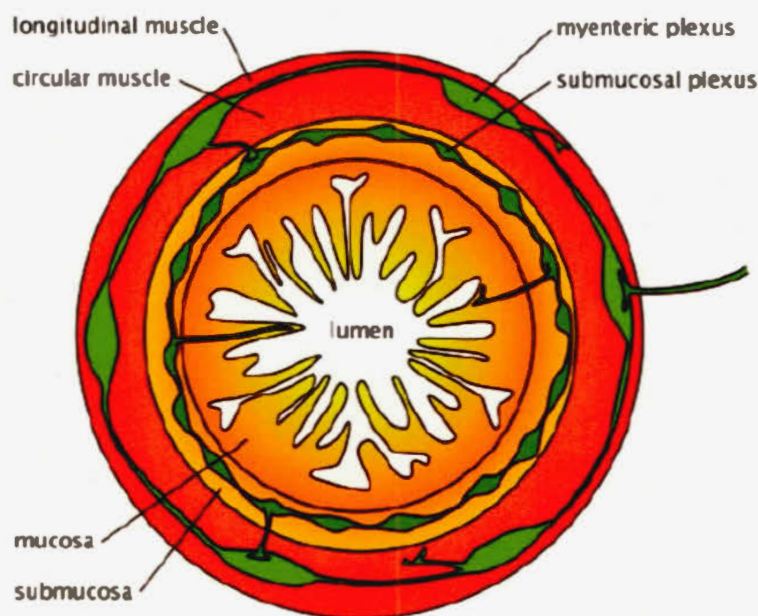


Figure 1.1 Le système nerveux entérique (SNE).

Dessin d'une coupe transversale du petit intestin illustrant les couches musculaires de l'intestin (rouge), les plexus myentérique et sous-muqueux (vert) et la muqueuse intestinale (jaune) (image extraite de (Bergeron *et al.*, 2013)). Lumen, lumière intestinale ; Mucosa, muqueuse ; Submucosal plexus, plexus sous-muqueux ; Myenteric plexus, plexus myentérique ; Circular muscle, muscle circulaire ; Longitudinal muscle, muscle longitudinal.

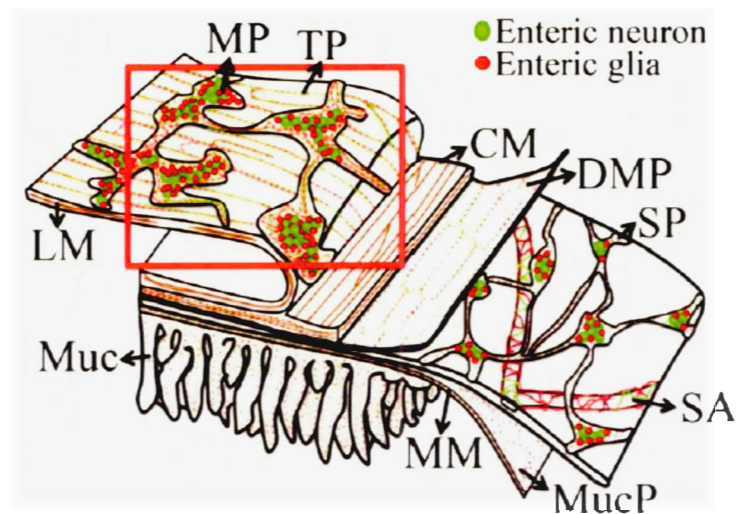


Figure 1.2 Organisation et topologie du SNE.

Dessin de la paroi intestinale illustrant les couches musculaire et muqueuse de la paroi du tractus gastro-intestinal, les neurones (vert) et les cellules gliales (rouge) qui forment les plexus myentérique et sous-muqueux (image extraite et modifiée de (Coelho-Aguiar Jde *et al.*, 2015)). CM, circular muscle (muscle circulaire); DMP, deep muscular plexus (plexus musculaire profond); LM, longitudinal muscle (muscle longitudinal); MM, muscularis mucosae (musculaire muqueuse); MP, myenteric plexus (plexus myentérique); Muc, mucosa (muqueuse); MucP, mucosal plexus (plexus muqueux); SA, submucosal artery (artère sous-muqueuse); SP, submucous plexus (plexus sous-muqueux); TP, tertiary plexus (plexus tertiaire).

1.1.2 Composition du SNE

L'accomplissement des tâches susmentionnées par le SNE nécessite la présence de chaque plexus à la bonne position avec le nombre approprié de ganglions – unités fonctionnelles du SNE. Chaque ganglion à son tour doit contenir un ratio neurones : cellules gliales équilibré ainsi que la gamme complète des différents sous-types neuronaux dans les bonnes proportions (Figure 1.3 A-B). Il faut noter cependant que le nombre, la taille des ganglions ainsi que le phénotype des neurones qui les composent peuvent varier selon le plexus, la région intestinale ou l'espèce considérée (Hansen, 2003).

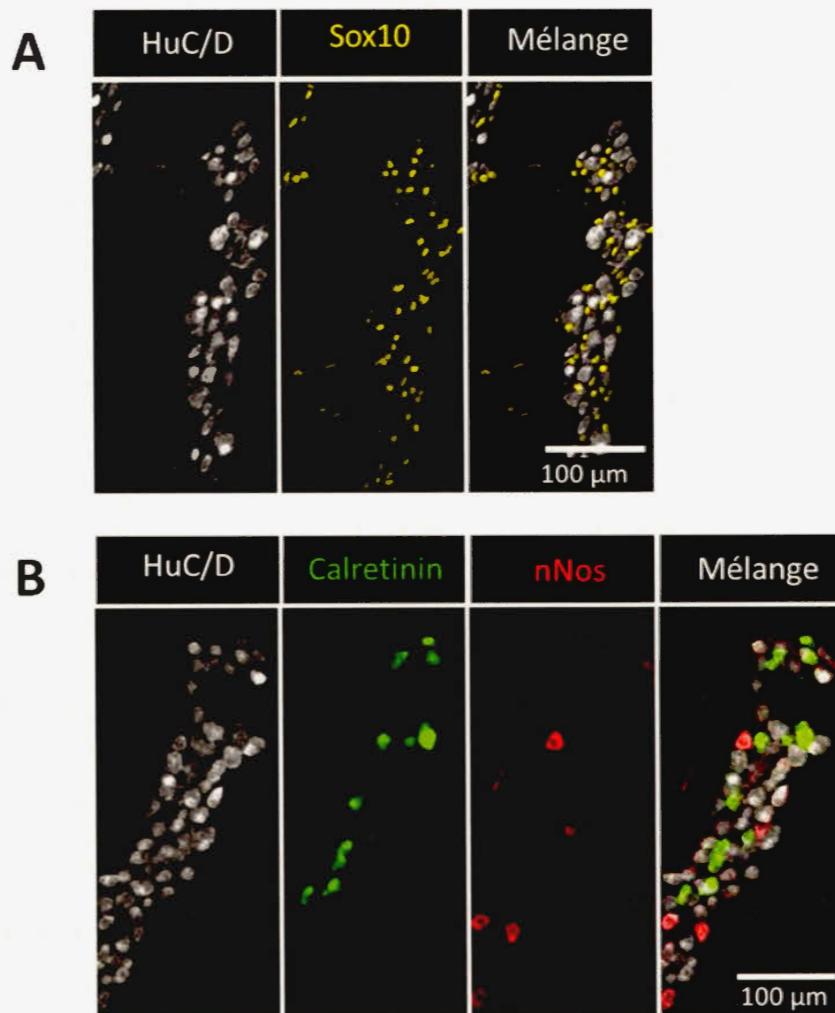


Figure 1.3 Ganglions entériques.

(A-B) Marquage par immunofluorescence du côlon distal de souris sauvages âgées de 28 jours, illustrant les ganglions du plexus myentérique. Tous les neurones et toutes les cellules gliales sont marqués respectivement par HuC/D (gris) et Sox10 (jaune). Les deux principaux sous-types neuronaux : les neurones inhibiteurs et excitateurs sont marqués respectivement avec nNos (rouge) et Calretinin (vert). Échelle : 100 μm . Image personnelle.

1.1.2.1 Les neurones entériques

Les caractéristiques des différents sous-types neuronaux contenus dans les ganglions entériques ont été dévoilées grâce à l'usage de nombreuses techniques allant de la microscopie optique et électronique aux analyses immunohistochimique, électrophysiologique ainsi que la coloration intracellulaire et le traçage rétrograde des projections neuronales (Hansen, 2003). Ainsi, les neurones entériques sont classifiés en fonction d'un ensemble de critères tels que leur morphologie, leur code neurochimique, leur fonction, leur topologie, leurs propriétés biophysiques, leurs projections ainsi que leurs récepteurs (Brookes, 2001; Hansen, 2003; Lomax et Furness, 2000). Notez qu'afin de rester dans le cadre de cette thèse et faciliter la compréhension des sections ultérieures, ci-dessous sera décrite la classification des neurones seulement en fonction des trois premiers critères.

1.1.2.1.1 Classification morphologique des neurones entériques

Au niveau morphologique, les neurones entériques sont classés en Dogiel I à VII. Dogiel est le nom du chercheur russe qui a décrit pour la première fois les neurones dans le plexus myentérique et le plexus sous-muqueux chez plusieurs mammifères (incluant l'homme, le cobaye et le rat.) et identifié les trois premiers types (Figure 1.4) en 1899. Plus tard, et faisant suite aux travaux de Dogiel, les quatre autres types ont été identifiés par d'autres chercheurs (Furness, 2015). Il convient de noter cependant qu'à l'heure actuelle ces classifications sont très peu utilisées et sont remplacées par celles issues des analyses immunohistochimiques et des circuits neuronaux. Ainsi, présentement on compte entre 15-20 types de neurones différents les uns des autres par leur fonction, leur code neurochimique, la longueur et l'orientation (orale ou anale) de leurs projections axonales, leurs cibles cellulaires intestinales et leurs caractéristiques

physiologiques. Il s'agit notamment des neurones moteurs (excitateurs et inhibiteurs), les inter-neurones, les neurones sensitifs intrinsèques (Figure 1.5) et les neurones intestinofuges – situés dans le plexus myentérique d'où ils émettent des projections vers les ganglions sympathiques – (qui ne seront pas évoqués ici) (Furness, 2000, 2012, 2015).

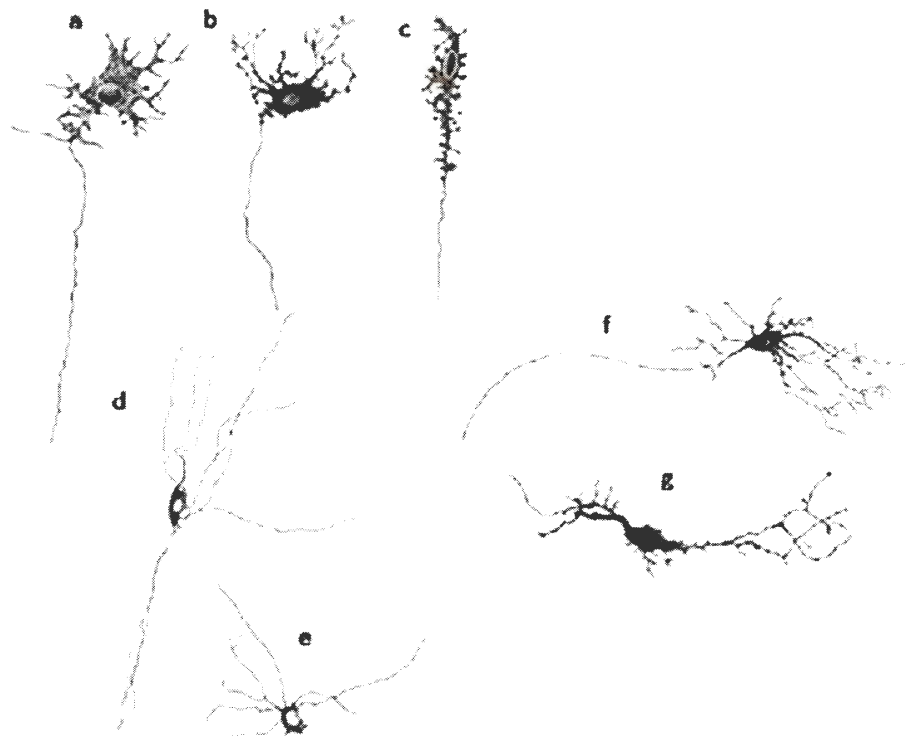


Figure 1.4 Les principaux types morphologiques des neurones entériques dans l'intestin grêle du cobaye selon la classification Dogiel.

(a-c) Neurones de type Dogiel I uniaxonaux dotés de multiples dendrites courtes. (d-e) neurones de type Dogiel II pluriaxonaux. (f-g) neurones de type Dogiel III uniaxonaux avec plusieurs longues dendrites (d'après Furness, J.B., *The Enteric Nervous system* par Blackwell Publishing, Oxford (2006)).

Figure 1.5 Les différents types de neurones qui contrôlent la motricité du petit intestin. Dessin simplifié des circuits neuronaux illustrant les éléments majeurs qui ont été identifiés. Les neurones sensitifs intrinsèques (rouge). Les interneurons descendants (jaune) et ascendants (vert). Les neurones moteurs excitateurs (bleu) et inhibiteurs (violet) des muscles intestinaux (image extraite de (Furness, 2015)). Interneuron, interneurone ; Longitudinal muscle motor neuron, neurone moteur du muscle longitudinal ; Circular muscle motor neuron, neurone moteur du muscle circulaire ; Network of Intrinsic Sensory neurons (IPANs), réseau des neurones sensitifs intrinsèques (intrinsic primary afferent neurons).

Le code neurochimique est la combinaison des différents neuromédiateurs (ou neurotransmetteurs) exprimés par les neurones. C'est l'outil moléculaire que les neurones utilisent non seulement pour communiquer entre eux mais aussi avec les cellules cibles effectrices dans le TGI. Dans le SNE, on dénombre la présence de plus de 30 neurotransmetteurs (Furness, 2000; Hansen, 2003) qui se présentent sous forme de gaz (e.g. oxyde nitrique (NO) et monoxyde de carbone (CO)), de petites molécules (e.g. norépinephrine et sérotonine (5-HT)) ou de grosses molécules (e.g. peptides). Ces neurotransmetteurs sont, habituellement selon leurs fonctions, colocalisés dans des neurones particuliers, déterminant ainsi leur rôle (Tableau 1.1). De plus, le code

neurochimique varie selon le type de neurone, la région du TGI et l'espèce considérée (Hansen, 2003). Il est important de noter cependant que certains aspects du code neurochimique sont hautement conservés parmi les espèces. Ceci est le cas par exemple pour les codes des neurones moteurs excitateurs et inhibiteurs des muscles intestinaux qui contiennent respectivement les Tachykinin/ChAT (Choline acétyltransférase : enzyme qui catalyse la synthèse de l'acétylcholine (ACh).) et le VIP (Peptide vasoactif intestinal)/NOS (Oxyde nitrique synthase : enzyme qui catalyse la synthèse de l'oxyde nitrique (NO) (Furness, 2015).

Tableau 1.1 Les types de neurones entériques.

Les différents types de neurones du SNE dans l'intestin grêle du cobaye ainsi que les principaux neuromédiateurs qu'ils produisent (code neurochimique) (Hansen, 2003).

Type de neurones	Neurotransmetteurs
IPANs	ACh, Calb, CGRP, SP
Interneurones ascendants	ACh, Calret, ENK, SP
Interneurones descendants	5-HT, ACh, DYN, GRP, NO, SOM, VIP
Neurones moteurs excitateurs	ACh, Calret, ENK, SP
Neurones moteurs inhibiteurs	DYN, ENK, GRP, NO, VIP
Neurones sécrétomoteurs	ACh, CCK, CGRP, DYN, NPY, SOM, VIP

1.1.2.1.3 Classification fonctionnelle des neurones entériques

1.1.2.1.3.1 Les neurones sensitifs intrinsèques

Le rôle principal des neurones sensitifs intrinsèques consiste à détecter l'état de l'intestin et initier les réflexes entériques tels que le péristaltisme. Ce sont des mécano-, thermo- et chimio-récepteurs. Ainsi, ils sont activés suite aux modifications chimiques ou mécaniques (distorsions) de la lumière intestinale ainsi qu'aux distensions intestinales (Furness, 2015). Il est important de noter que cette activation, qui se fait aussi indirectement par les cellules entérochromaffines présentes dans la muqueuse intestinale via la libération de la 5-TH (leur principal produit de sécrétion), peut également impliquer d'autres types de cellules entéroendocrines causant la production d'autres hormones comme la cholécystokinine et la motiline (Ahlman et Nilsson, 2001). Sur le plan morphologique, les neurones sensitifs intrinsèques sont larges et multipolaires (Dogiel type II). Leur sensibilité dans les conditions physiologiques est modulée par un large éventail de récepteurs membranaires tels que les récepteurs de la SP (substance P), la CGRP (calcitonin gene-related peptide) et la VIP) (Hansen, 2003).

1.1.2.1.3.2 Les neurones moteurs

Les neurones moteurs sont du type Dogiel I et il en existe trois grands types à savoir les neurones moteurs du muscle, les neurones sécrétomoteurs (qui peuvent ou pas être des vasodilatateurs) et d'autres neurones moteurs (non évoqués ici) qui innervent les cellules entéroendocrines, les cellules pariétales et les tissus lymphatiques (Furness, 2015).

1.1.2.1.3.3 Les neurones moteurs du muscle

Les neurones moteurs du muscle innervent les deux couches musculaires de l'intestin ainsi que la musculaire muqueuse tout le long du TGI (Figure 1.5). Au niveau fonctionnel, il existe deux types de neurones moteurs du muscle (excitateurs et inhibiteurs) qui sont impliqués de la régulation des mouvements intestinaux tels que le malaxage du contenu gastrique et le péristaltisme. Les principaux neurotransmetteurs libérés par les neurones moteurs excitateurs sont l'ACh et les Tachykinines (SP et neurokinin A), alors que ceux produits par les neurones moteurs inhibiteurs sont le NO, l'ATP (Adénosyle tri-phosphate ou des nucléotides apparentés), le VIP et possiblement le PACAP (Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide), le GABA (acide γ -aminobutyrique), le NPY (neuropeptide Y) et le CO (Furness, 2015; Hansen, 2003). Cependant, il convient de noter que de toutes ces molécules, l'ACh et le NO constituent respectivement les principaux neuromédiateurs pour les neurones excitateurs et inhibiteurs. En effet, le blocage des récepteurs muscariniques pour l'ACh cause des altérations importantes de la transmission excitatrice (Fink, 1959; Trendelenburg, 2006). De manière similaire, l'inhibition pharmacologique de la synthèse de NOS ou l'invalidation du gène *Nos* engendre des défauts de la transmission inhibitrice (Mashimo *et al.*, 2000; Rivera *et al.*, 2011; Sanders et Ward, 1992).

1.1.2.1.3.4 Les neurones sécrétomoteurs

Les neurones sécrétomoteurs régulent les fonctions sécrétrices de l'intestin (e.g. la sécrétion de l'eau et des électrolytes dans la lumière intestinale). En accord avec ceci, les corps cellulaires de la plupart d'entre eux se trouvent dans les ganglions du plexus sous-muqueux ; d'où certains innervent la muqueuse intestinale alors que d'autres se projettent à la fois vers le plexus myentérique et la musculaire muqueuse (Furness,

2015; Hansen, 2003). Il existe deux principaux types de neurones sécrétomoteurs : cholinergiques ou non-cholinergiques. L'ACh produit par les neurones cholinergiques agit sur les récepteurs muscariniques des cellules de la muqueuse, tandis que les neurones non-cholinergiques se servent de VIP pour médier la plupart des réponses relatives aux reflexes locaux (Hansen, 2003).

1.1.2.1.3.5 Les neurones sécrétomoteurs vasodilatateurs

Les neurones sécrétomoteurs vasodilatateurs gouvernent le contrôle des flux sanguins tout le long du TGI, et sont communément reconnus pour innervier les vaisseaux sanguins depuis les ganglions du plexus sous-muqueux où sont localisés leurs corps cellulaires (Furness, 2015; Vanner et Macnaughton, 2004). Ils sont activés en même temps que les neurones sécrétomoteurs ; et ceci résulte en une augmentation du liquide interstitiel entre les capillaires sanguins et les cellules. Enfin, l'ACh et le VIP sont les neuromédiateurs utilisés par les neurones sécrétomoteurs vasodilatateurs.

1.1.2.1.3.6 Les interneurones

Sur le plan morphologique les interneurones semblent appartenir aux types Dogiel I et II. Ils sont localisés dans le plexus myentérique où ils forment des chaînes qui s'étendent dans le sens anal ou oral (Figure 1.5) tout en envoyant des projections vers le plexus sous-muqueux et la muqueuse intestinale. Dans le petit intestin du cobaye un type d'interneurones ascendants et trois types d'interneurones descendants ont été identifiés (Furness, 2000). Les interneurones ascendants sont principalement cholinergiques, alors que les interneurones descendantS co-expriment et libèrent différents types de neurotransmetteurs tels que l'ACh, le NO, le VIP, la 5-HT, et la

SOM (Somatostatine). Au niveau des réflexes intestinaux, les interneurons qui produisent simultanément l'ACh/NO/VIP/SOM ou l'ACh/5-HT semblent intervenir respectivement dans la régulation de la motricité et la sécrétion locale (Furness, 2000; Hansen, 2003).

1.1.2.2 Les cellules gliales entériques (CGE)

1.1.2.2.1 Morphologie et marqueurs des CGE

Observées pour la première fois par Dogiel en 1899, les cellules gliales entériques (CGE) constituent le type cellulaire le plus abondant du SNE (Gulbransen, B.D., 2014; Ochoa-Cortes *et al.*, 2016). En effet en termes de nombre, elles surpassent les neurones non seulement dans le plexus myentérique mais aussi dans le plexus sous-muqueux (Vales *et al.*, 2018). On les retrouve à tous les niveaux de la paroi du TGI notamment dans les ganglions entériques, les couches musculaires et dans la muqueuse intestinale (Gulbransen, B. D. et Sharkey, 2012). Sur la base de leur localisation, on distingue présentement au moins quatre types (I-IV) morphologiquement différents de CGE. On retrouve le type I en forme d'étoile dans les ganglions entériques autour des corps cellulaires des neurones. Le type II, plus allongé, est associé aux fibres nerveuses dans l'espace interganglionique. Au niveau de la muqueuse intestinale se localise le type III, allongé avec plusieurs prolongements à la fois longs et ramifiés. Enfin le type IV caractérisé par une morphologie plus allongée est associé aux fibres nerveuses incrustées dans les couches musculaires de l'intestin (Figure 1.6) (Boesmans *et al.*, 2015; Gulbransen, B.D., 2014; Gulbransen, B. D. et Sharkey, 2012; Ochoa-Cortes *et al.*, 2016; Vales *et al.*, 2018). Sur la base des données émergentes, sous cette hétérogénéité morphologique se cacheraient : (i) des différences biochimiques plus spécifiques en rapport avec l'expression des récepteurs, des canaux et d'autres molécules (Gulbransen, B. D. et Sharkey, 2012) ; et (ii) des différences au niveau de la

signature du transcriptôme. Par exemple bien que la grande majorité des CGE co-expriment S100 β (S100 calcium binding protein B), PLP1 (Proteolipid protein 1) et le facteur de transcription SOX10 (Sry-related HMG-box 10), seulement un sous ensemble d'entre elles expriment en plus GFAP (Glial fibrillary acidic protein) (Figure 1.7 A-B) (Boesmans *et al.*, 2013; Rao *et al.*, 2015).

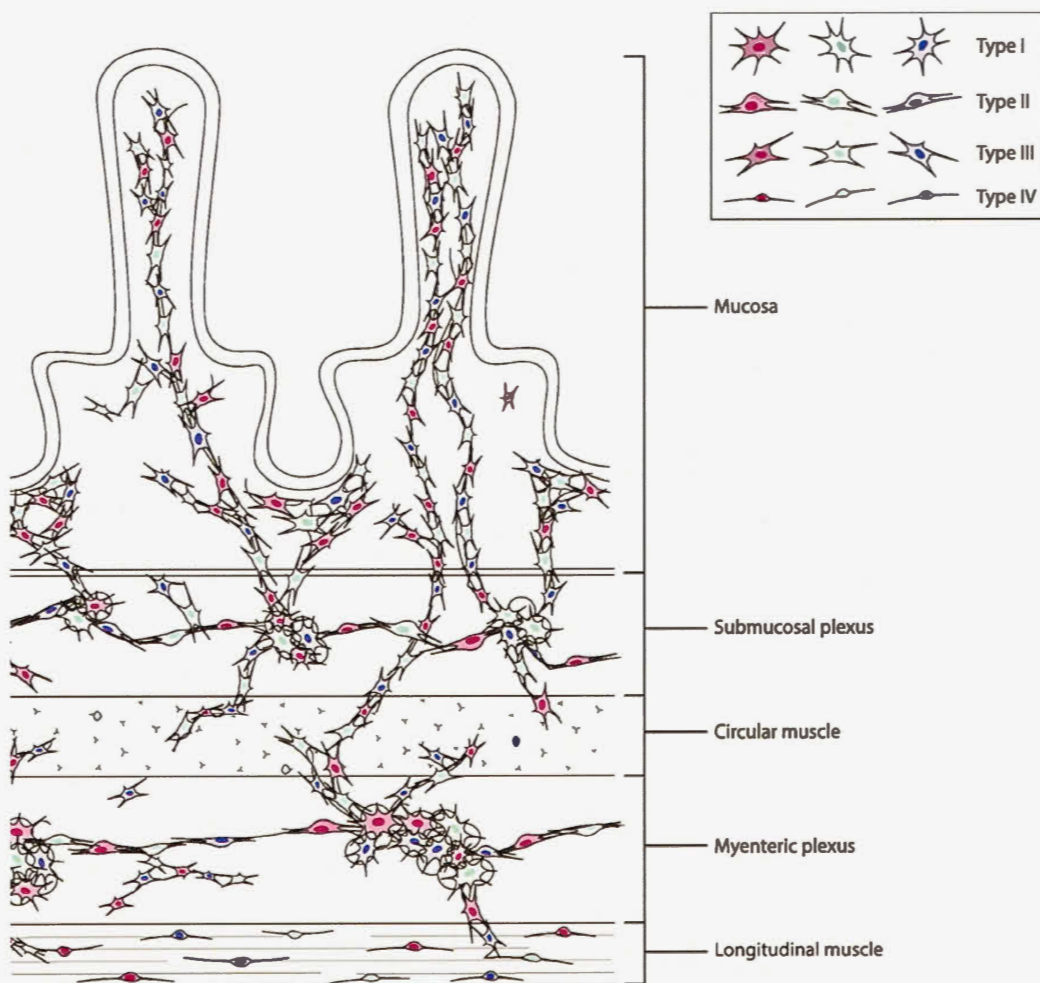


Figure 1.6 La morphologie des cellules gliales entériques (CGE).

(A) Représentation schématique du réseau des CGE illustrant leur localisation dans l'épaisseur de la paroi intestinale ainsi que les différents types morphologiques (Figure extraite et modifiée de (Vales *et al.*, 2018)). Mucosa, muqueuse ; Submucosal plexus, plexus sous-muqueux ; Circular muscle, muscle circulaire ; Myenteric plexus, plexus myentérique ; Longitudinal muscle, muscle longitudinal.

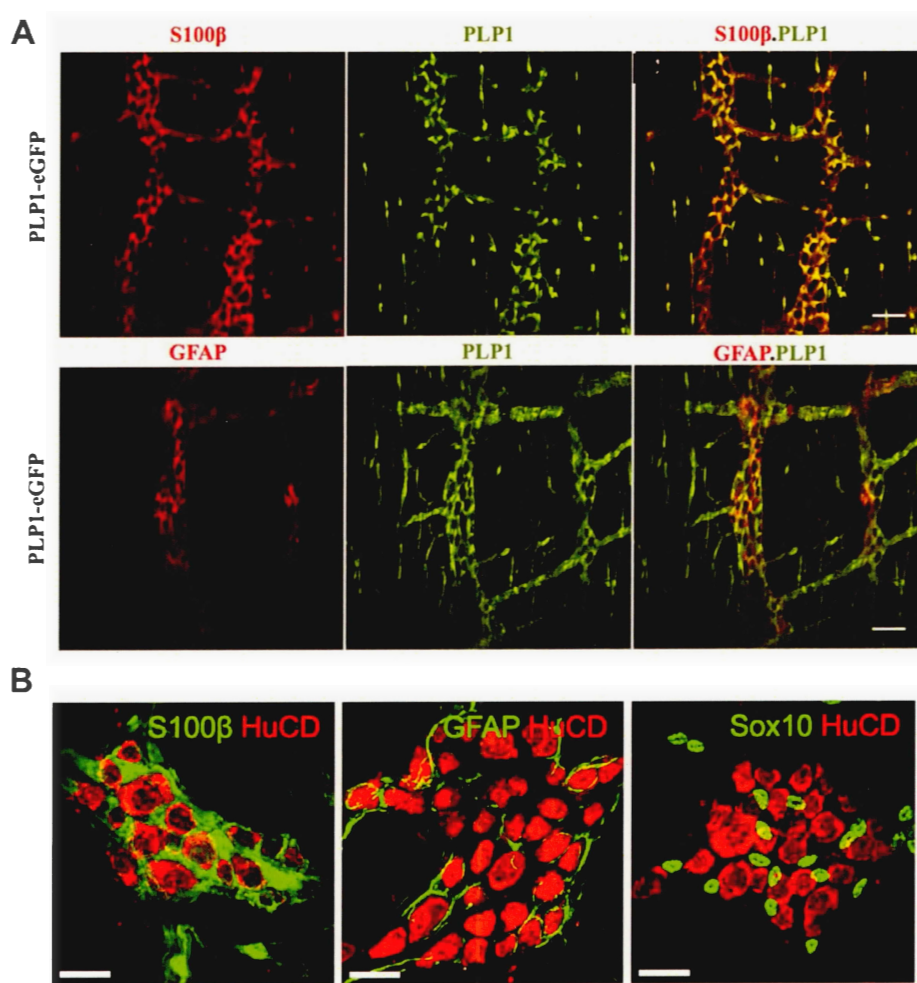


Figure 1.7 Les principaux marqueurs des CGE.

(A) Coloration immunohistochimique de S100 β et GFAP et l'expression fluorescente de PLP1 (eGFP) contrôlée par le promoteur du gène *Plp1* dans le côlon de souris âgées de 51 jours. Les CGE intraganglionnaires et intramusculaires co-expriment S100 β et PLP1 (Panel supérieur). L'expression de PLP1 et GFAP se chevauchent dans les ganglions. Cependant contrairement à PLP1, GFAP n'est pas exprimée dans les CGE intramusculaires (Panel inférieur) (image extraite de (Rao *et al.*, 2015)). (B) Marquage immunohistochimique du côlon de la souris illustrant les ganglions du plexus myentérique. Tous les neurones sont marqués par HuC/D (rouge) et les cellules gliales sont marquées avec S100 β , GFAP et Sox10 (vert) (image extraite de (Boesmans *et al.*, 2013)). PLP1-eGFP, lignée de souris transgénique chez qui l'expression de la GFP (green fluorescent protein) est contrôlée par le promoteur du gène *Plp1*.

1.1.2.2.2 Fonction des CGE

Historiquement les CGE ont longtemps été considérées comme matériel de soutien pour les neurones entériques dont la fonction se résumait à la production de facteurs nécessaires au développement, la survie et la différenciation des neurones (Ochoa-Cortes *et al.*, 2016). Cependant, des travaux récents ont permis d'élargir l'entendue de leur rôle dévoilant leur participation active dans la régulation de plusieurs fonctions digestives (e.g. la motricité intestinale) initialement considérées comme étant exclusivement sous le contrôle neuronal (Charrier et Pilon, 2017; Grubisic et Gulbransen, 2017; Neunlist *et al.*, 2014; Sharkey, 2015).

1.1.2.2.3 Interaction des CGE avec les neurones entériques

Dans les ganglions entériques les cellules gliales interagissent directement avec les neurones (Figure 1.7 A-B). En effet, elles fournissent aux neurones des molécules comme la L-arginine (précurseur du NO) (Nagahama *et al.*, 2001) et la glutamine (précurseur du glutamate et GABA) (Jessen et Mirsky, 1983) indiquant leur soutien à la transmission neuromusculaire. En accord avec ceci, la perturbation de la population des cellules gliales avec des agents pharmacologiques (e.g la gliotoxin fluorocite) *in vitro* inhibe la transmission neuromusculaire (Nasser *et al.*, 2006). Les cellules gliales jouent également un rôle dans la dégradation et/ou l'élimination des substances neuro-actives du milieu extracellulaire, assurant le maintien d'un environnement optimal au bon déroulement de la neurotransmission. Ceci est supporté par le fait qu'elles expriment sur leurs surfaces des protéines comme la NTPDase2/3 (enzymes qui hydrolysent les nucléotides) (Braun *et al.*, 2004; Lavoie *et al.*, 2011), la GAT-2 (le transporteur du GABA) (Fletcher *et al.*, 2002) et la PEPT2 (médiateur de la récupération des petits peptides) (Ruhl *et al.*, 2005). Par ailleurs, dans les conditions

pathophysiologiques, les CGE accomplissent le rôle de neuro-protecteur. Ainsi, elles protègent les neurones contre le stress oxydatif, en partie via la production du glutathion réduit (Abdo *et al.*, 2010) ; et pourraient de plus favoriser leur survie lors des inflammations du TGI via la production de facteurs de croissance tels que GDNF (Glial cell-line derived neurotrophic factor), BDNF (Brain-derived neurotrophic factor) et NGF (Nerve growth factor) (Steinkamp *et al.*, 2012; von BoyenSteinkampGeerling, *et al.*, 2006; von BoyenSteinkampReinshagen, *et al.*, 2006).

1.1.3 Régulation de la motricité intestinale par le SNE

Le tube digestif reçoit aussi des signaux afférents du système nerveux central (SNC) via les nerfs vagues, les nerfs splanchniques et pelviens, indiquant non seulement un lien anatomique entre le SNE et le SNC mais aussi l'existence d'un niveau supplémentaire de commande neurale des fonctions digestives (Figure 1.8). Il est important cependant de noter que, la nature, le degré ainsi que l'étendue de celle-ci varient selon la région du TGI et le contexte physiologique (Furness, 2012). En effet, les mouvements de l'œsophage sont largement contrôlés par le SNC (avec une faible participation du SNE) comme le démontre la paralysie de l'organe suite à une vagotomie bilatérale (Cannon, 1907). De la même manière, le SNC intervient également dans la régulation du volume de l'estomac, ses contractions et sécrétions ainsi que dans le contrôle des fonctions colorectales (i.e. la défécation) (Furness, 2012). À contrario, le SNE régule de manière autonome les fonctions du petit et gros intestin. Pour exemple, ceci est le cas pour les réflexes péristaltiques qu'on peut toujours observer même sur des segments d'intestins isolés (Bayliss et Starling, 1899; Furness, 2012).

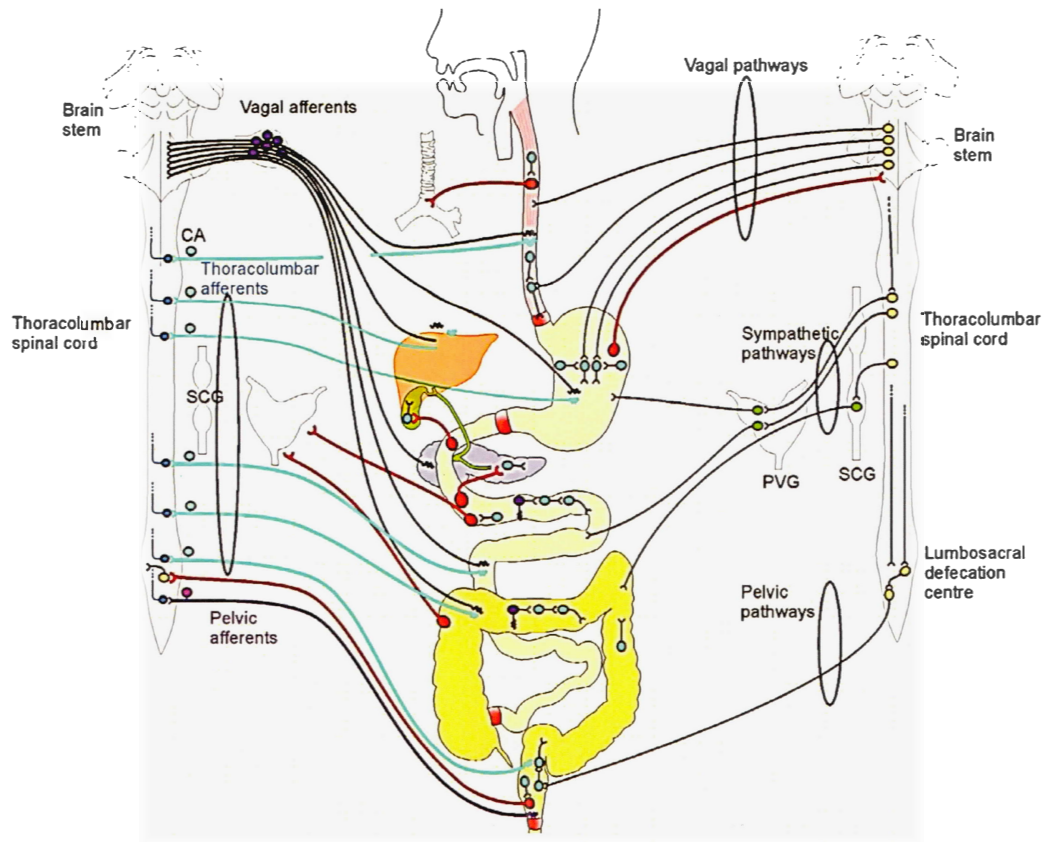


Figure 1.8 L'innervation extrinsèque du tractus gastrointestinal (TGI).

Représentation schématique illustrant les connexions neurales entre le système nerveux entérique (SNE), le système nerveux central (SNC) et les ganglions sympathiques ainsi que les connexions neurales entre les organes du TGI. À gauche sont les signaux afférents qui partent du SNE vers les organes du TGI et le SNC via les neurones intestinofuges (rouge). À droite sont ceux qui partent du SNC vers le SNE et les tissus effecteurs gastrointestinaux via les voies vagale, sympathique et pelvienne (Figure extraite de (Furness, 2015)). Brain stem, tronc cérébral : Vagal afferents, afférences vagales ; CA (cervical afferents), afférences cervicales ; Thoracolumbar afferents, afférences thoraco-lombaires ; Thoracolumbar spinal cord, moelle épinière thoraco-lombaire ; SCG (sympathetic chain ganglia), ganglions de la chaîne sympathique ; Pelvic afferents, afférences pelviennes ; Vagal pathways, les voies vagales ; Sympathetic pathways, les voies sympathiques ; PVG (prevertebral ganglia), ganglions prévertébraux ; Lumbosacral defecation centre, centre de défécation lombo-sacrée ; Pelvic pathways, voies pelviennes ; Neurones violets, neurones sensitifs intrinsèques ; Neurones bleus, neurones moteurs et interneurones ; neurones verts, neurones dans les ganglions sympathiques ; Neurones rouges, neurones intestinofuges (vert).

Notez que l'implication du SNC dans la régulation des fonctions digestives ou comment le SNE contrôle les fonctions épithéliales du TGI sont des sujets qui sortent du cadre de la présente thèse. Ici l'accent sera mis sur la régulation des mouvements intestinaux par le SNE à savoir le péristaltisme (ou la propulsion orthograde rapide du contenu intestinal) et le complexe migrant moteur (ou la propulsion orthograde lente du contenu intestinal). Par ailleurs, notez qu'en plus de ces mouvements, il existe d'autres modèles de motricité intestinale tels que la segmentation (ou les mouvements qui coupent et malaxent la nourriture) et la rétropulsion (ou les mouvements associés au vomissement) (Furness, 2012, 2015)).

1.1.3.1 L'exemple du péristaltisme

Le péristaltisme est l'ensemble des mouvements de l'intestin visant à propulser un contenu d'un bout à l'autre dans la direction oral-aborale. Il s'agit en fait d'un réflexe enclenché suite à la présence d'un stimulus mécanique (i.e. le bol alimentaire) dans la lumière intestinale. L'importance du rôle du SNE dans le contrôle de ce phénomène a été établie depuis plus de cent ans, comme l'illustre l'habilité du petit intestin à réaliser le péristaltisme après dénervation extrinsèque (Bayliss et Starling, 1899; Furness, 2012). Le microcircuit nerveux du réflexe péristaltique qui est le mieux étudié et décrit, inclue les neurones sensitifs intrinsèques, les interneurones et les neurones moteurs (Figure 1.5), et est similaire entre le petit intestin et le côlon (Furness, 2015). Du point de vue mécanistique, le passage du bol alimentaire induit directement l'activation des neurones sensitifs intrinsèques lesquels, via les interneurones ascendants, transmettent des signaux aux neurones moteurs excitateurs déclenchant une contraction musculaire en amont du bol. En aval par contre, l'activation des neurones moteurs inhibiteurs médiée par les interneurones descendants cause une relaxation musculaire, le tout ayant pour conséquence la formation d'un segment en amont propulsif et un segment en aval

réceptif permettant la progression du contenu de la lumière vers l'anus (Rao et Gershon, 2016). Par ailleurs, il est important de noter que l'activation des neurones sensitifs intrinsèques se fait aussi indirectement par les cellules entérochromaffines présentes dans la muqueuse intestinale via la libération de la 5-HT. Ainsi, l'ajout des antagonistes des récepteurs de 5-HT (e.g. 5-HT₄ et 5-HT_{1p}) au site du stimulus a été montrée pour inhiber la contraction musculaire locale dans le côlon (Grider *et al.*, 1996).

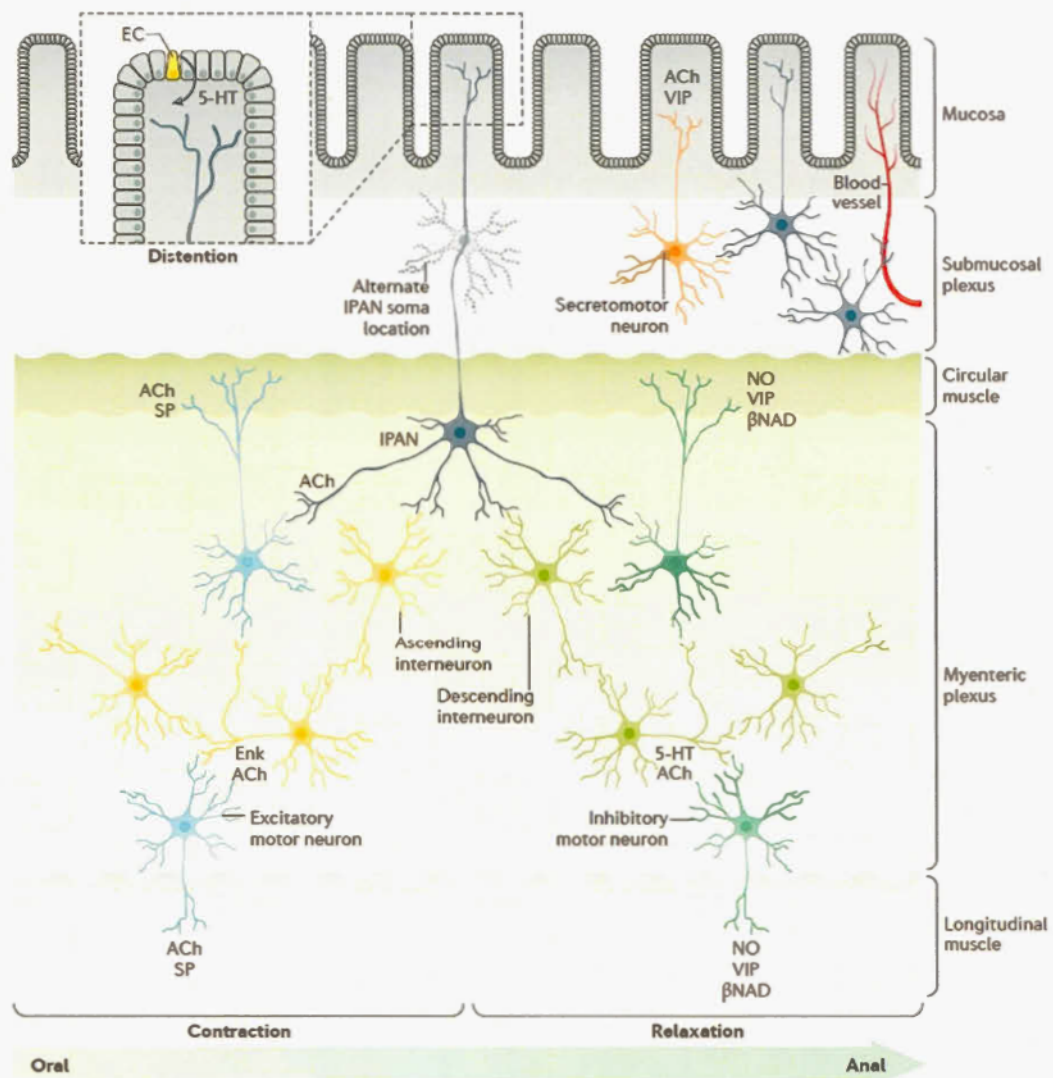


Figure 1.9 Représentation schématique du microcircuit neuronal à la base du reflexe péristaltique. La dilatation ou la distorsion luminale déclenche l'activation directe des terminaisons mécanorécepteurs des neurones sensitifs intrinsèques ainsi que l'activation indirecte des neurones sensitifs intrinsèques par les cellules entérochromaffines présentes dans l'épithélium intestinal via la libération de la sérotonine. Les neurones sensitifs intrinsèques activent les interneurons ascendants et descendants qui, à leur tour, stimulent respectivement les neurones moteurs excitateurs et inhibiteurs. L'activité des neurones moteurs conduit à la contraction orale et à la relaxation anale du muscle lisse intestinal ce qui a pour effet la propulsion du contenu de la lumière intestinale dans la direction proximale-distale (Figure extraite de (Rao et Gershon, 2016)). Mucosa, muqueuse ; Submucosal plexus, plexus sous-muqueux ; Circular muscle, muscle circulaire ; Myenteric plexus, plexus myentérique ; Longitudinal muscle, muscle longitudinal. Distention, dilatation ; Contraction, contraction ; Relaxation, relaxation ; Oral, oral ; Anal, anal ; EC (enterochromaffin cells), cellules entérochromaffines ; IPAN (intrinsic primary afferent neuron), neurone sensitif intrinsèque ; Alternate IPAN soma location, emplacement alternatif du corps cellulaire du neurone sensitif intrinsèque ; Blood vessel, vaisseau sanguin ; Secretomotor neuron, neurone sécrétomoteur ; Ascending interneuron ; interneurone ascendant ; Descending interneuron, interneurone descendant ; Excitatory motor neuron, neurone moteur excitateur ; Inhibitory motor neuron, neurone moteur inhibiteur ; ACh (acetylcholine), acétylcholine ; SP (substance P), substance P ; NO (nitric oxide), oxyde nitrique ; VIP (vasoactive intestinal peptide), peptide vasoactif intestinal ; β NAD (β -nicotinamide adenine dinucleotide), β -nicotinamide adénine dinucléotide ; 5-HT (5-hydroxytryptamine), sérotonine ; Enk (encephalin), enképhaline.

1.1.3.2 L'exemple du complexe migrant moteur

Le complexe migrant moteur (CMM) est une activité électrique/contractile cyclique qui a lieu principalement dans l'estomac et le petit intestin (Romanski, 2017). Il faut cependant noter qu'il est aussi observé dans le côlon (Smith *et al.*, 2014). Le CMM du côlon est indépendant de celui des régions proximales du TGI. Le CMM a été décrit pour la première fois chez le chien par Szurszewski comme une bande de potentiels d'action de grande amplitude partant du duodénum et traversant l'intestin grêle (Szurszewski, 1969). Chez l'homme, il traverse le petit intestin entre les repas à environ toutes les 90 minutes (Furness, 2012; Wingate, 1981) avec une vitesse lente d'environ 1-4 cm/minutes, et est inhibé (pendant plusieurs heures) par l'ingestion d'un repas. En termes de trajet, la majorité des CMM partent du jéjunum proximal pour s'arrêter à l'iléon. Cependant, des variations inter-individuelles du site d'origine sont observées

et impliquent entre autres l'œsophage distal, l'estomac et plusieurs points dans le petit intestin (Kellow *et al.*, 1986). Le cycle normal (chez l'homme et le chien) du CMM peut être décomposé en quatre phases (I-IV) (Takahashi, 2012). La phase I est une période de repos qui dure environ 50 min, et est pratiquement dépourvue de contractions. Avec une durée de 25-30 min, la phase II se caractérise par des contractions intermittentes et irrégulières de basse amplitude. La phase III est la plus courte (environ 5-10 min), et est marquée par des contractions régulières de haute amplitude. La phase IV est une courte période de transition de retour vers la phase I. Le rôle physiologique suggéré du CCM est la propulsion de l'intestin vers le côlon des résidus de la digestion, des débris cellulaires ainsi que des bactéries durant les périodes inter-digestives. Ce qui lui a valu le nom de *housekeeper* (la gouvernante) de l'intestin (Furness, 2012).

Le CMM est régulé par le SNE comme le démontre l'arrêt de sa progression tout le long de l'intestin chez le chien suite à la perfusion locale de l'atropine (inhibiteur de la transmission cholinergique qui se fixe sur les récepteurs muscariniques de l'ACh), l'hexaméthonium (antagoniste ganglionnaire des récepteurs nicotiques de l'ACh) ou la tétródotoxine (inhibiteur de l'activité neuronale) (El-Sharkawy *et al.*, 1982; Sarna *et al.*, 1981). De plus, le CMM a été observé dans des côlons isolés chez l'homme (Spencer *et al.*, 2012) et la souris (Lyster *et al.*, 1995). Dans ce dernier cas, sa génération faisait intervenir à la fois une réduction de la neurotransmission inhibitrice et l'activation de la neurotransmission excitatrice.

1.1.4 Participation des cellules interstitielles de Cajal (CIC) dans la régulation de la motricité intestinale contrôlée par le SNE

1.1.4.1 Morphologie des CIC

Décrites pour la première fois il y a plus de 100 ans par Santiago Ramon y Cajal, les cellules interstitielles de Cajal (CIC) représentent les cellules pacemaker du TGI. Au niveau morphologique, les traits ultra-structuraux qui les caractérisent généralement incluent un corps cellulaire allongé avec plusieurs prolongements cytoplasmiques et un noyau ovoïde. Dans le cytoplasme il y a beaucoup de mitochondries, une grande quantité de filaments intermédiaires ainsi que des réticulum endoplasmiques lisse et rugueux, et un appareil de Golgi modérément développé. Il est important de noter cependant que ces caractéristiques cellulaires varient selon la localisation des CIC dans l'épaisseur de la paroi intestinale et l'espèce considérée allant des traits similaires aux fibroblastes à ceux spécifiques aux cellules du muscle lisse intestinal (e.g. présence d'une lame basale, un système de citernes ainsi que des cavéoles). Par ailleurs dans le TGI, les CIC établissent des contacts étroits avec les varicosités des neurones tout en formant des jonctions lacunaires non seulement entre elles-mêmes mais aussi avec des cellules musculaires (Komuro, 2006).

1.1.4.2 Développement des CIC

Des études réalisées chez la souris suggèrent que les CIC partagent un précurseur mésodermique commun avec les cellules du muscle lisse de l'intestin (Kluppel *et al.*, 1998; Torihashi *et al.*, 1997). En effet, aux stades embryonnaires précoces, les précurseurs des CIC et les myocytes intestinaux expriment tous le gène *c-kit* situé dans le locus *W* (dominant white spotting) et responsable de l'expression de la protéine Kit, un récepteur membranaire à activité tyrosine kinase qui interagit fonctionnellement

avec le ligand SCF (stem cell factor ou encore le facteur Steel) lequel est codé par le gène *Sl*. Néanmoins à partir des stades mi-embryonnaires, alors que l'expression de Kit est éteinte dans les cellules destinées à devenir des myocytes au profit de l'activation de l'expression des protéines des myofilaments, elle est maintenue dans les cellules destinées à se différencier en CIC (Gulbransen, B.D., 2014). Cependant le développement embryonnaire des CIC ne semble pas dépendre de Kit puisque les souris porteuses des mutations homozygotes dans les régions codante (e.g. W^{lacZ}/W^{lacZ}) (Bernex *et al.*, 1996) ou régulatrice (e.g. W^{bd}/W^{bd}) (Kluppel *et al.*, 1997) du gène *c-kit* naissent avec un nombre normal de CIC dans le TGI. En revanche à l'âge adulte ces mutants ainsi que ceux du gène *Steel* (Sl/Sl^d) (Ward, S. M. *et al.*, 1995) montrent tous une réduction importante de ce nombre, indiquant un rôle crucial de la voie de signalisation SFC-Kit dans le développement/homéostasie postnatal des CIC.

1.1.4.3 Classification des CIC

Grâce à la découverte de l'expression du gène *c-Kit* dans les CIC, il est possible de les mettre en évidence de façon routinière dans le TGI à la fois chez l'homme et les animaux par immunohistochimie. Ainsi, en fonction de leur localisation dans l'épaisseur de la paroi du TGI, on distingue plusieurs sous populations de CIC (Blair *et al.*, 2014). Celles-ci comprennent, de la séreuse vers la lumière intestinale, les CIC : (i) situées sous la séreuse, (ii) mélangées aux cellules des couches musculaires longitudinale et circulaire, (iii) associées au plexus myentérique, (iv) situées entre et autour des faisceaux musculaires, (v) présentes dans le plexus musculaire profond et (vi) le long de la surface interne de la couche musculaire circulaire contre la sous-muqueuse (Figure 1.9).

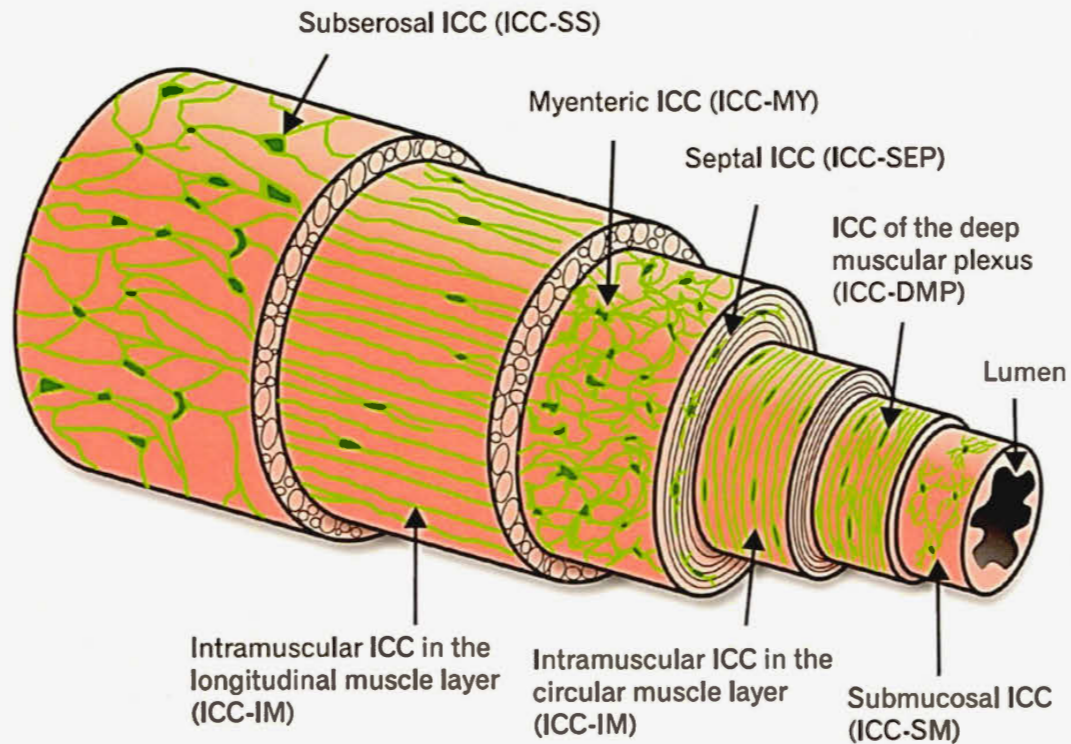


Figure 1.10 Dessin des différentes sous populations des cellules interstitielles de Cajal (CIC) dans la paroi du tractus gastrointestinal.

Subserosal ICC (ICC-SS), CIC situées sous la séreuse et la couche musculaire longitudinale ; Myenteric ICC (ICC-MY), CIC localisées au niveau du plexus myentérique entre les couches musculaires longitudinale et circulaire ; Septal ICC (ICC-SEP), CIC septales situées entre et autour des faisceaux musculaires ; ICC of the deep muscular plexus (ICC-DMP), CIC du plexus musculaire profond ; Intramuscular ICC in the longitudinal and circular muscle layers (ICC-IM), CIC intramusculaires intégrées dans les couches musculaires longitudinale et circulaire ; Submucosal ICC (ICC-SM), CIC sous-muqueuses localisées sur la face interne de la couche musculaire circulaire contre le plexus sous-muqueux ; Lumen, lumière intestinale (Figure extraite de (Blair et al., 2014)). ICC (interstitial cells of Cajal), cellules interstitielles de Cajal ; SS (subserosal), sous la séreuse ; MY (myenteric), myentérique ; SEP (septal), septal ; DMP (deep muscular plexus), plexus musculaire profond ; IM (intramuscular) intramusculaire ; SM (submucosal), sous-muqueux.

1.1.4.4 Fonction des CIC

Comme évoqué plus haut, le SNE via le plexus myentérique joue un rôle critique dans le contrôle des mouvements intestinaux en coordonnant finement les activités contractiles des couches musculaires de l'intestin. En fait, cette coordination s'appuierait aussi sur une activité d'auto-excitation (*pacemaker*) intestinale manifestée par des ondes électriques lentes. Des études ont montré que l'origine de ces ondes, générées dans la plupart des couches musculaires le long du TGI, réside dans les CIC (Der-Silaphet *et al.*, 1998; Hirst et Edwards, 2001). La propagation de ces ondes aux myocytes *in vivo* dépend de la présence d'un réseau des CIC à la fois intact et fonctionnel comme le démontre l'absence de l'activité *pacemaker* sur les intestins des souris mutantes W^{lacZ}/W^{lac} , W^{bd}/W^{bd} et Sl/S^{ld} . Par ailleurs, sur la base des évidences morphologiques et fonctionnelles récentes, la transmission neuromusculaire implique peu de contacts directs entre les neurones et les muscles, mais est principalement médiée par les CIC positionnées entre les varicosités des neurones et les muscles (Ward, S. M. *et al.*, 2004). Ceci est supporté par le fait que les CIC expriment les récepteurs fonctionnels requis pour la neurotransmission des neurones moteurs entériques (Epperson *et al.*, 2000). Enfin, ensemble ces observations soulignent l'importance du rôle subsidiaire des CIC dans la régulation de la motricité intestinale par le SNE.

1.2 Développement du SNE

1.2.1 Origine du SNE : Les cellules de la crête neurale (CCN)

Les CCN constituent une population transitoire de cellules multipotentes et migratoires issues d'une structure embryonnaire spécifique aux vertébrés, la crête neurale. La crête

neurale apparaît lors de la neurulation, au moment de la formation de la plaque neurale (Figure 1.10). Elle est induite aux frontières entre la plaque neurale et l'ectoderme non neural. Lorsque la plaque neurale s'invagine, pour former le tube neural, les bords latéraux de la plaque (ou bourrelets neuraux) convergent au milieu de la ligne dorsale puis fusionnent en suivant une progression cranio-caudale, positionnant la crête neurale sur la partie dorsale du tube neural (pour revue voir (Gammill et Bronner-Fraser, 2003; Green *et al.*, 2015)).

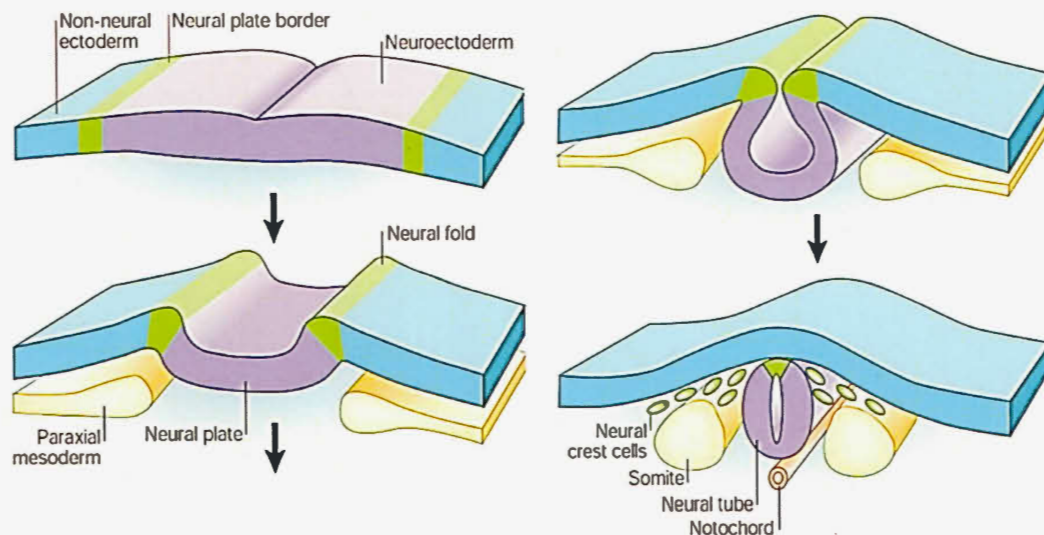


Figure 1.11 Formation du tube neural et de la crête neurale.

Lors de la neurulation les bords latéraux de la plaque neurale (vert) se soulèvent et fusionnent pour former le tube neural (violet). La crête neurale (vert) constitue la partie dorsale du tube neurale d'où vont alors partir les cellules de la crête neurale pour migrer à travers l'embryon (adapté de (Gammill et Bronner-Fraser, 2003)). Non-neural ectoderm, ectoderme non neural ; Neural plate border, bordure de la plaque neurale ; Neuroectoderm, neuroectoderme ; Neural fold, pli neural ; Neural plate, plaque neurale ; Paraxial mesoderm, mésoderme paraxial ; Neural crest cells, cellules de la crête neurale ; Somite, somite, Neural tube, tube neural ; Notochord, notocorde.

Peu avant, pendant ou après la fermeture du tube neural, en fonction de l'espèce considérée, après avoir subi une transformation épithélio-mésenchymateuse les CCN se délaminent de la partie dorsale du tube neural et migrent à travers l'embryon en empruntant des chemins stéréotypés vers des destinations diverses où elles se différencient en une gamme variée de types cellulaires incluant entre autres les neurones et les cellules gliales du système nerveux périphérique, les mélanocytes, et les os/cartilages du squelette crano-facial (Green *et al.*, 2015). Il est important de noter que le devenir des CCN dépend de leur position d'origine par rapport à l'axe antéro-postérieur, des signaux qu'elles perçoivent en provenance de l'environnement sur leurs trajets de migration ainsi que de leurs échanges avec les autres cellules présentes sur leurs sites de destination finale (Simoës-Costa et Bronner, 2015). Ainsi, en fonction de la position antéro-postérieure on distingue quatre subdivisions de la crête neurale : crâniale, vagale, troncale et sacrale ; lesquelles ainsi que les cellules qui en dérivent sont illustrées ci-dessous avec les dérivées cellulaires correspondantes (Figures 1.11). De plus, l'induction de la crête neurale, la spécification des progéniteurs des CCN en CCN pré-migratoires, la transition épithélio-mésenchymateuse, le comportement migratoire ainsi que la différenciation ultime des CCN sont des processus ultra-complexes dont la régulation spatio-temporelle est gouvernée par un réseau de gènes régulateurs (Figures 1.12). En effet, le développement et la succession de ces différentes étapes dépendent des interactions entre les joueurs clés de ce réseau notamment les molécules de signalisation (morphogènes) et les facteurs de transcription. De plus, le développement de la crête neurale et de ses dérivés cellulaires peut également être régulé via des mécanismes épigénétiques. Par ailleurs, il est important de noter que tout ceci constitue un sujet qui sort du cadre de cette thèse, et est développé en détail ailleurs (pour revue voir (Gammill et Bronner-Fraser, 2003; Green *et al.*, 2015; Huang et Saint-Jeannet, 2004; Martik et Bronner, 2017; Simoës-Costa et Bronner, 2015; Trainor, 2005).

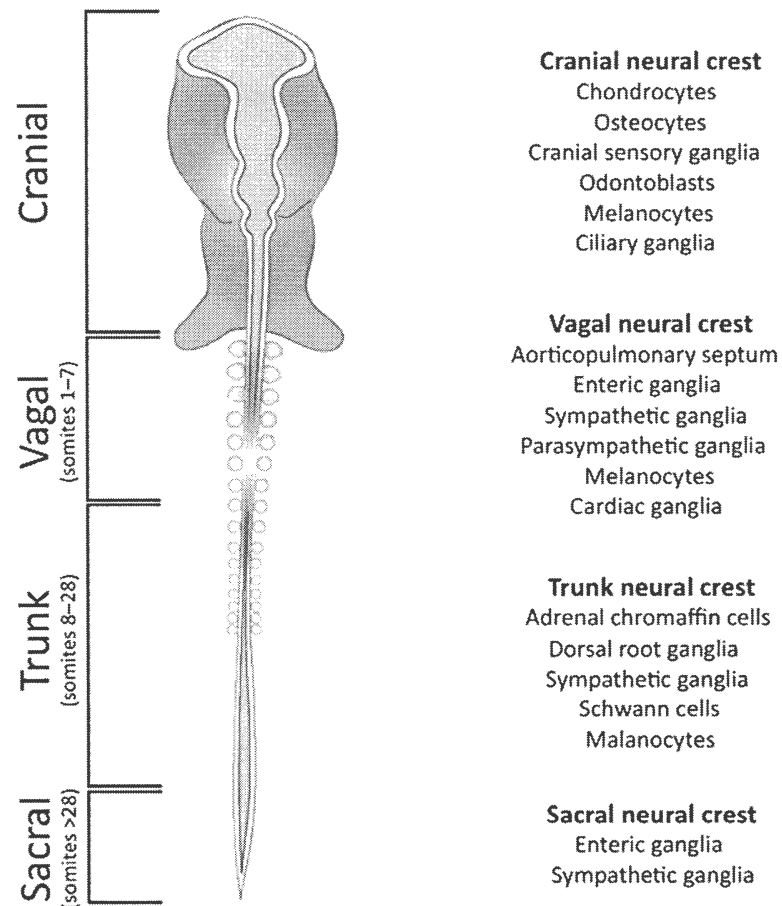


Figure 1.12 Les différentes régions de la crête neurale et le devenir des cellules qui en dérivent. Représentation schématique de la vue dorsale d'un embryon de vertébré illustrant la position des subdivisions de la crête neurale par rapport à l'axe antéro-postérieur, et certains de leurs dérivés. Les cellules de la crête neurale (CCN) de tous les niveaux de l'axe vont contribuer aux mélanocytes. Les CCN crânielles vont donner notamment les ganglions des nerfs crâniens et une partie des éléments qui composent le squelette crano-facial. Les CCN vagues vont contribuer entre autres au SNE et au septum cardiaque. Les CCN troncales vont former les ganglions de la racine dorsale et les ganglions sympathiques du système nerveux périphérique. Les CCN sacrales vont partiellement contribuer aux ganglions entérique et sympathique (Figure extraite de (Martik et Bronner, 2017)).

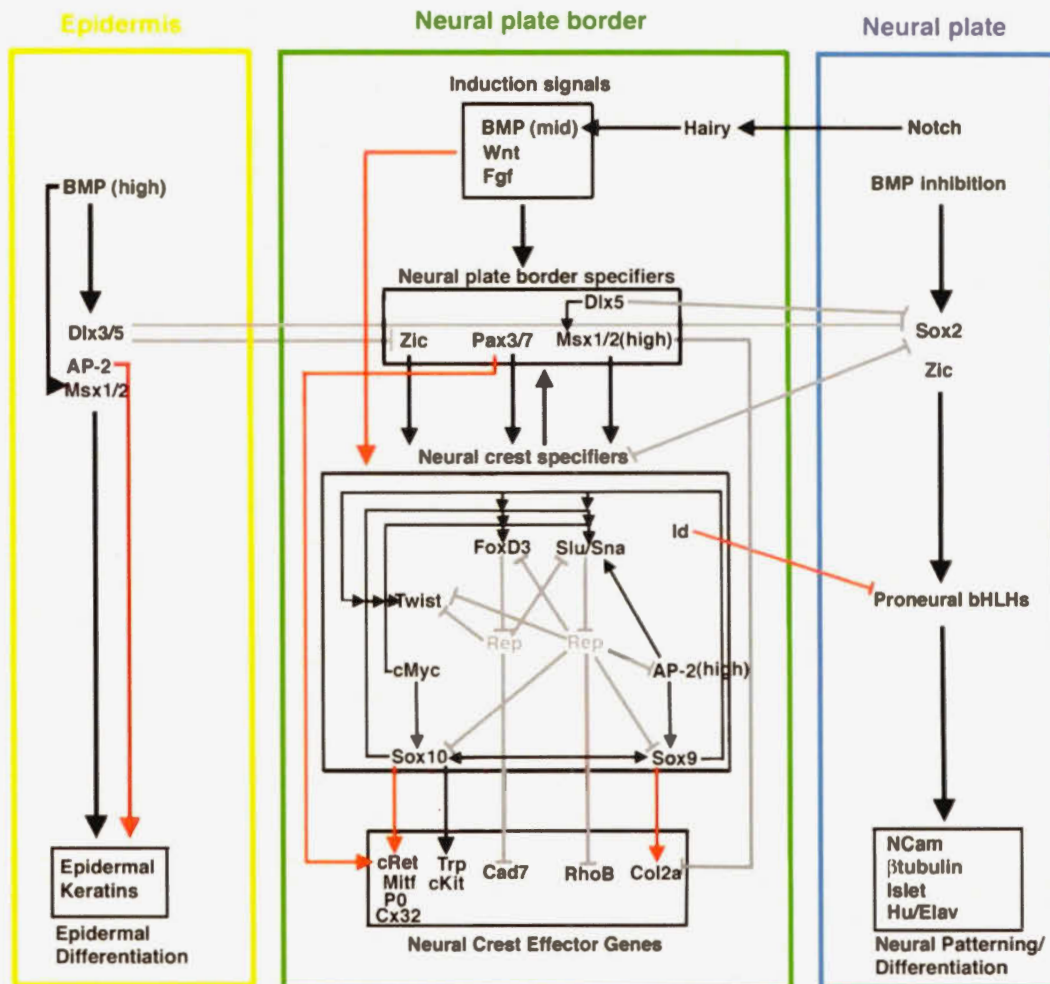


Figure 1.13 Illustration du réseau de gènes régulateurs qui contrôlent le développement de la crête neurale ainsi que ses dérivés cellulaires.

(Figure extraite de (Meulemans et Bronner-Fraser, 2004))

Les progéniteurs des neurones/cellules gliales qui composent le SNE proviennent donc de la crête neurale. La preuve de cette origine a été démontrée pour la première fois il y a plus de 60 ans quand Yntema et Hammond, après avoir excisé par microchirurgie

des niveaux définis de la crête neurale chez l'embryon de poulet, ont montré que les neurones dans le TGI, les poumons et le cœur proviennent des CCN vagales (Yntema et Hammond, 1954). Environ 20 ans après, Le Douarin *et al.*, en utilisant des chimères caille-poulet, ont confirmé que les CCN vagales forment la grande majorité des neurones sur toute la longueur du TGI. Dans la même foulée ils ont également mis à jour, pour la première fois, la contribution mineure d'une seconde population de CCN, les CCN sacrales qui forment un petit contingent des neurones entériques mais principalement dans le côlon (Le Douarin et Teillet, 1973). Depuis ces premières observations le raffinement des techniques de biologie du développement, grâce aux progrès de la biologie moléculaire et de l'imagerie en temps réel par microscopie confocale ainsi que l'émergence d'anticorps dirigés contre différents types cellulaires, a permis au fil des années de déterminer avec une grande résolution l'origine axiale des populations des CCN qui forment le SNE. Ainsi à l'heure actuelle, des expériences de traçage des lignées cellulaires de la crête neurale ont non seulement confirmé une origine similaire (e.g. vagale et sacrale) du SNE chez les mammifères, notamment chez la souris (Anderson *et al.*, 2006; Durbec *et al.*, 1996; Kapur, 2000; Serbedzija *et al.*, 1991; Wang, X. *et al.*, 2011), mais aussi ont révélé la contribution d'une troisième population, les CCN troncales (Durbec *et al.*, 1996; Uesaka *et al.*, 2015).

Ci-dessous est une description des aspects spatio-temporels de la contribution des CCN vagales, troncales et sacrales à la formation du SNE basée principalement sur des observations faites chez la souris. Dans cette optique, il convient de garder en mémoire les caractéristiques anatomiques du tube digestif de l'embryon de la souris lequel comprend, dans la direction antéro-postérieure, quatre régions : l'intestin antérieur, le mi-intestin, le cæcum et l'intestin postérieur. Chez le nouveau-né et l'adulte, ces quatre structures embryonnaires donneront respectivement l'œsophage/estomac, le petit intestin (lui-même subdivisé en : duodénum, jéjunum et iléon), le cæcum et le côlon/rectum (Heath, 2010).

1.2.2 La colonisation de l'intestin par les CCN

1.2.2.1 La contribution des CCN vagales

Chez la souris, la formation du SNE commence au jour embryonnaire (E) 8.5 par la migration dorso-ventrale des CCN vagales vers l'intestin antérieur. À E9.5 elles parviennent à l'intestin antérieur, s'y infiltrent (à partir de ce point elles sont dénommées CCN entérique (e) (CCNe). Cette appellation s'applique également aux CCN d'origine troncale et sacrale une fois qu'elles ont pénétré le tube digestif) (Durbec *et al.*, 1996; Kapur *et al.*, 1992) et migrent ensuite en une seule vague rostro-caudale dans le mésenchyme intestinal pour coloniser la totalité du tube digestif (Young *et al.*, 1998). Il convient de noter qu'à ce stade du développement, l'intestin est un tube droit, mais va également poursuivre son programme de développement au fur et à mesure que les CCNe le colonisent. Il va ainsi subir une croissance et un réarrangement morphologique considérable comme l'illustre sa régionalisation (e.g. l'apparition des circonvolutions du mi-intestin, le bourgeonnement du cæcum et l'allongement et l'épaississement de l'intestin postérieur) ainsi que son repliement, à E11-11.5, en épingle à cheveux conduisant au rapprochement transitoirement du mi-intestin et l'intestin postérieur séparés par une fine couche de mésentère (Figure 1.13 A). De manière très intéressante, ces changements dynamiques de la morphologie du tube digestif contribuent à la colonisation de l'intestin postérieur par les CCNe (Obermayr *et al.*, 2013). En effet, à E11.5 alors qu'une partie des CCNe marque une pause de 12h à la base du cæcum (Druckenbrod et Epstein, 2005) avant de le coloniser et parvenir à la partie proximale de l'intestin postérieur à E12.5 ; l'autre partie prend un raccourci en rentrant directement dans l'intestin postérieur via le chemin dit «trans-mésentérique» (Nishiyama *et al.*, 2012) entre E10.5-11.5 (Figure 1.13 A). Ainsi vers E12.5 les deux populations de CCNe se rejoignent dans l'intestin postérieur. Il est important cependant de noter que ce sont les CCNe trans-mésentériques qui vont majoritairement coloniser l'intestin postérieur jusqu'au stade E14.5 (Nishiyama *et al.*,

2012) (Figure 1.13 A). Par ailleurs, après cette première vague de migration linéaire dans le mésenchyme intestinal permettant la formation du plexus myentérique, vers E15.5 les CCNe vagues réalisent une seconde migration centripète radiale vers l'épithélium intestinal pour coloniser le mésenchyme sous-muqueux et former le plexus sous-muqueux (Lake et Heuckeroth, 2013; Uesaka *et al.*, 2013) (Figure 1.13 B).

1.2.2.2 La contribution des CCN troncales

Chez la souris la contribution des CCN troncales à la formation du SNE a été démontrée pour la première fois par Durbec, P.L.*et al.*, qui, en effectuant un suivi *in vitro* des CCN en provenance des régions rostrales du tube neural préalablement colorées avec le Dil, ont constaté qu'une partie des CCNe présentes dans l'intestin antérieur (i.e. le future œsophage et estomac) dérivent de la partie antérieure de la crête troncale (Durbec *et al.*, 1996) (Figure 1.13 C). Plus récemment grâce aux expériences de traçage génétique des lignées cellulaires *in vivo*, Uesaka *et al.*, ont dévoilé un autre niveau de contribution des CCN troncales médié par les précurseurs des cellules de Schwann (PCS) (Uesaka *et al.*, 2015). Ils ont utilisé la lignée de souris *Dhh::Cre/Gfra1^{fl-GFP/+}* (le gène *Gfra1* est exprimé par tous les CCNe alors que le gène *Dhh* est exprimé par les PCS et les cellules de Schwann), chez qui tous les PSC et leur descendance expriment de manière constitutive la GFP après defloxyage par la Cre recombinase. Dans un premier temps, leurs observations ont démontré que vers E14.5 une population de PSC envahit la paroi de l'intestin postérieur via les nerfs extrinsèques dans le mésentère pour donner naissance à quelques neurones principalement dans le plexus sous-muqueux. Ensuite, de façon similaire vers E16.5 une autre sous population de PCS via les nerfs pelviens colonise l'intestin postérieur contribuant au SNE tant dans le plexus sous-muqueux que dans le plexus myentérique. De plus dans le côlon des souris adultes ils ont également

montré que ces PSC donnent naissance à ~ 20% des neurones du plexus myentérique dont la quasi-totalité exprime le neurotransmetteur Calrétinine (Uesaka *et al.*, 2015).

1.2.2.3 La contribution des CCN sacrales

Tel qu'évoqué précédemment, à l'instar du poulet, la contribution des CCN sacrales au SNE entérique a également été démontrée chez la souris. La première mise en évidence de cette contribution a été faite par Kapur en 2000. Tirant avantage de la lignée de souris *Wnt1-lacZ*, il a montré que les CCN sacrales forment les ganglions du plexus pelvien flaquant l'intestin postérieur (aux alentours des stades embryonnaires E10 et E11) et qu'elles ne pénètrent pas l'intestin postérieur avant l'arrivée des CCN vagues, soit entre E13.5-14 (Kapur, 2000). Onze ans après, ces observations ont été également validées par Wang *et al.*, qui ont montré que les CCN sacrales migrent du tube neural à E9.5 pour former dans un premier temps les ganglions pelviens de chaque côté de l'intestin postérieur à E11.5. Dans un deuxième temps, à E13.5 via les fibres nerveuses extrinsèques qui émanent de ces ganglions elles s'infiltrèrent dans la région distale de l'intestin postérieur par ses côtés ventrolatéraux pour ultimement contribuer à l'échelle de ~12% au SNE dans le côlon (Figure 1.13 D). Wang *et al.*, ont également montré que la colonisation de l'intestin postérieur par les CCN sacrales non seulement se fait dans le sens inverse de la colonisation des CCN vagues (i.e. de la direction caudo-rostrale) mais aussi qu'elle n'en dépend pas (Wang, X. *et al.*, 2011).

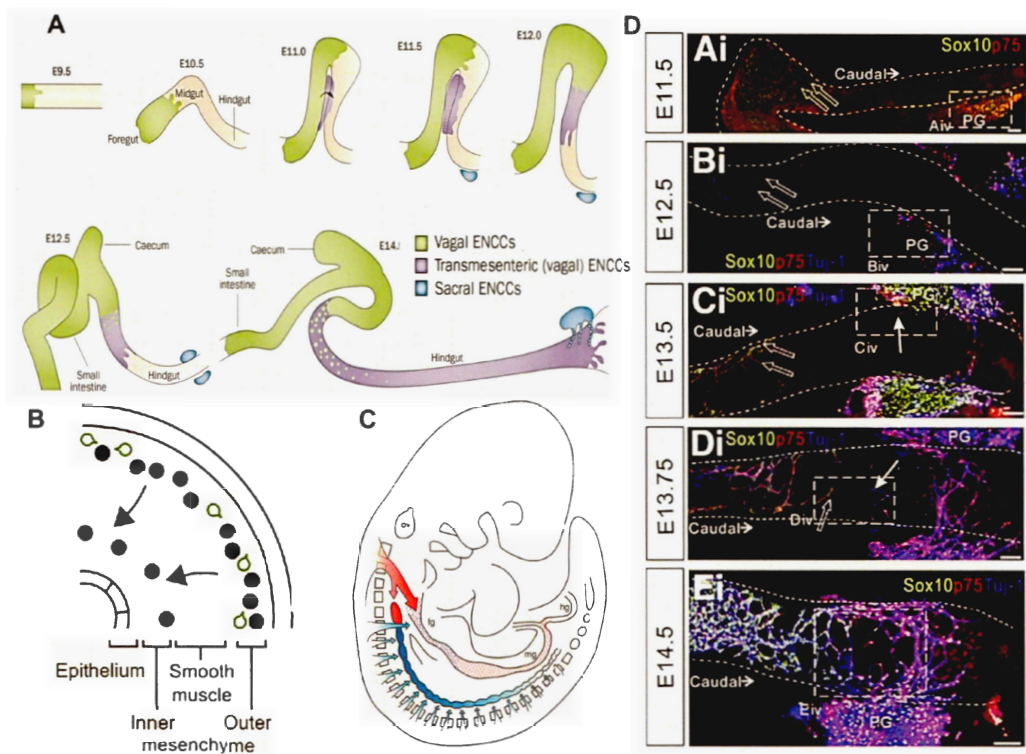


Figure 1.14 Les étapes de développement du SNE.

(A-D) Représentations schématiques (A-C) et images de marquages immunohistochimiques de l'intestin postérieur (D) illustrant les étapes de la formation embryonnaire du SNE chez la souris. (A) Les cellules de la crête neurale entérique (CCNe) d'origine vagale (vert) s'infiltrent dans l'intestin antérieur au tour du jour embryonnaire (E) 9 et migrent dans le mésenchyme du tube digestif dans la direction caudale. À E11.0-E11.5 une sous population de CCNe vagales (violet) pénètrent dans l'intestin postérieur en empruntant le chemin trans-mésentérique pour former le SNE présent dans une grande partie du côlon. Les CCNe vagales parviennent à l'extrémité anale du tube digestif vers E14.5. À E13.5 les CCN sacrales (bleu), via les fibres nerveuses extrinsèques qui émanent des ganglions pelviens, s'infiltrent dans la région distale de l'intestin postérieur (Figure extraites de (Obermayr et al., 2013)). (B) Vers E15.5 les CCNe réalisent une seconde migration centripète radiale vers l'épithélium intestinal pour former le plexus sous-muqueux (Figure extraite de (Lake et Heuckeroth, 2013)). (C) Les CCN vagales (rouge) migrent dans la direction ventrale pour peupler la totalité du tube digestif ainsi que le ganglion cervical supérieur. Les CCN troncales (bleu) colonisent l'intestin antérieur de même que la chaîne sympathique postérieure au ganglion cervical supérieur (Figure tirée de (Durbec et al., 1996)). (D) Intestins postérieurs entiers montrant les CCN sacrales (Sox10⁺/p75⁻) et la migration rostro-caudale des CCNe vagales (aussi Sox10⁺/p75⁻ indiquées par les flèches ouvertes). Comme décrit en (A), à E13.5 les CCN sacrales (flèches solides) rentrent dans la région distale de l'intestin postérieur via les fibres nerveuses (Tuj-1⁺) émanant des ganglions pelviens (Images extraites de (Wang, X. et al., 2011)). Foregut (fg), intestin antérieur ; Midgut (mg), mi-intestin ; Hindgut (hg), intestin postérieur ; ENCCs, cellules de la crête neurale entérique (CCNe) ; Vagal ENCCs, CCNe vagales ; Transmesenteric (vagal) ENCCs, CCNe vagales trans-mésentériques ; Sacral ENCCs, CCNe sacrales ; Epithelium, épithélium ; Smooth muscle, muscle lisse ; Mesenchyme, mésenchyme ; Inner, interne ; Outer, extérieur ; Caudal, caudal ; PG (pelvic ganglion), ganglion pelvien ; Sox10/p75, marquent les CCNe ; Tuj-1, marque les neurones et les fibres nerveuses.

1.2.3 Les mécanismes cellulaires de la colonisation de l'intestin par les CCN

1.2.3.1 La migration des CCN dans l'intestin (CCNe)

La capacité des CCNe à coloniser la totalité de l'intestin embryonnaire est donc intimement liée à leur habilité à migrer dans le mésenchyme intestinal. L'essentiel de notre connaissance de ce processus de migration provient des expériences de cultures *ex-vivo* d'intestins entiers de souris transgéniques (dont les CCNe expriment spécifiquement des molécules fluorescentes) couplées à l'imagerie confocale en temps réel. Ainsi, la migration individuelle et collective des CCNe de même que la vitesse et la directionnalité qui y sont associées ont pu être étudiées plus en détail. Bien que les aspects dynamiques de la migration des précurseurs du SNE diffèrent selon leur origine axiale, ici nous aborderons seulement ceux des CCNe d'origine vagale.

Dans le tube digestif, les CCNe vagues migrent principalement en chaînes de cellules en contact les unes avec les autres (Druckenbrod et Epstein, 2005, 2007; Young *et al.*, 2004; Young *et al.*, 2014). Ces chaînes sont observées dans le mi-intestin à E10.5 et l'intestin postérieur à E12.5, et avancent dans la direction rostro-caudale (Figure 1.13 A). Cependant, les trajections et la vitesse de migration, de part et d'autre du front de migration, autant des CCNe individuelles que des chaînes sont complexes et imprévisibles. En effet, des analyses du comportement individuel des CCNe fluorescentes par imagerie en temps réel des cultures d'intestins montrent que les cellules dans les chaînes grimpent les unes sur les autres, et ont des trajections erratiques (Young *et al.*, 2004). De plus, certaines CCNe peuvent soit se détacher des chaînes, souvent pour former des nouvelles chaînes, soit avancer le long des chaînes existantes (Druckenbrod et Epstein, 2007). Ceci est par exemple le cas dans le cæcum où une partie des CCNe, après s'être détachée des chaînes, dans un premier temps migrent individuellement en cellules isolées. Ensuite, au fil de leur progression caudale, ces cellules se regroupent en agrégats isolés du réseau principal. Ceux-ci vont

éventuellement s'interconnecter pour former des chaînes dans l'intestin postérieur médian (Druckenbrod et Epstein, 2005). Une analyse récente et plus poussée a confirmé ces observations et, de plus, révélé que ce sont les CCNe dans les chaînes qui envahissent les régions caudales inoccupées malgré le fait qu'elles avancent moins vite par rapport à celles situées juste en arrière (entre 300 μm et 450 μm) de la chaîne (Young *et al.*, 2014). Ensemble, ces observations démontrent que le comportement migratoire des CCNe individuelles est erratique. Néanmoins en dépit de ceci, la structure d'ensemble des chaînes, les espaces entre elles ainsi que leur directionnalité persistent à travers le temps (Lake et Heuckeroth, 2013). Par ailleurs, il faut noter que les CCNe situées plus en arrière des chaînes et/ou du front de migration aussi continuent à migrer, mais plutôt de façon circonférentielle et moins lentement. Ce phénomène qui dure à peu près 24h après le passage du front de migration permet de coloniser les espaces vierges qui apparaissent au fur et à mesure que l'intestin se développe (Druckenbrod et Epstein, 2007; Young *et al.*, 2014).

1.2.3.2 Prolifération et la survie des CCNe

La prolifération et la survie des CCNe sont deux facteurs cruciaux à la formation du SNE dans le sens où elles permettent la production et le maintien d'un nombre suffisant de progéniteurs requis à la fois pour la colonisation complète de l'intestin et la génération de la gamme complète des neurones/cellules gliales présents dans le SNE chez l'adulte (Heanue et Pachnis, 2007). Au cours de la colonisation, le taux de prolifération des CCNe est comparable dans toutes les régions du tube digestif, et ce, indépendamment de leur position par rapport au front de migration (Young *et al.*, 2005). La prolifération des CCNe derrière le front de migration assure le maintien de la colonisation de l'intestin en croissance, alors qu'au front de migration celle-ci génère un nombre suffisant de cellules indispensable à la progression des chaînes vers les

régions vierges caudales du tube digestif. Il est important de noter que la taille de la population des CCN pré-entériques joue également un rôle important dans l'efficacité de la colonisation. En effet, Barlow *et al.*, en effectuant une ablation partielle de la crête neurale vagale, ont observé une colonisation incomplète de l'intestin par les CCNe suggérant l'importance de la présence d'un nombre critique de CCN pré-entériques dans l'efficacité de la colonisation (Barlow, A. J. *et al.*, 2008). Cette idée est supportée par le fait que certaines mutations résultant en une diminution du nombre des CCNe, soit par un défaut de prolifération ou une apoptose précoce, causent une colonisation incomplète de l'intestin (Gianino *et al.*, 2003; Stanchina *et al.*, 2006). Ces mutations seront évoquées dans la section traitant des mécanismes moléculaires qui contrôlent le développement du SNE.

1.2.3.3 Différenciation des CCNe

Tout au long de leur migration à la fois du tube neural vers l'intestin embryonnaire et dans le mésenchyme de ce dernier, les précurseurs du SNE d'origine vagale expriment des marqueurs permettant de les distinguer des autres types cellulaires de l'intestin. Chez la souris, les CCN vagales pré-entériques expriment entre autres Sox10, Sox2, *Ednrb* et *p75*. En plus de ceux-ci, peu avant et/ou après leur entrée dans l'intestin antérieur, elles vont également exprimer des marqueurs tels que *Ret*, *Phox2b*, *P0*, *L1cam*, *N-cadherin*, *Hand2*, *Hoxb5* et *Ascl1/Mash* et *ErbB3* (pour revues voir (Nagy et Goldstein, 2017; Young et Newgreen, 2001)). Bien qu'à l'heure actuelle on ne sait pas si toutes les CCN vagales pré-entériques expriment ou pas toutes ces molécules, les CCN non-différenciées multipotentes (ou encore les progéniteurs entériques) dans le tube digestif au stade E9.5 ont été montrées pour être du phénotype *Sox10⁺/P75⁺/Phox2b⁺/Ret⁺* (Anderson *et al.*, 2006). Durant l'histogénèse du SNE, ces

progéniteurs entériques passent par différentes phases de différenciation pour donner naissance aux différents types de neurones/cellules gliales entériques.

À l'instar de la colonisation, la différenciation des progéniteurs entériques se fait également dans la direction rostro-caudale. Entre E10-14, tandis que les CCNe plus rostrales (derrière le front de migration) s'engagent dans différentes voies de différenciation, celles situées au, ou très proche du, front de migration sont non-différenciées. En effet, déjà entre E10-10.5 environ 10-20% des CCNe dans le l'estomac et le petit intestin proximal commencent à exprimer les marqueurs généraux des neurones tels que HuC/D, la bêta3-tubulin (Tuj-1), le neurofilament-M et PGP9.5 (Young *et al.*, 1999) au détriment de l'expression de Sox10 ainsi que p75 (Young *et al.*, 2003). Notez qu'environ 50% de ces neurones, considérés immatures, continuent à migrer mais à une vitesse plus réduite que celle des progéniteurs entériques non-différenciés (Hao et Young, 2009). Quant aux marqueurs spécifiques des différents sous-types neuronaux (i.e. les neuromédiateurs), ils apparaissent à différent moment allant des stades embryonnaires aux périodes postnatales précoces. Par exemple, alors que les neurones NOS⁺, NPY⁺, substance P⁺ et CGRP⁺ sont détectés pour la première fois respectivement à partir de E11.5, E13-13.5, E14-14.5 et E17-17.5; les neurones Calrétinine⁺ n'apparaissent pas avant à la naissance (pour revue voir (Hao et Young, 2009)).

Par ailleurs, contrairement à la différenciation neuronale, la différenciation gliale débute un peu tard comme le démontre l'apparition des cellules gliales immatures qui expriment B-FABP dans le mi-intestin seulement vers E11.5, soit un jour après l'émergence des neurones immatures. De plus contrairement aux neurones, elles maintiennent l'expression de Sox10 et p75 (Young *et al.*, 2003). Notez qu'à l'heure actuelle, à la différence des neurones immatures, les études évaluant la capacité migratoire des cellules gliales immatures sont inexistantes. Les marqueurs gliaux

tardifs à savoir S100 β + et GFAP ne sont pas détectés respectivement avant E14.5 et E16.5 (Sasselli *et al.*, 2012; Young *et al.*, 2003).

1.2.3.4 Dépendance de la migration à la prolifération et la différenciation

La migration, la prolifération et la différenciation des CCNe sont souvent considérées et étudiées comme des processus séparés. Cependant, de nombreuses études montrent que la taille de la population (dictée par la prolifération) et la différenciation des CCNe ont toutes un effet sur leur capacité migratoire. Conformément à cette idée, les CCNe au front de migration avancent plus lentement lorsqu'elles sont séparées de la majorité des progéniteurs entériques (Young *et al.*, 2004). De plus, de nombreuses mutations causant soit des défauts de prolifération ou de différenciation ont été associées à un retard de migration des CCNe. Certaines de ces mutations seront décrites plus en détail dans la section 1.3.2.

La colonisation normale de l'intestin par les CCNe nécessite donc une coordination étroite de la migration, la prolifération et la différenciation. Le contrôle fin de ces processus cellulaires est gouverné par des gènes majeurs exprimés de manière mutuellement exclusive par les CCNe et certains types cellulaires de l'intestin. La mutation de ces gènes cause des anomalies développementales du SNE. Parmi celles-ci la maladie de Hirschsprung est la mieux comprise et la plus caractérisée.

1.3 La maladie de Hirschsprung (HSCR)

1.3.1 Définition, épidémiologie, symptômes, classification et traitement

Avec une incidence globale de 1/5000 nouveau-nés, la maladie de Hirschsprung (HSCR) ou mégacôlon aganglionnaire est une malformation congénitale sévère du SNE touchant le plus souvent les garçons avec un ratio de 4 garçons pour une 1 fille. HSCR est causée par l'absence de ganglions nerveux entériques (aganglionose) dans les régions terminales de l'intestin due à l'arrêt prématuré de la colonisation du tube digestif par les CCNe au cours du développement embryonnaire (Amiel *et al.*, 2008; Gariépy, 2004; Obermayr *et al.*, 2013; Wallace et Anderson, 2011). En accord avec le rôle du SNE dans la coordination des mouvements péristaltiques, ceux-ci sont altérés ou absents au niveau du segment affecté ; lequel subit une contraction tonique conduisant à une occlusion partielle ou complète avec accumulation du contenu intestinal et à une distension massive de l'intestin en amont de ce point. Les signes cliniques de HSCR incluent l'occlusion intestinale associée à une constipation sévère, des vomissements, une distension abdominale et, dans les cas les plus redoutables, l'inflammation intestinale (entérocolite). Bien que dans la plupart des cas, le diagnostic est posé chez les nouveaux nés, certains patients sont diagnostiqués soit au cours de leur enfance soit à l'âge adulte. Ceci démontre une variabilité dans l'âge de la survenue de la maladie. Par ailleurs, il convient de noter que certains de ces signes cliniques peuvent résulter d'autres malformations congénitales soit du tube digestif en soi, soit du SNE mais n'impliquant pas l'aganglionose. Il s'agit entre autres de l'atrésie iléale et colique, la duplication ou malrotation intestinale et la ganglioneuromatose intestinale (hyperplasie des plexus myentérique et des fibres nerveuses). Ainsi le diagnostic le plus concluant de HSCR repose sur l'examen de la biopsie chirurgicale de la paroi rectale ou du côlon pour confirmer l'aganglionose. Non traitée, HSCR est létale. Le seul traitement actuel est un traitement chirurgical et consiste en la résection du segment aganglionnaire suivie de l'anastomose de l'intestin proximal avec l'anus pour rétablir la continuité digestive. Cependant, malgré cette intervention certains patients

continuent de souffrir de troubles fonctionnels de l'intestin incluant la constipation chronique, l'incontinence et l'entérocolite ; suggérant le SNE est défectueux dans les régions en amont du segment aganglionnaire. En effet, des analyses du plexus myentérique dans ces régions (aussi connues sous le nom de la zone de transition) effectuées à la fois chez les patients et les modèles murins pour HSCR ont révélé la présence des défauts du SNE caractérisés principalement par une réduction de la densité neuronale accompagnée d'une disproportion des sous-types neuronaux impliquant le plus souvent une augmentation du nombre des neurones nitrergiques (nNos⁺) (Cheng, L. S. *et al.*, 2016; Musser *et al.*, 2015; Zaitoun *et al.*, 2013).

Sur la base de l'étendue de l'aganglionose, les patients atteints de HSCR sont classés dans deux grandes catégories à savoir la forme court-segment (ou encore la forme classique, 80% des cas) où l'aganglionose est limitée à la région recto-sigmoïde du côlon, et la forme long-segment (20% des cas) quand celle-ci s'étend au-delà du côlon sigmoïde. Notez qu'au sein de ces catégories on peut également trouver 4 variants de HSCR : Dans le variant ultra-court segment, l'aganglionose implique le rectum distal en dessous du plancher pelvien et l'anus. Dans le variant aganglionose colique totale (8% des cas) celle-ci s'étend sur le côlon en entier, tandis que dans l'aganglionose intestinale totale elle atteint l'intestin dans son ensemble. Enfin dans le controversé quatrième variant ou HSCR suspendue c'est une portion du côlon, située au-dessus d'un segment distal normal, qui est aganglionnaire (pour revue voir (Amiel *et al.*, 2008)). HSCR peut être familiale ou sporadique, et se manifester comme un trait isolé (70% des cas) ou s'inscrire dans des syndromes (30% des cas) tels que le syndrome de Waardenburg et le syndrome de Down (la trisomie 21) (Amiel *et al.*, 2008; Obermayr *et al.*, 2013; Wallace et Anderson, 2011). Une liste exhaustive de toutes les formes syndromiques de HSCR connues à ce jour est donnée dans la revue de (Amiel *et al.*, 2008).

1.3.2 Contribution des facteurs génétiques dans HSCR

Les études de génétique humaine ont permis l'identification de plus d'une douzaine de gènes dont les mutations sont associées à la pathogénèse de HSCR. Ceux-ci incluent entre autres le gène codant pour le récepteur membranaire à activité tyrosine kinase, *RET* (Angrist *et al.*, 1995; Attie *et al.*, 1995; Edery *et al.*, 1994; Sancandi *et al.*, 2000) ; les gènes codant pour ses ligands appartenant à la famille des facteurs neurotrophes dérivés de la glie, *GDNF* (Angrist *et al.*, 1996; Ivanchuk *et al.*, 1996; Salomon *et al.*, 1996) et *NTN* (Doray *et al.*, 1998; Ruiz-Ferrer *et al.*, 2011) ; les gènes qui codent pour le ligand endothéline-3 ainsi que l'enzyme catalysant la biosynthèse de ce dernier, respectivement *EDN-3* (Endothelin-3) (Bidaud *et al.*, 1997) et *ECE* (Endothelin converting enzyme) (Hofstra *et al.*, 1999) ; le gène codant pour le récepteur de l'endothéline-3, *EDNRB* (Endothelin receptor, type B) (Amiel *et al.*, 1996; Auricchio *et al.*, 1996; Kusafuka *et al.*, 1996) ; les gènes *SOX10* (Pingault *et al.*, 1998; Touraine *et al.*, 2000), *ZFHXIB* (Sasongko *et al.*, 2007; Wakamatsu *et al.*, 2001), *PHOX2B* (Trang *et al.*, 2005; Trochet *et al.*, 2005) et *TCF4* (Zweier *et al.*, 2007) codant tous pour des facteurs de transcription ; le gène *KIAA1279* codant pour la protéine intracytoplasmique KBP (kinesin family member 1 binding protein) (Brooks *et al.*, 2005) ; et enfin les gènes *PLD1*, *BACE1* et *BACE2* qui codent respectivement pour la phospholipase D1 et les bêta-sécrétases 1 et 2 (Tang *et al.*, 2018). Il est important cependant de noter que la pénétrance, la sévérité de l'aganglionose et le biais sexuel associée à chacune de ces mutations individuelles sont très variables ; démontrant la complexité de la génétique de HSCR. En accord avec ceci, chez certains patients des interactions gène-gène ainsi que l'influence des gènes et/ou loci modificateurs sur les mutations connues de la maladie ont été identifiées et suggérées comme étant à l'origine de HSCR (Angrist *et al.*, 1996; Auricchio *et al.*, 1999; Carrasquillo *et al.*, 2002; Garcia-Barcelo *et al.*, 2009; Ivanchuk *et al.*, 1996; Okamoto *et al.*, 1997; Parisi *et al.*, 2002; Salomon *et al.*, 1996).

De tous les gènes sus-mentionnés, le gène *RET* est le plus important et est muté dans 50% des cas familiaux et 15-20% des cas sporadiques de HSCR. Après lui vient, le gène *EDNRB* étant muté dans environ 5% des cas. Quant aux gènes *GDNF*, *NTN*, *EDN-3* et *ECE*, leur mutation sont rarement associées à la maladie (Amiel *et al.*, 2008). Les mutations des gènes *SOX10*, *PHOX2B*, *TCF4* et *KIAA1279* sont retrouvées dans les formes syndromiques de HSCR (pour articles voir (Brooks *et al.*, 2005; Pingault *et al.*, 1998; Sasongko *et al.*, 2007; Touraine *et al.*, 2000; Trang *et al.*, 2005; Trochet *et al.*, 2005; Wakamatsu *et al.*, 2001; Zweier *et al.*, 2007)).

1.3.2.1 Les gènes majeurs de HSCR contrôlent la formation du SNE

La découverte du phénotype mégacôlon aganglionnaire chez certaines espèces animales incluant la souris résultant de mutations spontanées des gènes (*Ednrb*, *Edn-3* et *Sox10*) a partiellement confirmé les résultats des études de génétique humaine. Parallèlement, la génération et la caractérisation d'autres modèles murins porteurs de mutations de gènes dont les homologues sont déjà associés ou restent à l'être à HSCR ont permis d'élargir le spectre des gènes connus impliqués dans la pathogénèse de HSCR en général, et le développement du SNE en particulier. Comme nous allons le voir, les gènes majeurs liés à HSCR gouvernent le contrôle des mécanismes cellulaires résidant à la base de la formation du SNE. Tel qu'évoqué plus haut, la plupart des molécules qu'ils encodent sont soit membres des voies de signalisation soit jouent le rôle de facteur de transcription.

1.3.2.2 Les voies de signalisation

1.3.2.2.1 GDNF/GFR α 1/RET

RET est une tyrosine kinase membranaire jouant le rôle de récepteur pour les membres de la famille des ligands GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor) à savoir GDNF, NTN (Neurturin), ARTN (Artemin) et PSP (Persephin). Chacun de ces ligands peut individuellement activer RET via la formation d'un complexe avec un co-récepteur GFR α (GDNF family receptor α) préféré; lequel est GFR α 1 pour GDNF ou GFR α 2, GFR α 3 et GFR α 4 respectivement pour NTN, ARTN et PSP (Sasselli *et al.*, 2012). De toutes ces voies de signalisation, GDNF–GFR α 1–RET est la plus importante pour le développement du SNE des mammifères. Chez la souris le ligand GDNF est exprimé par les cellules du mésenchyme intestinal. RET est présent sur la surface des CCNe migratoires mais plus tard dans le développement cette présence devient spécifique aux neurones. L'expression de GFR α 1 est détectée à la fois sur les CCNe et les cellules du mésenchyme intestinal. L'invalidation génétique de *Gdnf*, *Gfra1* ou *Ret* engendre l'aganglionose le long du tractus gastrointestinal à partir de l'estomac (Wallace et Anderson, 2011). L'absence totale de Ret cause une importante apoptose des CCNe spécifiquement dans le tube digestif antérieur (Taraviras *et al.*, 1999); démontrant l'importance de l'activation de Ret pour la survie des progéniteurs entériques. Outre ce rôle dans la survie, la signalisation GDNF–GFR α 1–RET est aussi impliquée de la régulation de la prolifération des CCNe. En effet, l'haploinsuffisance pour *Gdnf* cause une diminution de la capacité proliférative des CCNe, ce qui a pour effet une réduction de la densité neuronale (ou l'hypoganglionose) (Gianino *et al.*, 2003). De plus, en accord avec son profil d'expression dans le tube digestion durant la colonisation de l'intestin antérieur (i.e. exprimé en aval du front de migration), il a été montré *in vitro* que GDNF attire les CCNe (Natarajan *et al.*, 2002; Young *et al.*, 2001) suggérant le rôle de la voie GDNF–GFR α 1–RET dans le contrôle de la migration des CCNe *in vivo*.

1.3.2.2.2 ECE-1/EDN-3/EDNRB

La voie Endothelin converting enzyme-1/Endothelin-3/Endothelin receptor, type B (ECE-1/EDN-3/EDNRB) est la seconde voie de signalisation connue pour jouer un rôle majeur dans le développement du SNE. En effet chez la souris, la délétion ciblée ou spontanée soit du gène *Edn3* ou *Endrb* cause l'aganglionose colorectale ainsi que des anomalies de pigmentation du pelage (Baynash *et al.*, 1994; Hosoda *et al.*, 1994). Ces phénotypes sont similaires à ceux observés chez les mutants pour le gène *Ece1* (enzyme qui converti le précurseur inactif de l'EDN-3 en molécule active) (Yanagisawa *et al.*, 1998). L'EDN-3 est exprimé par les cellules du mésenchyme intestinal alors que son récepteur EDNRB est principalement exprimé par les CCNe (Nagy et Goldstein, 2017). L'absence de l'EDN-3 *in vivo* résulte en une diminution de la densité ainsi qu'un retard de migration des CCNe (Barlow, A. *et al.*, 2003; Bondurand *et al.*, 2006). De plus, la culture *in vitro* des intestins d'embryons de chimères caille-poulet en présence d'un inhibiteur de EDNRB ou une quantité excessive de l'EDN-3 causent respectivement une hypoganglionose ou une hyperganglionose associée à une augmentation de la prolifération des CCNe au détriment de leur différenciation (Nagy et Goldstein, 2006). Ensemble, ces études démontrent l'implication de la voie ECE1/EDN-3/EDNRB dans le contrôle de la prolifération, la différenciation et la migration des CCNe.

1.3.2.3 Les facteurs de transcription

Plusieurs facteurs de transcriptions, incluant SOX10, PHOX2B, ZFH1B (ou SIP1), FOXD3, HAND2, ASCL1 (ou MASH1), PAX3, TLX2 (ou HOX11L1), HOXB5, HLX1, DLX2 et des cofacteurs comme HIPK2 ont été impliqués dans le développement du SNE (Bondurand et Southard-Smith, 2016). Cependant, seulement

les mutations dans les trois premiers causent l'aganglionose, et sont observées chez les humains atteints de HSCR. Dans cette optique, seules les fonctions de SOX10, PHOX2B et ZFH1B durant la formation du SNE seront évoquées ici.

1.3.2.3.1 SOX10

SOX10 (ou encore SRY, Sex determining region Y-box10) est un facteur de transcription à domaine HMG (High Motility Group) apparenté à SRY. Chez la souris les CCN expriment le gène *Sox10* peu après leur émergence dans la crête neurale et durant leur migration vers les tissus cibles. Cette expression est maintenue dans les CCNe au cours de la colonisation du tube digestif (Nagy et Goldstein, 2017). La mutation spontanée (dominant megacolon, *Sox10^{Dom}*) ou ciblée (*Sox^{LacZ}*) du gène *Sox10* cause respectivement l'aganglionose du colon à sévérité variable (hétérozygote) et le manque absolu du SNE sur toute la longueur du TGI (homozygotes) combiné à des altérations au niveau d'autres tissus dérivés de la crête neurale (Sasselli *et al.*, 2012). Tout comme l'EDN-3, SOX10 aussi est impliqué dans la régulation de la prolifération des CCNe assurant le maintien d'un pool suffisant de celles-ci requis pour une colonisation complète du tube digestif (Bondurand *et al.*, 2006). De plus, cette contribution de SOX10 dans l'efficacité de la colonisation repose également sur son rôle dans la survie des CCN y compris celles d'origine vagale. En fait, l'aganglionose causée par les mutations du gène *Sox10* (sus-mentionnées) résulte de l'apoptose des CCN pré-entériques (Southard-Smith *et al.*, 1998). SOX10 intervient également dans la régulation de la différenciation des CCNe comme l'illustre l'extinction et le maintien de son expression respectivement dans les neurones et les cellules gliales (Nagy et Goldstein, 2017). Outre ses rôles dans le contrôle de la prolifération, la survie et la différenciation des CCNe, SOX10 intervient également dans la régulation de leur

migration (Corpening *et al.*, 2011) via son effet sur les propriétés d'adhésion cellulaire (Watanabe *et al.*, 2013).

1.3.2.3.2 PHOX2B

PHOX2B (Paired-like homeobox 2b) est un facteur de transcription à homéodomaine exprimé par les CCNe une fois qu'elles rentrent dans le mésenchyme intestinal (Anderson *et al.*, 2006). Il joue un rôle indispensable dans la formation de tous les ganglions du système nerveux autonome y compris ceux du SNE. Durant la formation du SNE, PHOX2B promeut la prolifération et la survie des CCNe. Ainsi, chez la souris la délétion du gène *Phox2b* a été montrée pour engendrer l'absence du SNE sur toute la longueur du TGI (Pattyn *et al.*, 1999).

1.3.2.3.3 ZFHX1B

ZFHX1B (Zinc finger homeobox, ou encore Smad interacting protein 1 (SIP1)) est un facteur de transcription appartenant à la famille des protéines ZFHX1 chez les vertébrés. Le gène *Zfmx1b* est exprimé dans les CCN avant et durant leur migration (Heanue et Pachnis, 2007). ZFHX1B est indispensable au développement des CCN d'origine vagale comme le démontre l'absence de celles-ci chez les souris déficientes pour le gène *Zfmx1b* (Van de Putte *et al.*, 2003).

1.3.2.4 Les interactions génétiques

Comment les gènes majeurs précédemment évoqués coordonnent leurs fonctions pour assurer la formation normale du SNE est un sujet qui fait l'objet de beaucoup d'études. L'existence d'interactions entre ces gènes clés a été suggérée pour la première fois à

l'issue de d'études de génétique humaine révélant des associations entre la variabilité de la pénétrance/sévérité de HSCR et la coexistence des variants (mutations) des gènes *RET* et *EDNRB* chez les patients (Carrasquillo *et al.*, 2002). Dès lors, chez les modèles animaux comme la souris de nombreuses autres interactions ont été et continuent d'être identifiées grâce à la caractérisation des anomalies de développement du SNE chez les doubles mutants issus de croisements entre individus porteurs d'une simple mutation associée au mégacôlon (pour revues voir (Bondurand et Southard-Smith, 2016; Heanue et Pachnis, 2007; Wallace et Anderson, 2011)). À titre d'exemple, ci-dessous nous décrirons seulement les interactions génétiques impliquant les gènes et/ou les voies de signalisation évoqués plus haut.

1.3.2.4.1 *GDNF/RET* et *EDN-3/EDNRB*

L'utilisation des modèles murins a non seulement permis de confirmer les interactions génétiques suggérées chez les patients de HSCR (Carrasquillo *et al.*, 2002) mais aussi d'élargir l'éventail de ce réseau d'interaction. Par exemple, alors que le TGI des souris simples mutantes *Ret*^{+/-} ou *Ednrb*^{s/s} [Piebald, mutation naturelle du gène *Ednrb* causant une diminution de son niveau d'expression (Hosoda *et al.*, 1994) mais presque jamais de mégacôlon (1 cas sur 155) (McCallion *et al.*, 2003)] est innervé dans son ensemble, les animaux doubles mutants *Ret*^{+/-};*Ednrb*^{s/s} développent le mégacôlon. Ce phénotype résulte de l'aganglionose du côlon (sur une longueur variable) étant plus sévère chez les mâles comparés aux femelles (Carrasquillo *et al.*, 2002; McCallion *et al.*, 2003). De plus, une interaction similaire a également été observée chez les souris des lignées *Ret*⁵¹ [une isoforme hypomorphe du gène *Ret* (de Graaff *et al.*, 2001)] et *End-3*^{ls} [Lethal spotting, une mutation ponctuelle qui empêche la conversion du précurseur inactif de l'EDN-3 en molécule active par l'ECE-1 (Baynash *et al.*, 1994)], et elle se reflète par le fait que l'étendue de l'aganglionose – s'étendant de la partie inférieure de l'estomac jusqu'à l'anus – est plus grande chez les animaux doubles mutants *Ret*⁵¹;*End-3*^{ls/ls}

comparés aux simples mutants *Ret*^{51/51} et *Edn-3*^{ls/ls} (Barlow, A. *et al.*, 2003). Par ailleurs, des effets combinés entre les ligands EDN-3 et GDNF sur les progéniteurs entériques ont été observés *in vitro*. Alors que les deux molécules agissent en synergie pour amplifier la prolifération des CCNe (Barlow, A. *et al.*, 2003), l'EDN-3 inhibe la différenciation neuronale induite par GDNF (Hearn *et al.*, 1998). Ensemble, ces observations illustrent à quel point la coordination/régulation fine de l'expression des gènes codant pour les membres des voies GDNF/RET et EDN-3/EDNRB est essentielle pour le développement normal du SNE.

1.3.2.4.2 *GDNF/RET, EDN-3/EDNRB, PHOX2B et SOX10*

Basé sur le haut niveau de chevauchement de leurs rôles respectifs (évoqués ci-dessus) quant au développement des progéniteurs entériques, il n'est donc pas étonnant que la colonisation normale du tube digestif par les CCNe implique également des interactions entre les gènes *Sox10* ou *Phox2b* et ceux codant pour les membres des voies de signalisation GDNF/RET et EDN-3/EDNRB. Conformément à cette idée, les souris doubles mutantes *Sox10*^{Dom/+};*End-3*^{ls/ls}, *Sox10*^{Dom/+};*Ednrb*^{sls} (Stanchina *et al.*, 2006) et *Sox10*^{Dom/+};*Ednrb*^{sl/sl} [Piebald lethal, une délétion complète du gène *Ednrb* (Roix *et al.*, 2001)] (Cantrell *et al.*, 2004) présentent toutes une aganglionose du côlon plus sévère que celle observée chez les animaux simples mutants *Sox10*^{Dom/+}, *End-3*^{ls/ls}, *Ednrb*^{sls} et *Ednrb*^{sl/sl}. Au plan mécanistique, ces interactions s'expliqueraient, au moins partiellement, par le fait que SOX10 régule directement l'expression spatiotemporelle du gène *Ednrb* (Zhu *et al.*, 2004). Par ailleurs il convient de noter qu'à la différence de ce qui précède, à ce jour aucune étude ne rapporte l'existence *in vivo* d'interactions entre SOX10 et la voie GDNF/RET et ce malgré le fait que des analyses moléculaire et génétique démontrent que SOX10 – via la formation d'un complexe avec PAX3 (un autre facteur clé pour le développement des CCN) – régule directement l'expression du gène *Ret* (Lang *et al.*, 2000). De manière similaire, PHOX2B a également été montré

pour activer l'expression du gène *Ret* (Leon *et al.*, 2009). Il est par contre important de noter qu'aucune interaction entre ces deux gènes n'a été observée chez les souris doubles mutantes *Ret*^{+/-};*Phox2b*^{+/-} malgré l'implication d'une interaction similaire dans la pathogénèse du syndrome d'hypoventilation alvéolaire centrale congénitale (une des formes syndromiques de HSCR) chez certains patients (de Pontual *et al.*, 2006).

1.3.2.4.3 *SOX10*, *ZFH1B* et *PHOX2B*

Des interactions entre SOX10 et les facteurs de transcription PHOX2B et ZFH1B ont également été mises en évidence chez la souris. En effet, l'aganglionose du côlon est plus sévère chez les souris doubles hétérozygotes *Sox*^{LacZ/+};*Zfhx1b*^{Δ/+} comparées aux simples mutants *Sox*^{LacZ/+} ou *Zfhx1b*^{Δ/+} (Stanchina *et al.*, 2010). De plus durant la différenciation des CCNe, SOX10 et PHOX2B s'inhibent mutuellement assurant ainsi le maintien de l'équilibre du ratio neurones vs cellules gliales dans le SNE. Alors que l'expression de SOX10 est maintenue dans les précurseurs gliaux, elle est éteinte dans les précurseurs neuronaux lesquels en revanche maintiennent l'expression de PHOX2B (Sasselli *et al.*, 2012). Ceci a aussi été démontré expérimentalement chez les souris porteuses d'une mutation dans le gène *Phox2b* qui empêche la répression du gène *Sox10* par PHOX2B biaisant ainsi la différenciation des progéniteurs vers la lignée gliale (Nagashimada *et al.*, 2012).

1.3.3 Contribution des facteurs environnementaux dans HSCR

HSCR est donc une maladie multigénique où l'effet individuel des gènes et/ou des interactions gène-gène impliqués sont à la fois mineurs et influencés par le sexe (i.e. pénétrance incomplète et le biais mâle) ; suggérant l'implication des facteurs non-

génétiques (environnementaux) dans bien des cas (Heuckeroth et Schafer, 2016). Chez l'homme, les études sur les effets des facteurs environnementaux dans la pathogénèse de HSCR sont peu nombreuses, moins robustes (i.e. petite taille des échantillons) et contradictoires. En effet, Torfs C.P. *et al.*, ont observé que la consommation de plus de trois tasses de café par jour ou la fièvre durant les périodes précoces de la grossesse augmente l'incidence de HSCR (Torfs et Christianson, 1999). Par opposition, dix ans plus tôt à l'issue d'une étude similaire, Larson L.T. *et al.*, n'ont trouvé aucune corrélation entre la fièvre et HSCR (Larsson *et al.*, 1989). Donc à ce jour chez l'homme, à l'inverse de la contribution des facteurs génétiques, il y a un manque de consensus quant au poids exact de contributions non-génétiques dans le développement de HSCR. Cependant, les résultats des études récentes menées chez les modèles animaux renforcent l'idée selon laquelle les facteurs environnementaux tels que les vitamines et les médicaments (e.g. l'ibuprofène et le mofétilmycophénolate) peuvent impacter le risque de développer HSCR ou sa sévérité en modulant directement et/ou indirectement le niveau d'expression ou l'activité des molécules qui régulent la formation du SNE avant la naissance (pour revue voir (Heuckeroth et Schafer, 2016)). Ci-dessous sera donné l'exemple de la vitamine A chez la souris.

1.3.3.1 L'exemple de la vitamine A

L'acide rétinoïque (AR) est une molécule de signalisation synthétisée dans les tissus à partir de la vitamine A (rétinol), préalablement stockée (après absorption) dans des organes tels que le foie, les poumons et les reins. De ces sites, le rétinol est libéré dans le plasma où il circule lié à la RBP4 (retinol binding protein 4) vers les cellules cibles. Il pénètre dans ces dernières grâce à l'interaction de RBP4 avec son récepteur membranaire STRA6 (stimulated by retinoic acid 6) (Fig.1.14). Chez les embryons, une fois dans le cytoplasme, le rétinol se lie au RBP cellulaire 1 (CRBP1), et est par la suite

transformé en AR via deux processus enzymatiques successifs (dont le rétinol est le métabolite intermédiaire) impliquant respectivement le rétinol déshydrogénase 10 (RDH10) et les Rétinaldéhyde déshydrogénases (RALDHs) 1, 2 et 3. L'AR nouvellement synthétisé est lié par les *cellular RA-binding proteins* (CRABP) 1 et 2, et peut soit être excrété pour agir sur les cellules avoisinantes (signalisation paracrine) soit agir sur la cellule-même qui l'a synthétisé (signalisation autocrine). Dans ce dernier cas, par l'intermédiaire de CRABP2, l'AR pénètre dans le noyau où il lie et régule les facteurs de transcription RAR (RA receptor) et RXR (retinoid X receptor) connus pour contrôler plusieurs aspects du développement (pour revue voir (Maden, 2007)).

L'importance de la vitamine A dans le contexte du développement du SNE est illustrée par les anomalies de celui-ci résultant de l'absence des enzymes impliquées dans la biosynthèse de l'AR chez la souris. En effet, les embryons de souris déficientes en RBP4 (*Rbp4^{-/-}*) montrent l'aganglionose du côlon ; un phénotype dont l'incidence et la sévérité augmente avec la présence d'une mutation hétérozygote du gène *Ret* chez les souris *Rbp4^{-/-};Ret^{+/-}* (Fu *et al.*, 2010). Notez que les souris *Ret^{+/-}* ne montrent aucun défaut de colonisation. L'invalidation ciblée du gène *Raldh2* a également été montrée pour engendrer l'aganglionose intestinale à cause d'une insuffisance de CCN vagues (Niederreither *et al.*, 2003). Les mécanismes de ces altérations induites par la déficience dans les voies de biosynthèse de l'AR ne sont pas complètement compris pour autant que l'AR affecte l'abondance de nombreuses protéines aux différents stades du développement embryonnaire (Heuckeroth et Schafer, 2016). Cependant, la signalisation de l'AR a été montrée pour jouer un rôle essentiel dans l'activation de l'expression de *Ret* dans les CCN vagues pré-entériques ainsi que leur prolifération (Simkin *et al.*, 2013). De plus aux stades tardifs de la formation du SNE, l'AR supporte l'expansion des précurseurs des neurones et favorise la différenciation neuronale. Dans l'ensemble, ces observations suggèrent que la carence en vitamine A chez la mère peut accroître le risque de développer HSCR.

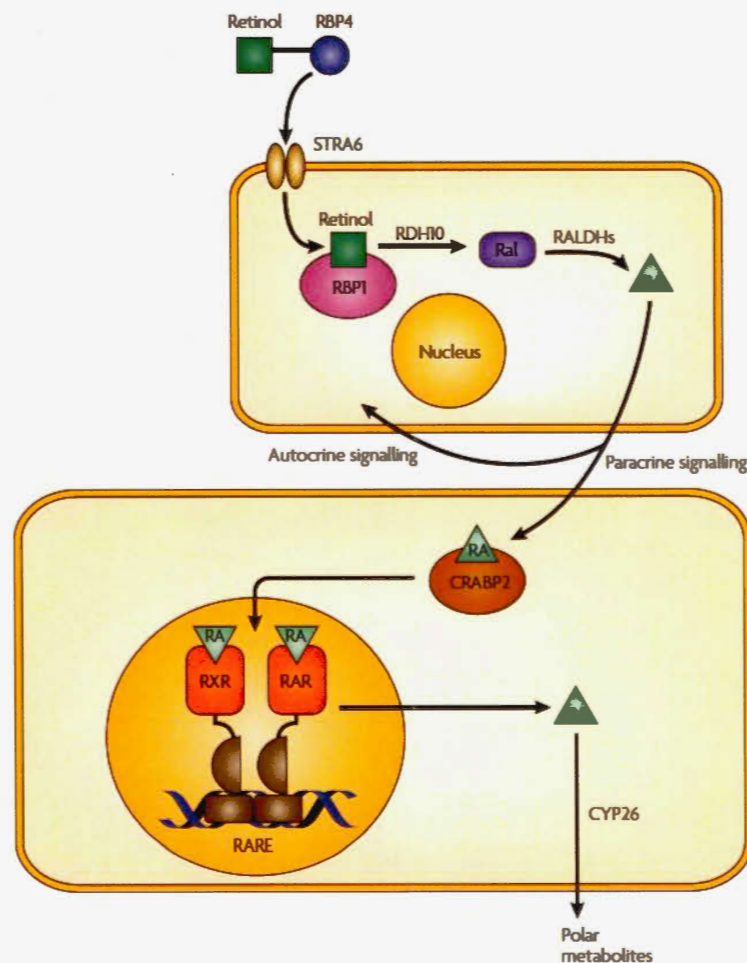


Figure 1.15 Représentation schématiques illustrant les voies de la biosynthèse, l'action et le catabolisme de l'acide rétinoïque (AR).

Le rétinol (vitamine A) lié à la RBP4 (retinol binding protein 4) pénètre dans les cellules en interagissant avec le récepteur membranaire STRA6 (stimulated by retinoic acid 6). Chez les embryons, la rétinol déshydrogénase 10 (RDH10) transforme le rétinol en rétinal qui à son tour est modifié en AR par les Rétinaldéhyde déshydrogénases (RALDHs). L'AR peut soit être excrété pour agir sur les cellules avoisinantes (signalisation paracrine) soit agir sur la cellule même qui l'a synthétisé (signalisation autocrine). La cellular RA-binding proteins 2 (CRABP 2) médie la présentation de l'AR aux facteurs de transcription RARs (retinoic acid receptors) et RXR (retinoid receptors) ; lesquels forment un hétérodimère et se lient à RARE (retinoic acid-response element, une séquence d'ADN) activant la transcription des gènes cibles. Le catabolisme de l'AR dans le cytoplasme implique la classe CYP26 (cytochrome P450 family 26) des cytochromes P450 (Figure extraite de (Maden, 2007)).

1.4 Le microbiote intestinal

1.4.1 Définition et fonction du microbiote intestinal

Le microbiote désigne l'ensemble des microorganismes tels que les bactéries, les champignons, les virus et les parasites vivant dans un environnement donné. Dans l'organisme humain, ces environnements incluent la cavité vaginale, la cavité buccale et le TGI. L'existence du microbiote intestinal et sa symbiose avec l'homme sont connues depuis plusieurs décennies. Toutefois jusqu'à récemment, notre connaissance des détails de cette interaction était très limitée car juste une petite portion des espèces microbiennes (e.g. bactériennes) du microbiote est cultivable *in vitro*. L'utilisation des techniques de séquençages à haut débit de la totalité de l'ADN du microbiote (microbiome) extrait directement de la matière fécale (par opposition à l'ADN des microorganismes cultivés) a fait progresser nos connaissances de la structure, la composition ainsi que le potentiel fonctionnel du microbiote. Ainsi à l'heure actuelle, il est établi que de tous les microbiotes celui de l'intestin (que nous dénommerons désormais le microbiote) est le plus important avec de 10^{13} à 10^{14} microorganismes ; soit 10 fois plus que le nombre de cellules qui constituent le corps humain. De plus, il est généralement admis, qu'il est composé de plus de 1 000 différentes espèces de microbes avec 150 fois plus de gènes que le génome de l'hôte (pour les revues voir (Aziz *et al.*, 2013; Cryan et O'Mahony, 2011; Guinane et Cotter, 2013)). Noter que plus de 99% de ces gènes proviennent des bactéries (Qin, Li, *et al.*, 2010), indiquant leur prédominance et importance au sein du microbiote.

De par l'expression de cette quantité extraordinaire de gènes, le microbiote assure son propre métabolisme (en puisant dans les substances ingérées par l'hôte) ainsi que le maintien de l'équilibre quantitatif et qualitatif entre les microorganismes qui le constituent. En retour, il exerce une influence positive (dans les conditions normales) sur plusieurs aspects fonctionnels et anatomiques du TGI. En effet, le microbiote joue un rôle direct dans la digestion : (i) il élargie le répertoire des nutriments assimilés en

assurant la fermentation des substrats alimentaires non digérés grâce à un arsenal d'enzymes dont la plupart sont manquantes chez l'hôte ; (ii) il participe à la synthèse de certaines vitamines et régule plusieurs voies métaboliques. Le microbiote influence également la prolifération et la différenciation des cellules épithéliales de l'intestin ainsi que le développement et l'homéostasie des cellules gliales associées la muqueuse intestinale ; démontrant son effet sur les fonctions de l'épithélium intestinal. Outre ces fonctions, le microbiote participe au développement/maturation ainsi qu'au fonctionnement du système immunitaire intestinal. De plus, il influence également la motricité intestinale, le niveau d'expression des neuromédiateurs et la maturation postnatale du SNE (nous développerons ces derniers contextes plus bas) (pour revues voir (Di Mauro *et al.*, 2013; Hooper *et al.*, 2012; Kabouridis *et al.*, 2015; Maranduba *et al.*, 2015)).

1.4.2 Établissement du microbiote : Effet sur le développement postnatal du SNE

Il est couramment admis que la colonisation du TGI par le microbiote commence à partir de la naissance selon un ordre précis. D'abord, s'implantent les bactéries aérobies (e.g. entérocoques, staphylocoques, etc.) lesquels, de par la consommation de l'oxygène contenu dans le TGI, promeuvent l'émergence des bactéries anaérobies (e.g. clostridium, bifidobacterium, etc.). Au cours des 3 premières années de la vie, sous l'effet de la génétique, l'alimentation, les conditions d'hygiène et les traitements médicaux, cette communauté initiale subit une évolution quantitative et qualitative avant d'être relativement stable. Toutefois, cette stabilité relative peut être perturbée de manière plus ou moins durable par des facteurs tels que la diète et l'antibiothérapie.

D'un autre côté, la formation du SNE ne se limite pas aux stades embryonnaires évoqués dans la section (1.2). Elle perdure plusieurs semaines après la naissance (Foong, 2016) par un processus de maturation marquée principalement par la génération et l'incorporation des nouveaux neurones, de nouvelles cellules gliales (Pham *et al.*, 1991), et le développement du réseau des cellules gliales associées à la muqueuse intestinale (Kabouridis *et al.*, 2015). Ainsi, par analogie avec les stades de la vie intra-utérine, il est raisonnable de s'attendre à ce que cette phase de maturation postnatale du SNE soit aussi sensible à l'effet des facteurs environnementaux. Basé sur les résultats de nombreuses études, le microbiote se positionne comme étant le facteur pouvant le plus puissamment influencer cette maturation. Pour exemple, des altérations du plexus myentérique – se traduisant essentiellement par l'hypoganglionose associée à une disproportion des neurones nitrergiques et/ou des troubles de la motricité intestinale – ont été récemment rapportées respectivement chez les souris immatures axéniques et les souris traitées avec des antibiotiques (Caputi *et al.*, 2017; Collins *et al.*, 2014). Par ailleurs, il est très intéressant de constater que ces défauts du plexus myentérique sont très similaires à ceux observés dans la zone de transition (i.e. les régions du colon situées en amont du segment aganglionnaire) de certains patients (Cheng, L. S. *et al.*, 2016; Coyle *et al.*, 2016) et des modèles murins pour HSCR (Musser *et al.*, 2015; Roberts *et al.*, 2008; Zaitoun *et al.*, 2013). Ceci suggère que les altérations du microbiote (dysbiose) induites par des facteurs tels que la diète, les médicaments et les antibiotiques peuvent influencer la pathogénèse de HSCR. Conformément à cette hypothèse, l'antibiothérapie et la diète liquide ont été montrées pour retarder de quelque jour l'âge des décès causés par l'entérocolite associée au mégacôlon chez le modèle *Endrb^{-/-}* (Cheng, Z. *et al.*, 2010). Les mécanismes par lesquels le microbiote influence la maturation postnatale du SNE ne sont pas complètement compris. Toutefois des études suggèrent que ceci impliquerait, au moins en partie, l'activation des TLRs (Toll-like receptors) – présents sur les membranes des neurones/cellules gliales entériques – par des molécules dérivées des bactéries (Anitha *et al.*, 2012; Barajon *et al.*, 2009; Brun *et al.*, 2013; Grasa *et al.*, 2015).

1.5 Hypothèses et Objectifs

La lignée *TashT* est un modèle murin pour HSCR généré par mutation insertionnelle aléatoire de transgènes dans le génome. L'insertion transgénique a perturbé la séquence d'un élément répresseur de la transcription du gène *Fam162b* situé sur le chromosome 10. Les animaux hétérozygotes pour l'insertion transgénique (*TashT^{Tg/+}*) sont viables, fertiles et ne montrent aucune forme d'aganglionose colique. Cependant, 13.3% des souris homozygotes (*TashT^{Tg/Tg}*) développent le mégacôlon aganglionnaire avec un fort biais sexuel de 14.7 mâles pour 1 femelle (15 : 1). Ce phénotype de mégacôlon résulte d'un retard de migration des CCNe des *TashT^{Tg/Tg}* (durant la formation du SNE) principalement causé par leur sensibilité réduite aux signaux des voies GDNF/RET et EDN-3/EDNRB. De plus, il est corrélé à l'étendue de colonisation du côlon par le SNE. Cependant, pour qu'une souris ait plus de chance de développer le mégacôlon, il faut que l'étendue de cette colonisation soit en dessous du seuil minimal de $\sim 80\%$ (Bergeron *et al.*, 2015). À la différence du phénotype de mégacôlon aganglionnaire, la pénétrance des altérations du SNE (i.e. aganglionose et/ou hypoganglionose) dans le côlon des souris *TashT^{Tg/Tg}* est complète.

1.5.1 Hypothèses

1. La motricité du côlon est réduite chez les souris *TashT^{Tg/Tg}* qui ne développent pas le mégacôlon.
2. La pénétrance du mégacôlon et la sévérité des altérations du SNE chez les souris *TashT^{Tg/Tg}* peuvent augmenter sous l'effet des facteurs environnementaux nuisibles au SNE (e.g. les antibiotiques)
3. Le locus *TashT* peut interagir avec d'autres loci associés au mégacôlon.

1.5.2 Objectif global

Caractériser les souris $TashT^{Tg/Tg}$ afin de contribuer au progrès de nos connaissances sur les mécanismes cellulaires et moléculaires qui se cachent sous la pathogénèse du mégacôlon aganglionnaire.

1.5.3 Objectifs spécifiques

1. Caractériser au niveau cellulaire le défaut du SNE chez les souris $TashT^{Tg/Tg}$ qui ne développent pas le mégacôlon.
2. Évaluer l'effet de la dysbiose induite par l'antibiothérapie sur ce défaut.
3. Analyser les interactions génétiques entre le locus $TashT$ et deux autres loci importants au développement du SNE chez la souris, *Spot* et *Holstein*.

CHAPITRE II

MALE-SPECIFIC COLON MOTILITY DYSFUNCTION IN THE *TASHT* MOUSE LINE

Le travail de ce chapitre a été publié, en octobre 2016, dans la revue Neurogastroenterology & Motility : Neurogastroenterol Motil. 2016 Oct;28(10):1494-507. doi : 10.1111/nmo.12847. Epub 2016 Jun 8.

Contribution des auteurs : Aboubacrine Mahamane TOURÉ (Design des expériences, dissections des animaux, marquage des tissus pour les analyses immuno-histochimiques et histologiques, analyses statistiques, interprétation des résultats, recherche bibliographique et rédaction du manuscrit). Baptiste CHARRIER (Compte des cellules marquées par immuno-histochimie). Nicolas PILON (Supervision des expérimentations et rédaction du manuscrit)

NOTE : Les références de l'article sont incluses dans la bibliographie générale.

2.1 Résumé

Contexte : Dans la maladie de Hirschsprung (HSCR), le manque de ganglions neuraux myentériques dans le côlon distal empêche les mouvements péristaltiques causant ainsi une obstruction fonctionnelle de l'intestin. Bien que la résection chirurgicale du segment aganglionné permette aux enfants atteints de HSCR de survivre à cette affection, certains patients continuent de souffrir de troubles de la motricité malgré la présence de ganglions myentériques dans leur côlon distal postopératoire. Un tel phénomène est également observé chez les patients souffrant d'autres neuropathies et, dans les deux cas, il est permis de croire que la dysmotilité colique résulte des anomalies des ganglions myentériques et/ou des cellules interstitielles de Cajal (ICC). Pour vérifier cela, nous avons utilisé un modèle murin récent pour HSCR appelé *TashT*.

Méthodes : Les paramètres de la motricité intestinale ont été évalués et corrélés avec l'étendue de l'aganglionose ainsi qu'avec la densité neuronale dans les régions innervées. La composition neuronale du plexus myentérique ainsi que le statut des réseaux des ICC ont également été évalués par immunofluorescence.

Résultats clés : Les souris *TashT^{Tg/Tg}* présentent un fort biais mâle quant à la sévérité de l'aganglionose et l'hypoganglionose dans le côlon. Ces défauts sont associés à une baisse de la motricité colique spécifiquement chez les mâles. Les souris mâles *TashT^{Tg/Tg}* montrent également une augmentation spécifique des neurones nNos⁺ limitée aux régions innervées les plus distales. En revanche, les neurones myentériques Calretinin⁺, les cellules gliales myentériques Sox10⁺ ainsi que les ICC cKit⁺ ne sont pas affectés chez les souris *TashT^{Tg/Tg}*.

Conclusions et impacts : La dysmotilité colique spécifique aux souris mâles *TashT^{Tg/Tg}* est associée à la fois à une hypoganglionose sévère et à une disproportion des neurones myentériques. La prise en compte de ces paramètres en clinique pourrait être importante pour la prise en charge des patients de HSCR postopératoires.

Mots-clés : Constipation chronique, système nerveux entérique, maladie de Hirschsprung, plexus myentérique

Manuscript

Male-specific colon motility dysfunction in the *TashT* mouse line

Aboubacrine Mahamane Touré, Baptiste Charrier and Nicolas Pilon

Molecular Genetics of Development Laboratory, Department of Biological Sciences and BioMed Research Center, Faculty of Sciences, University of Quebec at Montreal (UQAM), Montreal, Canada.

Correspondence to: Nicolas Pilon, Department of Biological Sciences and BioMed Research Center, Faculty of Sciences, University of Quebec at Montreal (UQAM), 141 President-Kennedy Ave, Montreal, PQ, Canada, H2X 3Y7; Tel.: 514-987-3000 x3342; Fax: 514-987-4647; Email: pilon.nicolas@uqam.ca

KEY MESSAGES

- In the *TashT* mouse model of Hirschsprung disease, an important subset of homozygous animals do not develop aganglionic megacolon despite having distal colon aganglionosis and/or hypoganglionosis.
- Both distal colon aganglionosis and hypoganglionosis are more severe in *TashT^{Tg/Tg}* males.
- *TashT^{Tg/Tg}* males, but not females, display altered distal colonic motility independently of aganglionosis.
- An increase of nitrergic neurons that is restricted to the most distal ganglionated regions is also observed in *TashT^{Tg/Tg}* males but not in females.

2.2 Abstract

Background: In Hirschsprung disease (HSCR), the absence of myenteric neural ganglia in the distal bowel prevents motility and thereby causes functional intestinal obstruction. Although surgical resection of the aganglionic segment allows HSCR children to survive this condition, a number of patients still suffer from impaired motility despite having myenteric ganglia in their postoperative distal bowel. Such phenomenon is also observed in patients suffering from other enteric neuropathies and, in both cases, colonic dysmotility is believed to result from abnormalities of myenteric ganglia and/or associated interstitial cells of Cajal (ICC). To better understand this, we used a recently described HSCR mouse model called *TashT*. *Methods:* Intestinal motility parameters were assessed and correlated with extent of aganglionosis as well as with neuronal density in ganglionated regions. The neural composition of the myenteric plexus as well as the status of ICC networks was also evaluated using immunofluorescence. *Key Results:* *TashT^{Tg/Tg}* mice display a strong male bias in the severity of both colonic aganglionosis and hypoganglionosis, which are associated with male-specific reduced colonic motility. *TashT^{Tg/Tg}* male mice also exhibit a specific increase of nNos⁺ neurons that is restricted to the most distal ganglionated regions. In contrast, Calretinin⁺ myenteric neurons, Sox10⁺ myenteric glial cells as well as cKit⁺ ICC are not affected in *TashT^{Tg/Tg}* mice. *Conclusions and Inferences:* Male-specific impairment of colonic motility in *TashT^{Tg/Tg}* mice is associated with both severe hypoganglionosis and myenteric neuronal imbalance. Considering these parameters in the clinic might be important for the management of post-operative HSCR patients.

Keywords: Chronic constipation, Enteric Nervous System, Hirschsprung disease, Myenteric plexus.

2.3 Introduction

The neural crest-derived enteric nervous system (ENS) is the intrinsic neural network of the entire gastro-intestinal (GI) tract (Goldstein *et al.*, 2013; Lake et Heuckeroth, 2013). Buried within the gut wall, the ENS is mainly organized into two major interconnected plexuses: the myenteric (Auerbach's) plexus and the submucosal (Meissner's) plexus. Each plexus consists of interconnected ganglia containing neurons and associated glia. While the myenteric plexus notably controls intestinal motility in collaboration with the interstitial cells of Cajal (ICC) – the pacemaker cells of the bowel, the submucosal plexus regulates several mucosal functions (Furness, 2012). To perform these tasks, each plexus must contain appropriate density of ganglia as well as adequate proportions of neuron subtypes and glial cells within each ganglion (Musser et Michelle Southard-Smith, 2013).

Failure of neural crest-derived ENS progenitors to properly reach the distal bowel during prenatal development may cause Hirschsprung disease (HSCR), which affects one in 5000 live births with a 4:1 male to female ratio (Amiel *et al.*, 2008; Bergeron *et al.*, 2013; Obermayr *et al.*, 2013). HSCR is a life-threatening condition characterized by functional obstruction in the distal bowel due to the lack of enteric neural ganglia (aganglionosis). Current treatment consists of surgical resection of the aganglionic segment and anastomosis of upstream ganglionated segment with the anus. However, an important subset of postoperative HSCR patients continue to suffer from long-term altered colonic motility such as fecal incontinence and chronic constipation (Rintala et Pakarinen, 2012). Moreover, impaired motility without absence of enteric ganglia is also observed in patients suffering from other enteric neuropathies such as intestinal neuronal dysplasia, intestinal ganglioneuromatosis and isolated hypoganglionosis, to name a few (Friedmacher et Puri, 2013). In all these cases, impaired motility is believed to be due to structural/functional defects of ENS and/or ICC networks (Bettolli *et al.*,

2008; Burns *et al.*, 2009; Struijs *et al.*, 2008). However, there is lack of consensus in this regard that clearly calls for further studies.

Animals from HSCR mouse lines with mild phenotypic presentation (e.g. hypoganglionosis and/or ultra-short segment aganglionosis) that do not trigger functional intestinal obstruction have proven especially useful for evaluating the contribution of relatively modest ENS defects to deficits in bowel motility (Gianino *et al.*, 2003; Musser *et al.*, 2015; Ro *et al.*, 2006; Roberts *et al.*, 2008; Shen *et al.*, 2002). Although sex differences in the penetrance and/or severity of the above phenotypes have been suspected, information regarding the relationship between a given ENS defect (structural abnormalities or neural imbalance) and GI dysmotility in a sex-specific manner is very scarce (Musser *et al.*, 2015).

We recently reported the generation of an insertional mutant mouse line called *TashT* in which around 13% of homozygotes (*TashT*^{Tg/Tg}) succumb to aganglionic megacolon around weaning age, with a striking 15:1 male to female ratio (Bergeron *et al.*, 2015). Located in a chromosome 10 gene desert, the *TashT* mutation perturbs the activity of silencer elements that are normally involved in the direct repression of the uncharacterized gene *Fam162b* – and potentially other genes – in neural crest-derived ENS progenitors. By a currently unknown mechanism, the *TashT* mutation notably results in the deregulation of key signaling pathways for ENS development (Gdnf/Ret and Edn3/Ednrb) and, consequently, to slower migration of neural crest-derived ENS progenitors in embryonic intestines. What exactly explains the sex bias in megacolon expressivity at the molecular level is also currently unknown. However, at the histological level, we found that it can be explained by the fact that the colon of males is ganglionated, on average, around a threshold level of minimal colonic innervation for FVB/N animals (~80% of total colon length) while the colon of females is ganglionated, on average, just beyond this point.

In this study, we now report that adult *TashT^{Tg/Tg}* mice that do not develop aganglionic megacolon suffer from chronic constipation in a male-specific manner. Extensive characterization of GI motility and myenteric plexus structure/composition suggests that this is due to aganglionosis and/or hypoganglionosis combined with male-specific neuronal subtypes imbalance in the ganglionated distal colon.

2.4 Materials and methods

2.4.1 Animals

All animal studies were conducted in accordance with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care (CCAC) and approved by the relevant institutional committee (*Comité institutionnel de protection des animaux*; CIPA reference #650) of University of Quebec at Montreal (UQAM). Both mutant (*TashT^{Tg/Tg}*) (Bergeron *et al.*, 2015) and wild-type animals are of the same genetic background (FVB/N). All studies were performed using virgin mice between 2-3 months of age, with the exception that body weight was also determined for postnatal day (P) 21 and 28 mice. Body weight was assessed in the morning using a high *precision digital scale* (Kilotech KHA5001).

For tissue preparation, mice were euthanized following isoflurane anesthesia and relevant bowel segments (duodenum and colon) were immediately dissected out, cut longitudinally along the mesentery, and pinned serosal side down on agar-coated dishes in phosphate buffer saline (PBS). The tissues were fixed overnight at 4°C in a solution containing 4% phosphate-buffered paraformaldehyde (PFA). After removal of the mucosa/submucosa layers, muscle strips were then dehydrated in methanol and store at -20°C until labelling. The position of all bowel subregions used in this study is depicted in Supplemental Figure 2.1.

2.4.2 Staining of acetylcholinesterase activity

The whole colon (from cecum to anus) was collected as above and stained for acetylcholinesterase (AChE) activity essentially as previously described (Enomoto *et al.*, 1998). The length of the myenteric plexus was measured with a millimeter ruler and then converted into percentage of the entire length of the colon. Images were acquired using a DFC-495 camera mounted on a M205FA stereomicroscope (Leica microsystems). To evaluate myenteric plexus density, images were captured at 50X magnification from the proximal, mid, and distal mid colon (MC) as well as from the proximal and mid distal colon (DC) (one representative image per region). For each of these subregions, tissue width was also determined using a millimeter ruler. For each image, the area occupied by the myenteric plexus was measured in a representative field of view corresponding to a square of fixed dimension (5.4mm²) using the Image (Adjust - Threshold Color) and Analyze (Measure) functions of Image J. Myenteric plexus density was expressed in percentage of the total area of the field of view. Results for whole MC and DC regions were obtained by averaging the data of the respective subregions.

2.4.3 Immunofluorescence

Dehydrated muscle strips from the duodenum, proximal MC, proximal DC and mid DC were rehydrated and incubated 2 hours at room temperature in blocking solution (10% fetal bovine serum, 0.1% Triton-X100 in PBS). Tissues were incubated with primary antibodies overnight at 4°C and with relevant secondary antibodies for 2 hours at room temperature. Each antibody was diluted in blocking solution (dilution factor and other antibody details can be found in Supplemental Table 2.1). Muscles strips

from the duodenum, proximal MC and mid DC were used for HuC/D / nNos and HuC/D / Calretinin co-labellings. Those from proximal and mid DC as well from distal DC were used for HuC/D / Sox10 and β III-Tubulin / c-Kit co-labellings, respectively. For each bowel segment, 4 μ m-thick stacks of 5 fields of view corresponding to a square of fixed dimension (0.3721mm²) were randomly captured with the 20X objective of a Nikon A1 confocal unit (run with the NIS-Element AR4 software) using standard excitation and emission filters for visualizing DAPI, Alexa Fluor 594 and 647. Neuronal subtypes and glial cell proportions in the myenteric plexus were determined using the Image J cell counter manual function. For each subregion, the sum of Calretinin⁺, nNos⁺ and Sox10⁺ cells from the 5 fields of view were normalized to the total number of HuC/D⁺ neurons. The total number of HuC/D⁺ neurons were also used for quantification of neuronal density and expressed in neurons per mm².

2.4.4 GI motility assays

Total and proximal (i.e. stomach and small intestine combined) GI transits were assessed using previously described procedures (Hatzipetros *et al.*, 2014; Kimball *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2011). Briefly, mice were administered a solution of 6% carmine red dye (Sigma-Aldrich C1022) dissolved in 0.5% methylcellulose (Sigma-Aldrich 274429) via oral gavage (10 μ l per gram of weight). For the total GI transit, mice were then returned to individual cages without food, and cages were inspected every 10 min for the presence of red pellets. For each mouse, the total GI transit was expressed as the time (in hour: minutes) required from gavage to expulsion of the first red pellet. For the proximal GI transit, mice were euthanized 15 min after gavage and their small intestine (from duodenum to ileum) was dissected out. The distance travelled by the carmine red dye was measured and expressed in percentage of the length of the entire

small intestine. Distal colonic transit was studied via a bead expulsion assay essentially as previously described (Li *et al.*, 2011). Briefly, overnight-fasted mice were anesthetized with 2% isoflurane and a 3mm glass bead was introduced into their colon with a probe over a distance of 2cm from the anus (overlapping both the proximal and mid DC). The time required for expulsing the glass bead was taken as an estimate of distal colonic transit.

2.4.5 Statistical analysis

Data are presented as the mean ($\pm$ standard deviation were relevant) with the number (n) of experiments/animals included in figures and/or figure legends. The significance of differences was evaluated using the 2-tailed Student's *t*-test except for Pearson's correlation analyses for which the 1-tailed Student's *t*-test was used. Differences were considered significant for *p* values ≤ 0.05 .

2.5 Results

2.5.1 Male-specific impairment of colonic motility in adult *TashT^{Tg/Tg}* mice

We previously reported that almost all *TashT^{Tg/Tg}* animals of weaning age that do not develop megacolon display colonic aganglionosis, with males being more severely affected (Bergeron *et al.*, 2015). No evidence of colon dysmotility was noted for these animals, and they appeared to live as long as wild-type laboratory mice. Yet, GI motility and ENS structure/composition was not analyzed in mature *TashT^{Tg/Tg}* animals. To address this, we began by visually examining their GI tract for possible

accumulation of fecal content. These observations revealed a marked propensity to fecal impaction in the colon of adult *TashT^{Tg/Tg}* males when compared to age- and sex-matched wild-type controls (Figure 2A-B and Supplemental Figure 2.2). Similarly to the male-biased aganglionic megacolon phenotype displayed by this line, *TashT^{Tg/Tg}* females appeared much less affected. Furthermore, we also observed that adult *TashT^{Tg/Tg}* mice gained less weight than age- and sex-matched controls, an outcome again accentuated in males (Table 2.1).

To further analyze the intestinal motility in *TashT^{Tg/Tg}* mice, transit of carmine red dye and glass bead expulsion assays were used in order to record total and proximal (i.e. stomach and small intestine combined) GI transits as well as distal colonic transit, respectively. Interestingly, a statistically significant increase in the average total GI transit time was specifically observed for *TashT^{Tg/Tg}* males (Figure 2.2A). Analysis of proximal GI transit and distal colonic transit in isolation further allowed us to find that such reduced GI motility is not global. Indeed, while the proximal GI transit remained unaffected (Figure 2.2B), the average distal colonic transit time was found to be 9-fold greater in *TashT^{Tg/Tg}* males (Figure 2.2C). In marked contrast, *TashT^{Tg/Tg}* females were comparable to wild-type controls in all GI motility assays (Figure 2.2A-C). Taken together, these observations strongly suggest that adult *TashT^{Tg/Tg}* males, but not females, suffer from chronic constipation.

2.5.2 Adult *TashT^{Tg/Tg}* mice exhibit male-biased hypoganglionosis and/or short-segment aganglionosis in the colon

To understand the anatomic basis of the impaired colonic motility described above, we analyzed the gross architecture of the myenteric plexus of adult *TashT^{Tg/Tg}* mice via staining of AChE activity. In accordance with what we previously found with immature

TashT^{Tg/Tg} animals (Bergeron *et al.*, 2015) and as described for a number of other HSCR mouse models (Ro *et al.*, 2006; Roberts *et al.*, 2008; Soret *et al.*, 2015; Wallace *et al.*, 2011), this analysis revealed two different yet related ENS structural defects in the colon. For all mature *TashT^{Tg/Tg}* animals, a strong reduction in the density of the myenteric plexus was noted in the mid colon (MC) and the distal colon (DC), and this was found to be combined with distal aganglionosis in approximately half of the studied cases (Figure 2.3A-C). Such decreased density is not due to colon distention (Supplemental Figure 2.3) and was also observed in another sample series using anti-HuC/D immunofluorescence (Figure 2.3D and Supplemental Figure 2.4). As documented in our prior study (Bergeron *et al.*, 2015), the aganglionic segment only contains large extrinsic nerve fibers typically associated with such region. No obvious and/or consistent changes in myenteric plexus density was noted in the proximal colon (PC) and the duodenum (Figure 2.3A and Supplemental Figure 2.5). These observations thus indicate that, in comparison to the immature *TashT^{Tg/Tg}* population that includes megacolon-suffering animals (Bergeron *et al.*, 2015), the adult population appears enriched in animals having a fully ganglionated colon, although ENS density is significantly reduced in their MC and DC. We believe that the reason why no immature *TashT^{Tg/Tg}* male with a fully ganglionated colon was identified in our previous study is most likely due to the small number of non-megacolon-suffering animals in this group (6 males only) (Bergeron *et al.*, 2015). From now on, the subgroup of *TashT^{Tg/Tg}* mice without aganglionosis will be refer to as “hypoganglionic”, whereas the subgroup of *TashT^{Tg/Tg}* mice exhibiting both hypoganglionosis and distal aganglionosis will be refer to as “aganglionic”.

Sex-stratified analysis of the above phenotypes revealed that, in comparison to females, males are more often subjected to short segment distal aganglionosis. Accordingly, the average extent of aganglionosis was found to be significantly higher in males compared to females (Figure 2.3B). Moreover, although the myenteric plexus density for the adult *TashT^{Tg/Tg}* population as a whole appears significantly reduced in comparison to age-

matched controls, this decrease is more accentuated in males by a factor of approximately 2-fold (with AChE histochemistry data, 51.6% *versus* 25.8% decrease in the MC and 55.2% *versus* 31.0% decrease in the DC; with HuC/D immunofluorescence data, 41.8% *versus* 18.2% decrease in the MC and 54.5% *versus* 33.1% decrease in the DC) (Figure 2.3C-D). Direct comparison of myenteric plexus density between *TashT^{Tg/Tg}* males and females further revealed statistically significant differences using AChE histochemistry data but not using HuC/D immunofluorescence data (Supplemental Figure 2.6). Therefore, again in line with the male-biased aganglionic megacolon phenotype previously described for immature *TashT^{Tg/Tg}* mice (Bergeron *et al.*, 2015), there is a strong male bias in the expressivity/severity of both hypoganglionosis and short segment aganglionosis in the colon of adult *TashT^{Tg/Tg}* mice.

2.5.3 Correlation between impaired colonic motility and aganglionosis/hypoganglionosis in adult *TashT^{Tg/Tg}* mice

Combining our analyses of myenteric plexus architecture and GI motility pointed towards the existence of a direct link between the identified male-biased myenteric plexus defects (hypoganglionosis and/or short segment aganglionosis) and the male-specific colonic dysmotility. Interestingly, given that almost every tested *TashT* animal was evaluated for all these parameters and that dysmotility was present in both the “hypoganglionic” and “aganglionic” subgroups of *TashT* animals (Figure 2.2C), this allowed us to assess the relative contribution of different structural defects (i.e. hypoganglionosis without aganglionosis *versus* extent of aganglionosis) to the decreased colon motility. In both cases, modest correlations were detected (Figure 2.4). The comparison of correlation coefficients revealed a slightly stronger relationship between distal colonic transit time and myenteric plexus density ($r = -0.53$) than

between distal colonic transit time and extent of aganglionosis ($r = 0.40$). Although statistical significance was not reached most likely because of the small sample size, these results suggest that both hypoganglionosis and aganglionosis taken separately might partially contribute to the impaired colonic motility observed in *TashT^{Tg/Tg}* males. However, the lack of correlation between distal colonic transit time and myenteric plexus density in *TashT^{Tg/Tg}* females (Figure 2.4A) combined to the fact that all *TashT^{Tg/Tg}* females (both “hypoganglionic” and “aganglionic”) exhibit normal motility (Figure 2.2C) strongly suggests that these ENS structural defects are not sufficient for explaining the male-specific colon dysmotility of *TashT^{Tg/Tg}* mice.

2.5.4 Male-specific regional alteration of the neurochemical coding of myenteric ganglia in the distal colon of adult *TashT^{Tg/Tg}* mice

As neuronal subtypes and/or glia:neuron ratio imbalance might also contribute to the observed male-specific colonic dysmotility, we subsequently examined the relative abundance of glial cells (Sox10⁺) as well as the proportion of the main populations of inhibitory (nNos⁺) and activating (Calretinin⁺) neurons in myenteric ganglia from the mid DC, using the duodenum as a control region (Figures 2.5-6). In accordance with the normal motility detected in the anterior GI tract (Figure 2.2B), the average proportion of Calretinin⁺ and nNos⁺ neurons was similar in the duodenum of wild-type and *TashT^{Tg/Tg}* mice for both sexes (Figures 2.5A', B' and 2.6A', B'). Similarly, no change was found in the average proportion of Calretinin⁺ neurons as well as in the glia: neuron ratio in myenteric ganglia from the mid DC of *TashT^{Tg/Tg}* animals (Figure 2.5 and Supplemental Figure 2.7). However, while the average proportion of nNos⁺ neurons was comparable between wild-type and *TashT^{Tg/Tg}* females either in this same region (Figure 2.6B-B') or in the distal most ganglionated region (Supplemental Figure 2.8), a 110% increase in the average proportion of nNos⁺ neurons was specifically

observed in the distal MC of *TashT^{Tg/Tg}* males (Figure 2.6A-A'). Of note, this 2-fold increase of nitrergic neurons was found to be regionally restricted as no change was observed in the proximal MC (Supplemental Figure 2.9). Although we do not exclude the possibility that other less abundant neuron subtypes might also be affected, we believe that such a regionally restricted increase in the main population of relaxing neurons could contribute to the male-specific distal colonic dysmotility.

2.5.5 Status of interstitial cells of Cajal networks in the colon of adult *TashT^{Tg/Tg}* mice

For both human patients and mouse models, altered numbers of interstitial cells of Cajal (ICC) – the GI pacemaker cells – are often observed in association with ENS defects (Huizinga *et al.*, 2001; Huizinga *et al.*, 2009; Sandgren *et al.*, 2002; Ward, S. M. *et al.*, 1999). To determine whether these c-Kit⁺ non-neural crest-derived cells might additionally contribute to the male-biased colonic dysmotility of adult *TashT^{Tg/Tg}* mice, their presence and gross distribution were examined at different depth levels within the wall of the hypoganglionic DC. This analysis revealed no overt change in the relative presence and distribution of ICC subpopulations within the longitudinal and circular smooth muscle layers as well as at the level of both the myenteric and deep muscularis plexuses (Supplemental Figure 2.10). Therefore, these results strongly suggest that the male-biased colonic dysmotility of *TashT^{Tg/Tg}* mice is strictly due to neuronal defects.

2.6 Discussion

We previously reported that a subset of *TashT^{Tg/Tg}* mice die from aganglionic megacolon around weaning age, in a strong male-biased manner (Bergeron *et al.*,

2015). Via a comprehensive sex-dependent analysis of multiple ENS characteristics and motility parameters, we now demonstrate that surviving adult *TashT^{Tg/Tg}* mice exhibit diminished colonic motility, again in a male-biased manner. Of note, we also found that such impaired motility can be dissociated from the distal colonic aganglionosis present in an important subset of adult *TashT^{Tg/Tg}* mice. In fact, other data suggest that the cause of the observed male-biased dysmotility could be multifactorial and include a role for male-specific neuronal subtypes imbalance. We believe that these findings could have clinical relevance for the management of postoperative HSCR patients as well as of patients diagnosed for other enteric neuropathies.

2.6.1 Role of myenteric plexus density in the male-biased colonic motility defect of *TashT^{Tg/Tg}* mice

One of the most interesting features of the aganglionosis phenotype of *TashT^{Tg/Tg}* mice is its incomplete penetrance (Figure 2.3A-B) (Bergeron *et al.*, 2015). In this work, we took advantage of this characteristic for specifically assessing the relative contribution of aganglionosis and hypoganglionosis to the male-biased colonic motility defect. Intriguingly, we first observed that not only “aganglionic” but also a high number of what we named “hypoganglionic” *TashT^{Tg/Tg}* animals were present in the group of males exhibiting colonic transit time higher than wild-type controls (Figure 2.2C). More intriguing was the fact that some of these “hypoganglionic” *TashT^{Tg/Tg}* males were even more severely affected than some “aganglionic” animals. Accordingly, our correlation analyses suggested that distal colonic transit time was more robustly linked to myenteric plexus density rather than to extent of short segment aganglionosis (Figure 2.4). Although the negative relationship between myenteric plexus density and motility described in our study did not reach statistical significance, this result is in agreement

with prior studies reporting altered motility in the hypoganglionic bowel segments of *Ednrb*, *Edn3*, *Gdnf*, *Hand2* and *Raldh* mutant mice (D'Autreaux *et al.*, 2011; Ro *et al.*, 2006; Roberts *et al.*, 2008; Shen *et al.*, 2002; Wright-Jin *et al.*, 2013). However, it is noteworthy that no such correlation was observed for *TashT^{Tg/Tg}* females. One simple explanation for this sex bias might be that the decrease in myenteric neuronal density of *TashT^{Tg/Tg}* females ranging between 18.2% and 39.4% (Figure 2.3C-D and Supplemental Figure 2.8B') is not sufficient for interfering with colonic motility, at least in the FVB/N mouse strain. Indeed, in *TashT^{Tg/Tg}* males, this decrease was calculated to be $\geq 41.8\%$ (Figure 2.3C-D). Taken together with the data obtained with the other models mentioned above in which neuronal loss was $\geq 45\%$ (D'Autreaux *et al.*, 2011; Ro *et al.*, 2006; Roberts *et al.*, 2008; Wright-Jin *et al.*, 2013), this strongly suggests that a $\sim 40\%$ decrease of myenteric neuronal density might represent a threshold level above which impairment of distal colon motility is more likely to occur.

2.6.2 Role of myenteric neuronal subtypes imbalance in the male-biased colonic motility defect of *TashT^{Tg/Tg}* mice

An alternative and not necessary mutually exclusive possibility for explaining the normal colonic motility of *TashT^{Tg/Tg}* females could be that hypoganglionosis alone is not sufficient for significantly impacting colonic transit. In strong support of this possibility, our analysis of nNos⁺ and Calretinin⁺ neuronal subtypes – the main markers of inhibitory and activating myenteric neurons (Qu *et al.*, 2008) – revealed a male-specific 2-fold increase of nitrergic neurons restricted to the most distal ganglionated region (Figure 2.6). Although the proportion of more discrete subtypes might also be affected, we think that doubling the amount of nNos⁺ neurons (from 30% to 63% of all myenteric neurons of the colon) is most likely sufficient by itself to significantly influence motility. Very interestingly, such a regionally restricted increase of nitrergic

neurons has also been previously reported in other HSCR mouse models (Musser *et al.*, 2015; Roberts *et al.*, 2008; Zaitoun *et al.*, 2013). In this regard, the similarities with mouse models having impaired Edn3/Ednrb signaling are especially striking. Indeed, in both *Ednrb*^{-/-} and *Edn3*^{-/-} mice, an identical ~2-fold increase of nNos⁺ neurons is specifically observed in the most distal ganglionated regions (Roberts *et al.*, 2008; Zaitoun *et al.*, 2013). In *Ednrb*^{-/-} mice, such increase was also demonstrated to be accompanied by an increase of Vip⁺ and a decrease of ChAT⁺ neurons (Zaitoun *et al.*, 2013). On the other hand, it is important to note that a similar robust increase of nitrergic neurons is not found in all HSCR mouse models. Indeed, only slightly increased and even unchanged number of nNos⁺ myenteric neurons have been reported in *Sox10*^{Dom/+} and *Gdnf*^{+/-} mice, respectively (Musser *et al.*, 2015; Roberts *et al.*, 2008). Therefore, taken together with the fact that Edn3/Ednrb signaling is known to be impaired in *TashT*^{Tg/Tg} enteric neural progenitors (Bergeron *et al.*, 2015), these observations suggest a negative role for this signaling pathway in the control of nitrergic neuron numbers that might oppose the apparent positive role of Gdnf/Ret signaling (Anderson *et al.*, 2006; Uesaka et Enomoto, 2010; Wang, H. *et al.*, 2010; Yan *et al.*, 2004). Moreover, the fact that the observed increase in nNos⁺ neurons is restricted to the most distal ganglionated colon region of *TashT*^{Tg/Tg} males further suggests that it only occurs in response to hypoganglionosis and/or aganglionosis. In agreement with this hypothesis, *nNos* transcript levels are even found to be decreased in *TashT*^{Tg/Tg} e12.5 enteric neural progenitors (Bergeron *et al.*, 2015).

2.6.3 Implications for HSCR and other enteric neuropathies

Despite successful removal of the aganglionic segment and restoration of continuity between the ganglionated colon and the anus, many postoperative HSCR patients continue to suffer from colon motility problems ranging from incontinence to

constipation (Rintala et Pakarinen, 2012). What exactly explains the variable functional outcomes is currently unknown although this is believed to be due to the nature of the reconnected ganglionated region. Our data are in total agreement with this idea and further suggest that hypoganglionosis above a certain level as well as an increased number of nitrergic neurons both represent important contributing factors. Considering these parameters in the clinic might help predicting the postoperative outcomes and thereby allows for more personalized care of HSCR patients. We are convinced that these parameters might be also useful for the management of patients suffering from other enteric neuropathies.

Acknowledgements

The authors thank Denis Flipo (UQAM) for assistance with confocal imaging and all the other members of the Pilon lab for thoughtful discussions about the manuscript.

Funding

This work was supported by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC #342093) and from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR #MOP-26037) to NP. AMT was supported by a PhD scholarship from the Fonds de la recherche du Québec - Nature et technologies (FRQNT). NP is a Fonds de la Recherche du Québec - Santé (FRQS) Junior2 Research Scholar and the recipient of the UQAM Research Chair on Rare Genetic Diseases. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Disclosure

No competing interests declared.

Author contribution

AMT designed the experiments; AMT and BC performed the experiments, AMT interpreted data; NP supervised the study; AMT and NP wrote the manuscript. All authors reviewed and approved the final manuscript.

2.7 Figures

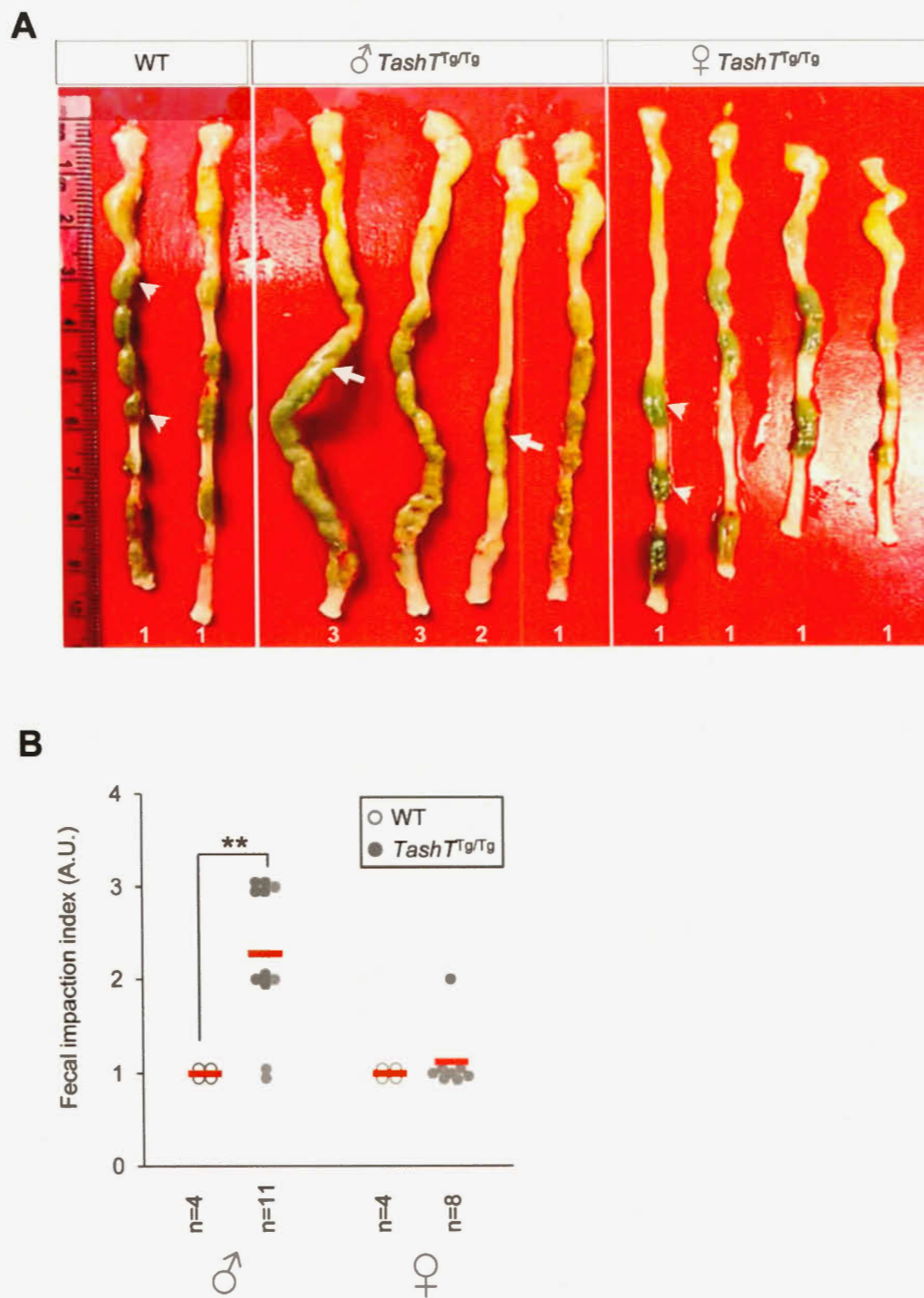


Figure 2.1 Fecal retention in the colon of adult *TashT^{Tg/Tg}* males.

(A) Representative images of whole colons from adult wild-type and *TashT^{Tg/Tg}* mice. Numbers are arbitrary units (A.U.) assigned by someone who was blinded to genotype in order to grade fecal impaction: 1- well separated pellets as observed in the colon of wild-type mice (arrowheads); 2 and 3 - small and high numbers of compacted feces, respectively (arrows). Note that *TashT^{Tg/Tg}* males display markedly higher fecal impaction in comparison to *TashT^{Tg/Tg}* females and wild-type controls. (B) Quantitative analyses using the arbitrary units described in A (** $p \leq 0.001$; Student's *t*-test).

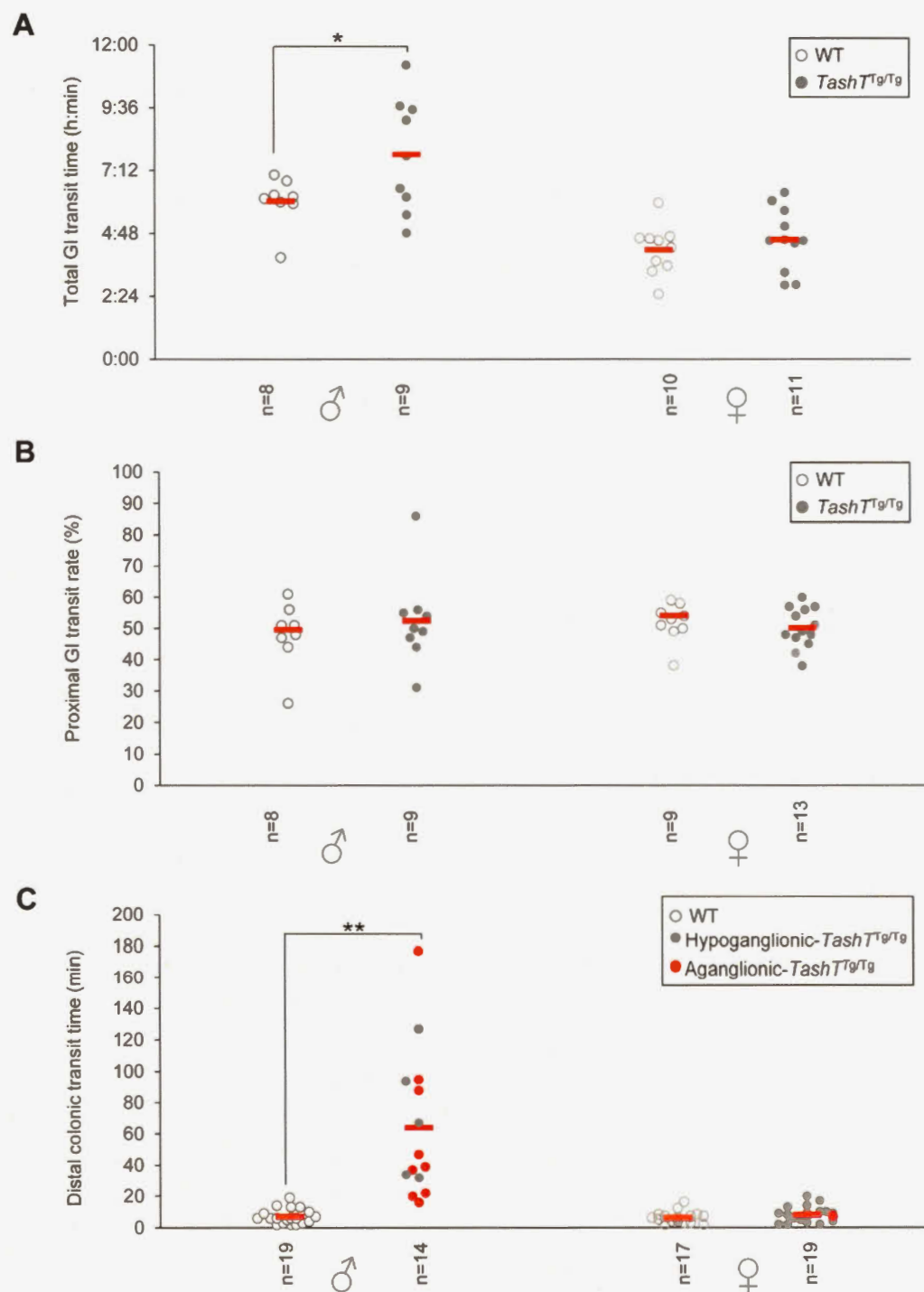


Figure 2.2. Impaired gastrointestinal (GI) motility in adult *TashT^{Tg/Tg}* males.

(A) Total GI transit evaluated by the time (hour: minutes) required for expelling the first red pellet following oral gavage with carmine red dye. Note that the average time of total GI transit is increased in *TashT^{Tg/Tg}* males in comparison to *TashT^{Tg/Tg}* females and wild-type controls. (B) Proximal GI transit evaluated by the distance traveled by the carmine red dye 15 min after gavage and expressed in percentage of the total length of the small intestine. (C) Distal colonic transit evaluated by bead latency assay and expressed in min. Note that the average time of distal colonic transit in *TashT^{Tg/Tg}* males is 9-fold greater in comparison to *TashT^{Tg/Tg}* females and wild-type controls (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.001$; Student's *t*-test).

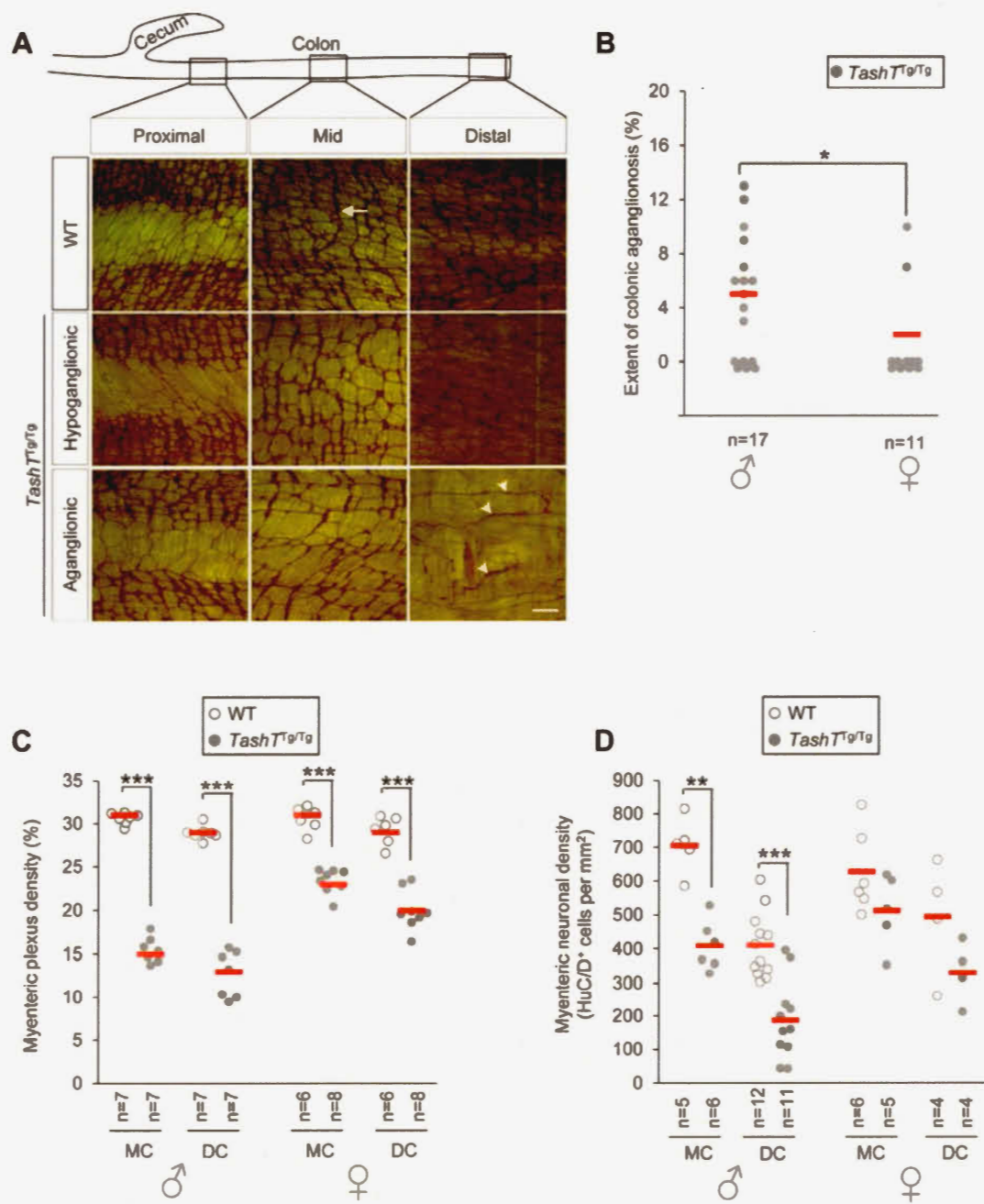


Figure 2.3 Adult *TashT^{Tg/Tg}* mice exhibit male-biased short-segment aganglionosis and hypoganglionosis.

(A) Representative images of whole-mount staining of acetylcholinesterase activity in the myenteric plexus of adult wild-type and *TashT^{Tg/Tg}* mice. Note that all *TashT^{Tg/Tg}* animals exhibit hypoganglionosis in the mid colon whereas either hypoganglionosis or aganglionosis is observed in the distal colon. Arrow and arrowheads indicate myenteric ganglia and extrinsic nerve fibers, respectively. Scale bar, 1mm. (B) Quantification of the extent of aganglionosis expressed in percentage of total colon length. The average extent of aganglionosis is significantly increased in *TashT^{Tg/Tg}* males compared to females. (C) Quantitative analysis of myenteric plexus density in ganglionated regions using images similar to those shown in (A), taken from the proximal, mid and distal mid colon (MC) and from the proximal and mid distal colon (DC). Note that the aganglionic distal DC was not included for these analyses. The area occupied by the myenteric plexus was measured from representative fields of view and expressed in percentage of the total area of the field of view (5.4mm²). Each single value corresponds to the average of either three (proximal, mid and distal MC) or two (proximal and mid DC) subregions (using one representative field of view per subregion). (D) Quantitative analyses of anti-HuC/D immunofluorescence data in ganglionated regions of *TashT^{Tg/Tg}* colons using images such as those shown in Supplemental Figure 2.4, taken from the proximal MC and mid DC. For each subregion, the myenteric neuronal density was calculated from 5 fields of view and expressed in number of HuC/D⁺ cells per mm². Note that a significant decrease of myenteric plexus density and neuron numbers is observed in *TashT^{Tg/Tg}* mice of both sexes but is more pronounced in males (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.001$; *** $p \leq 0.0001$; Student's *t*-test).

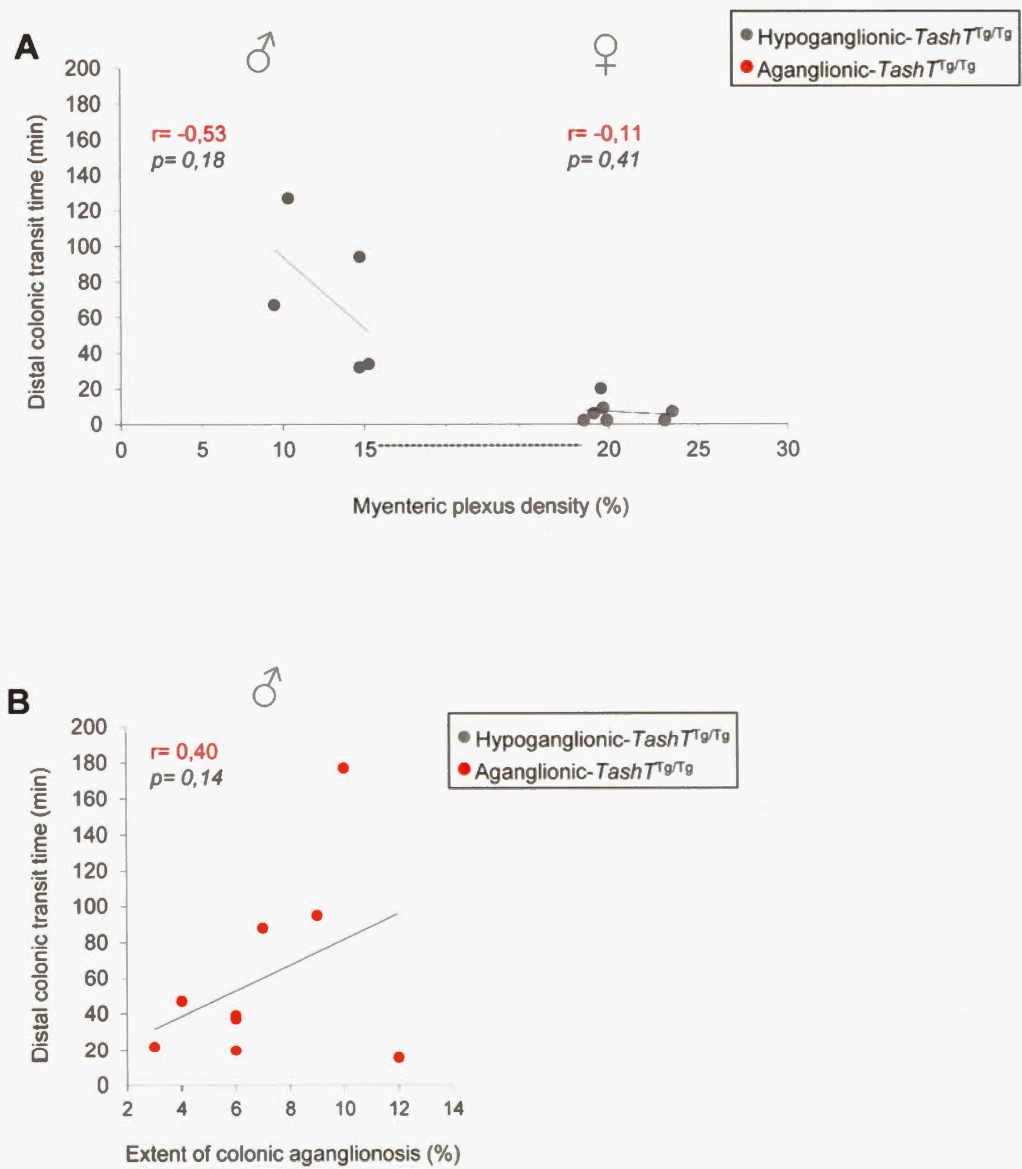


Figure 2.4 Correlation between distal colonic transit time and extent of hypoganglionosis or aganglionosis exhibited by adult *TashT^{tg/Tg}* mice.

(A) Plot of distal colonic transit time (Figure 2.2C) relative to average myenteric plexus density in the distal colon (combining proximal and mid but excluding distal subregions) of “hypoganglionic” *TashT^{tg/Tg}* mice (Figure 2.3C). Distal colonic transit time tends to be inversely correlated to myenteric plexus density, but only for *TashT^{tg/Tg}* males. (B) Plot of distal colonic transit time (Figure 2.2C) relative to the extent of colonic aganglionosis in “aganglionic” *TashT^{tg/Tg}* males (Figure 2.3B). Only a moderate positive correlation that does not reach statistical significance is observed. r, Pearson’s correlation coefficient; *p*, Student’s *t*-test value.

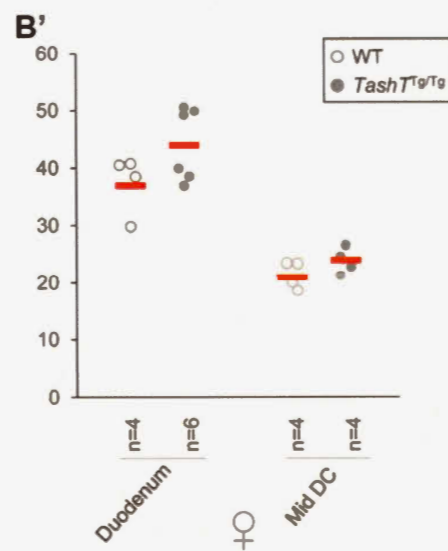
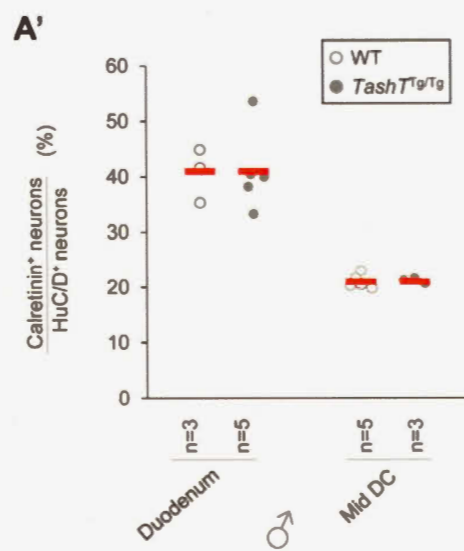
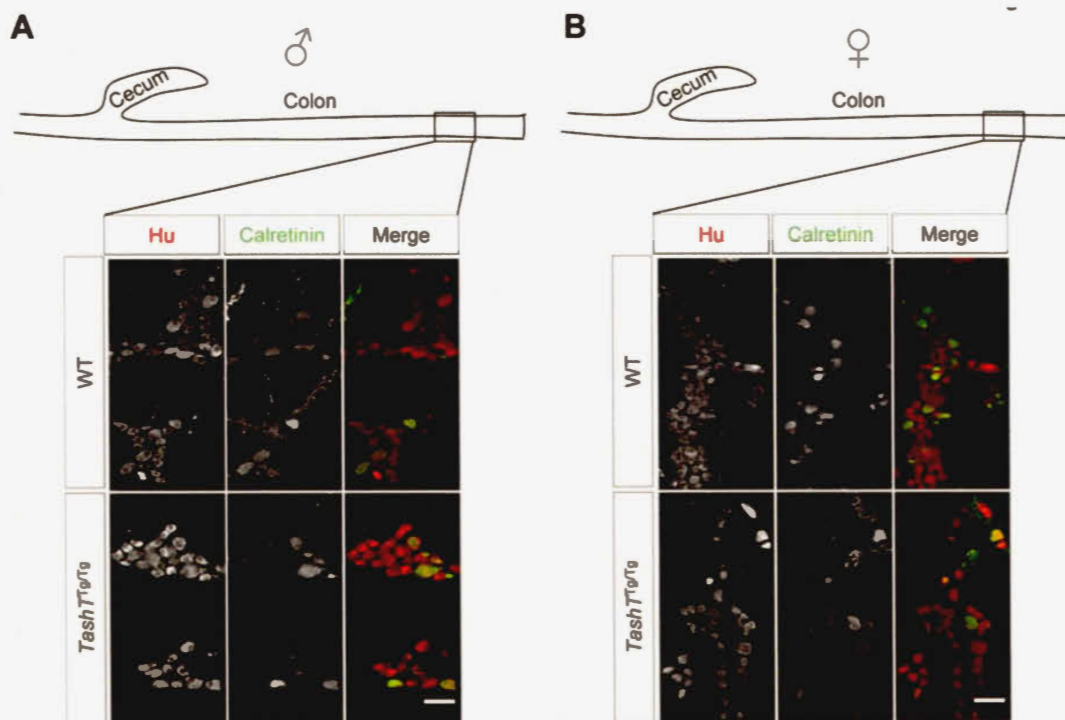


Figure 2.5 The proportion of Calretinin⁺ myenteric neurons is unaffected in adult *TashT^{Tg/Tg}* mice. (A-B) Representative Z projection micrographs of myenteric ganglia from the mid DC of male (A) and female (B) mice double-labelled with anti-Calretinin (green) and anti-HuC/D (red) antibodies. Scale bar, 50µm. (A'-B') Quantitative analyses of the average proportion of Calretinin⁺ myenteric neurons in the duodenum and mid DC. No statistically significant difference is observed between *TashT^{Tg/Tg}* mice and age- and sex-matched controls. DC, distal colon.

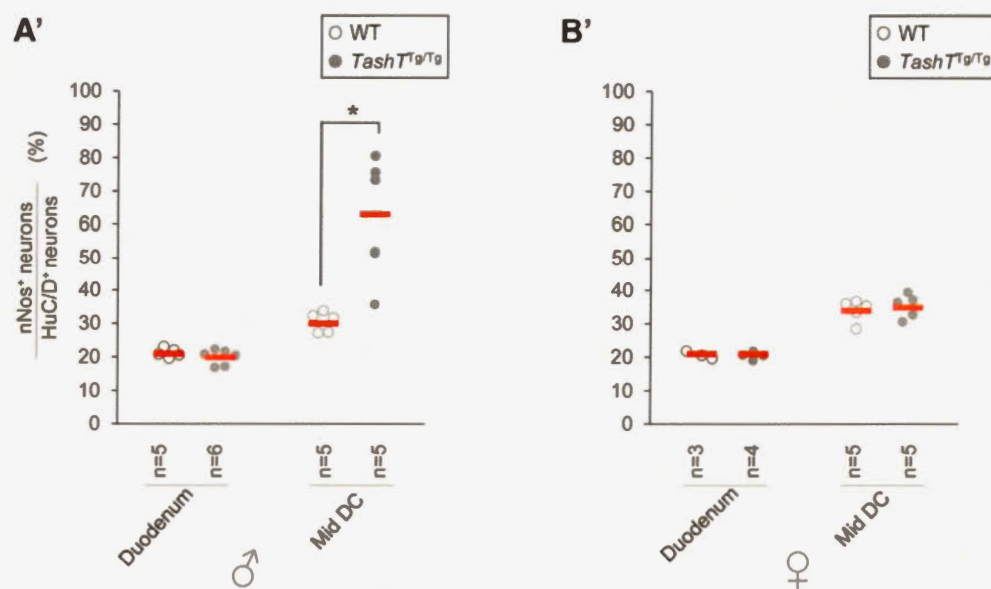
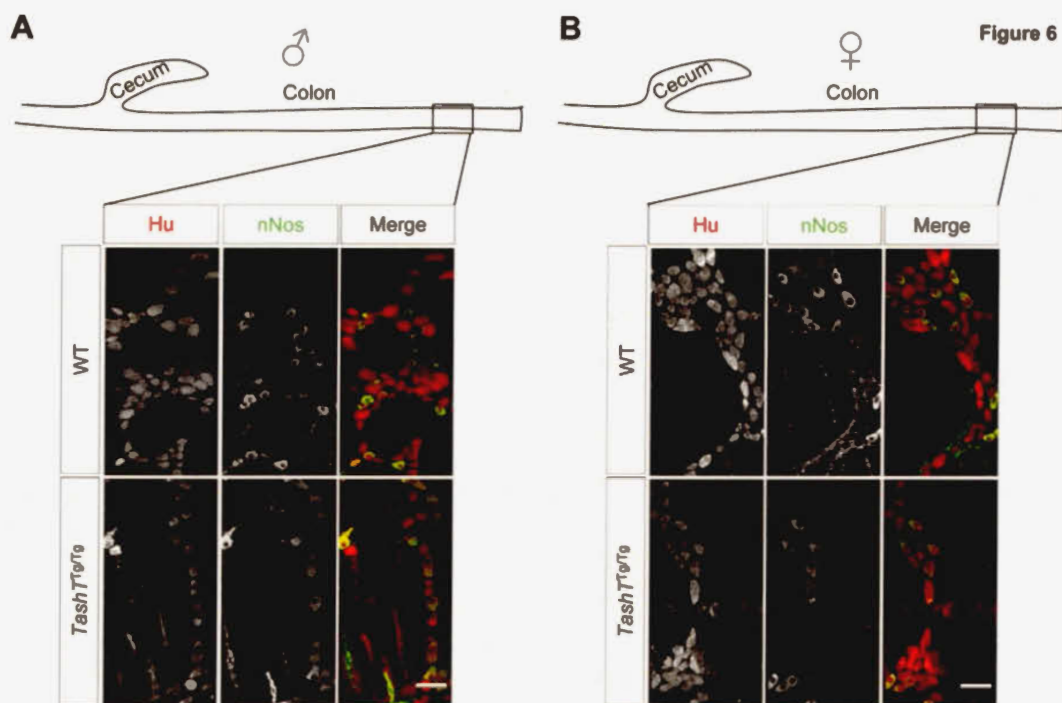
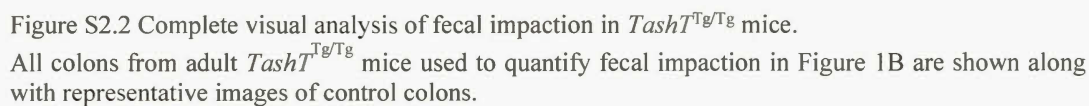
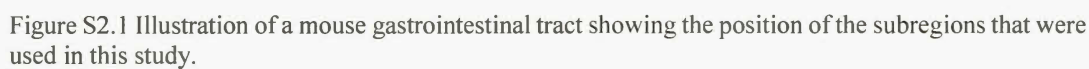


Figure 2.6 Male-specific and regionally-restricted increase of nNos⁺ neuron numbers in myenteric ganglia of adult *TashT^{Tg}/Tg* mice.

(A-B) Representative Z projection micrographs of myenteric ganglia from the mid DC of male (A) and female (B) mice double-labelled with anti-nNos (green) and anti-HuC/D (red) antibodies. Scale bar, 50µm. (A'-B') Quantitative analyses of the average proportion of nNos⁺ myenteric neurons in the duodenum and mid DC. The average proportion of nNos⁺ myenteric neurons is specifically increased in the mid DC of *TashT^{Tg}/Tg* males ($*p \leq 0.05$; Student's *t*-test). DC, distal colon.



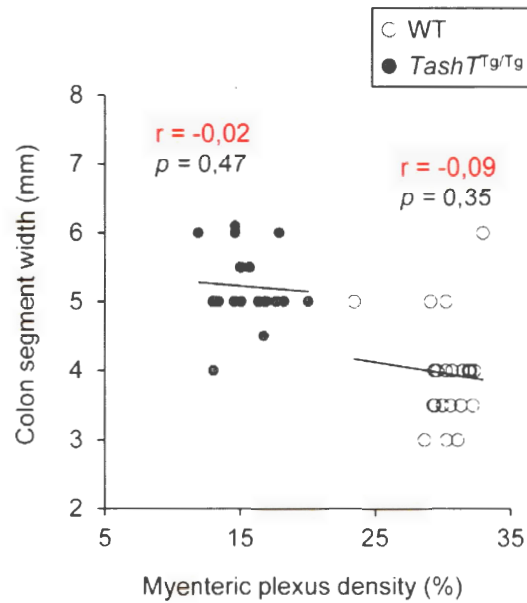


Figure S2.3 Colonic distention cannot explain the robust decrease in myenteric plexus density displayed by adult *TashT^{Tg}/Tg* males.

Plot of MC width (combining proximal, mid and distal subregions) relative to corresponding myenteric plexus density of adult wild-type and *TashT^{Tg}/Tg* male mice (n=7 animals for each). Each single value corresponds to an individual subregion. No correlation is observed between the colon width and the myenteric plexus density for both wild-type and *TashT^{Tg}/Tg* mice (r, Pearson's coefficient; p: Student's *t*-test value). MC, mid colon.

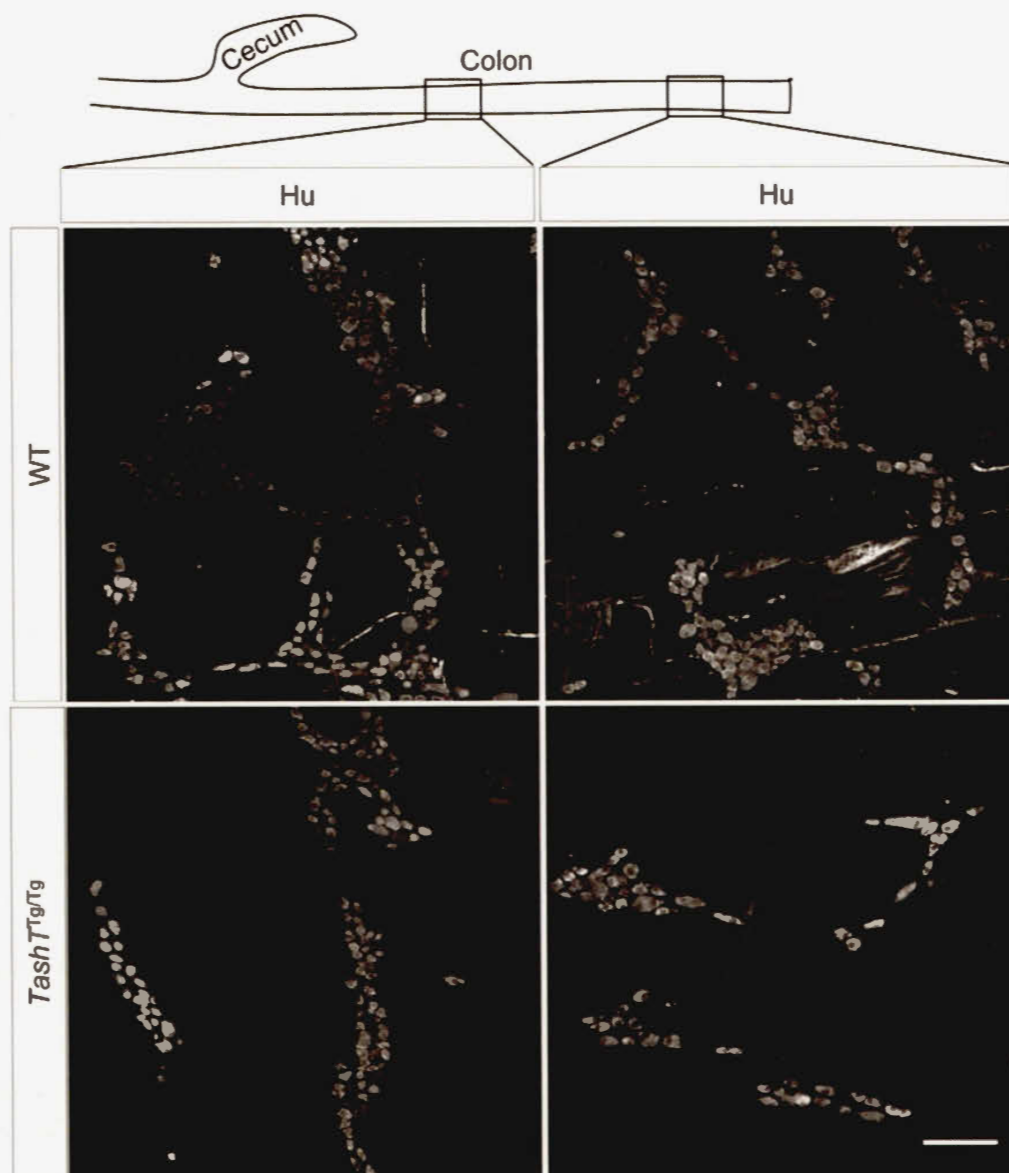


Figure S2.4 Male-biased reduced myenteric neuronal density in the colon of adult *TashT^{Tg}/T^{Tg}* mice. Representative Z projection micrographs of myenteric neurons from the proximal MC and mid DC of adult wild-type and *TashT^{Tg}/T^{Tg}* males labelled with an anti-HuC/D (grey) antibody. Scale bar, 100 μ m.

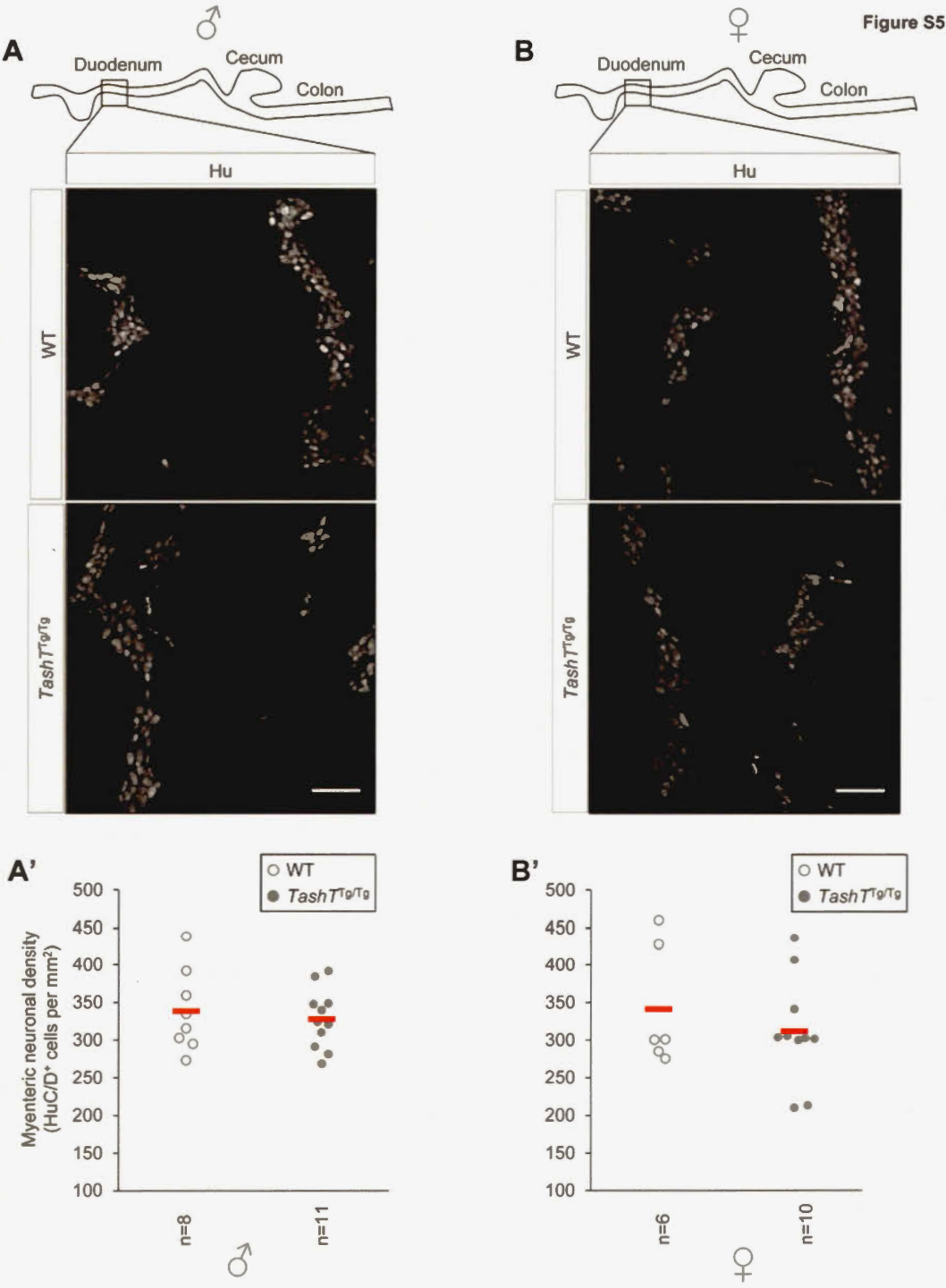


Figure S2.5 The myenteric neuronal density is unaffected in the duodenum of adult *TashT^{Tg/Tg}* mice. (A-B) Representative Z projection micrographs of myenteric neurons from the duodenum of adult wild-type and *TashT^{Tg/Tg}* males (A) or females (B) labelled with an anti-HuC/D (grey) antibody. Scale bar, 100µm. (A'-B') Quantitative analyses of myenteric neuron numbers in the duodenum. The average neuronal density is comparable between *TashT^{Tg/Tg}* and age- and sex-matched wild-type mice.

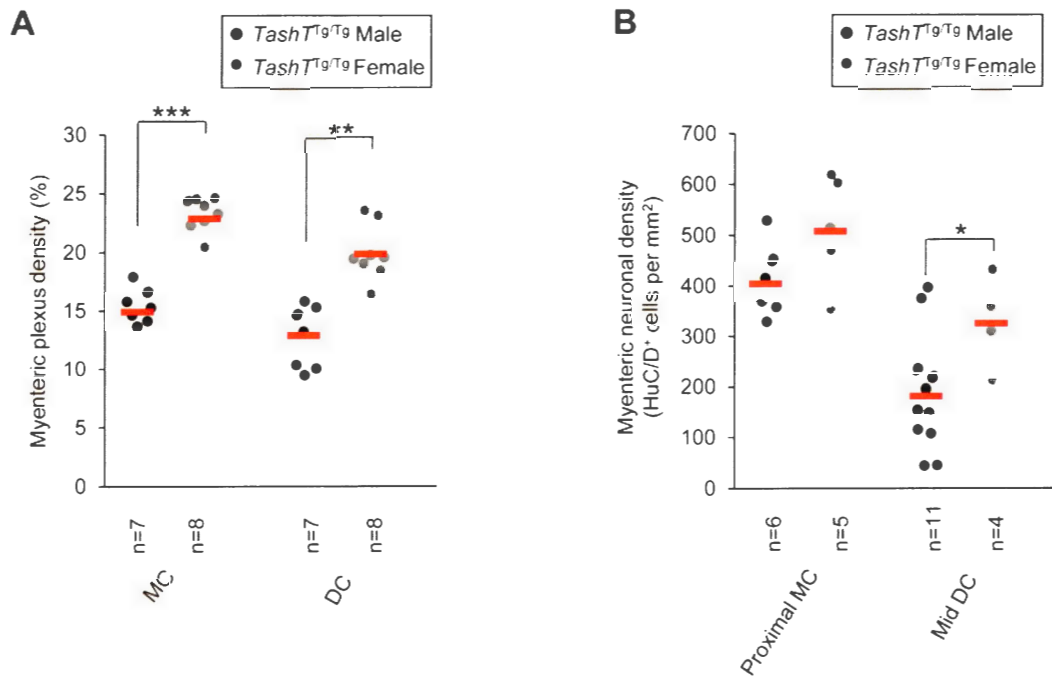


Figure S2.6 Inter-sex comparative analyses of myenteric plexus density and neuron numbers in age-matched *TashT^{9/9}* mice.

(A) The average myenteric plexus density as determined using AChE histochemistry is significantly reduced in *TashT^{9/9}* males compared to females. As described in Figure 2.3C, each single value in MC and DC corresponds to the average of three or two subregions, respectively. (B) The average number of HuC/D⁺ neurons per mm² is smaller in *TashT^{9/9}* males relative to females (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.001$; *** $p \leq 0.0001$; Student's *t*-test). MC, mid colon. DC, distal colon.

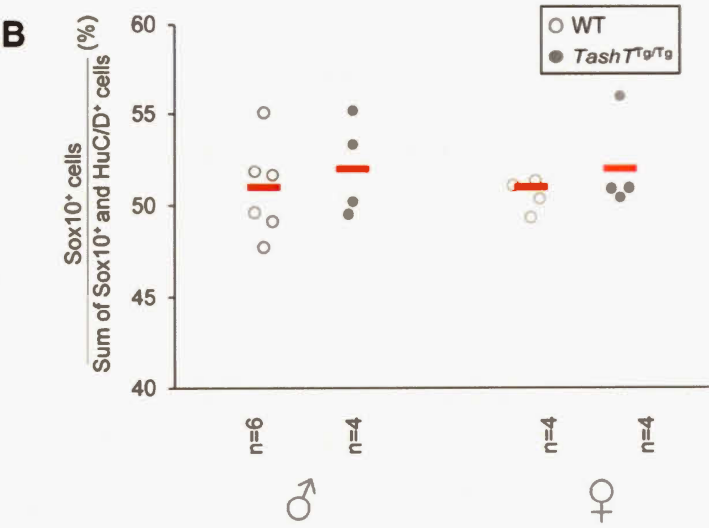
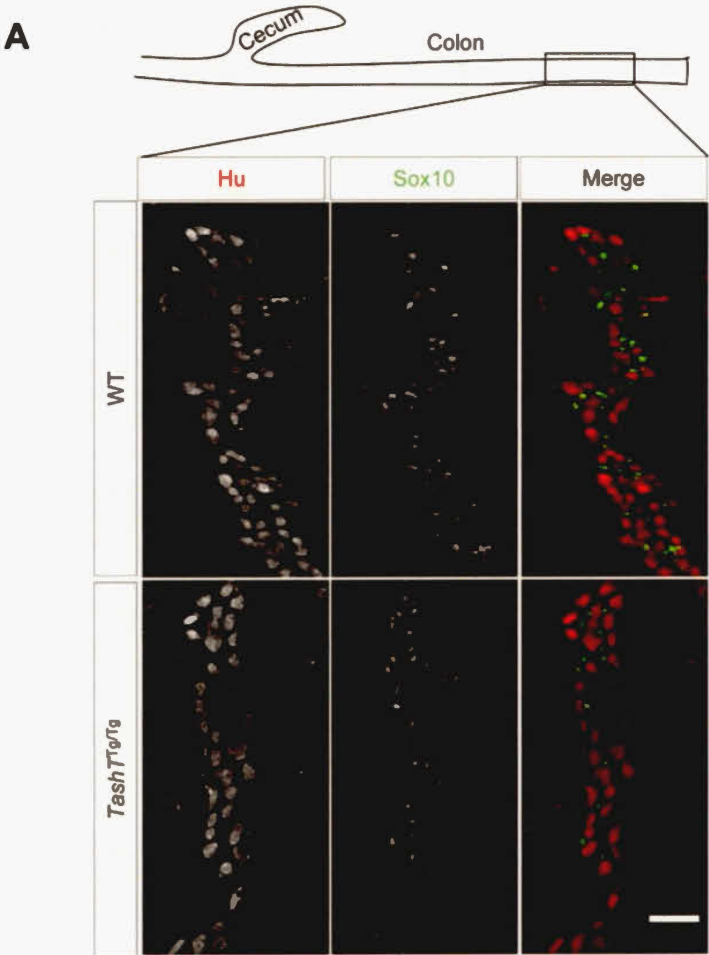


Figure S2.7 The neuron: glia ratio within myenteric ganglia is unchanged in the distal colon of adult *TashT^{Tg/Tg}* mice.

(A) Representative Z projection micrographs of myenteric ganglia from the proximal and mid DC of adult wild-type and *TashT^{Tg/Tg}* mice double-labelled with anti-Sox10 (green) and anti-HuC/D (red) antibodies. Scale bar, 100 μ m. (B) Quantitative analyses of the neuron: glia ratio in wild-type and *TashT^{Tg/Tg}* mice of both sexes. No statistically significant difference is observed between *TashT^{Tg/Tg}* mice and age- and sex-matched controls. DC, distal colon.

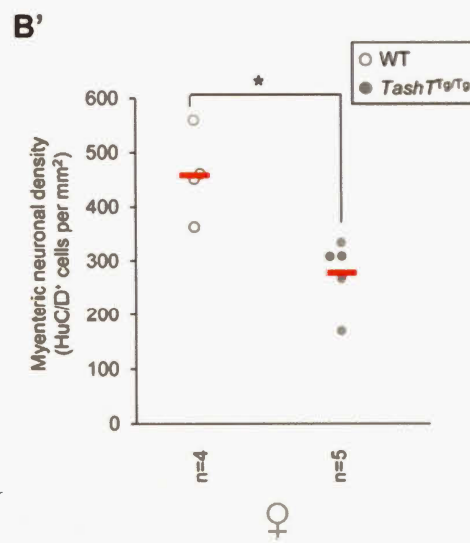
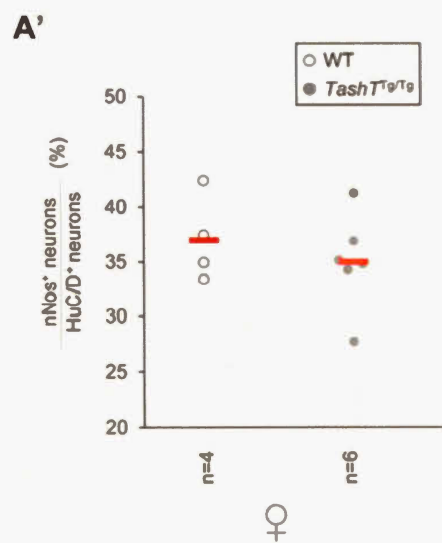
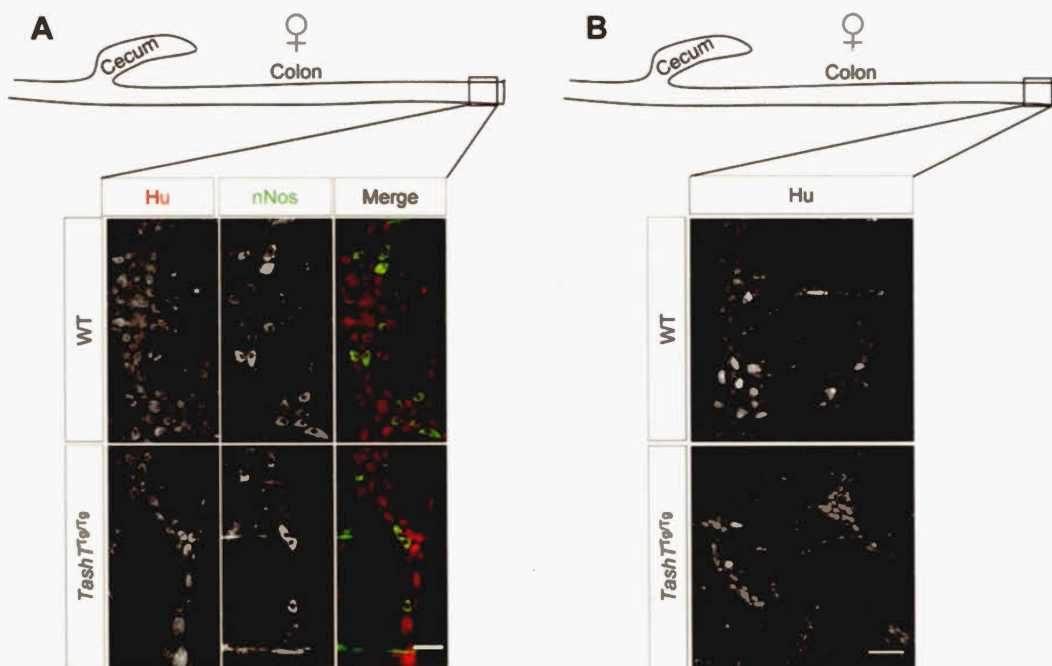


Figure S2.8 The proportion of nNos⁺ myenteric neurons is unaffected in the hypoganglionic DC of adult *TashT^{Tg/Tg}* females.

(A-B) Representative Z projection micrographs of myenteric ganglia from the distal DC of age-matched wild-type and *TashT^{Tg/Tg}* female mice labelled with anti-HuC/D (red) and anti-nNos (green) antibodies (A) or with anti-HuC/D (grey) only (B). Scale bars, 50µm (A) and 100µm (B). (A'-B') Quantitative analyses of the average proportion of nNos⁺ myenteric neurons and the average neuronal density in the distal DC. The average proportion of nNos⁺ myenteric neurons is comparable between wild-type and *TashT^{Tg/Tg}* females (A') despite a significant decrease in the average neuronal density (B') (* $p \leq 0.05$; Student's *t*-test). DC, distal colon.

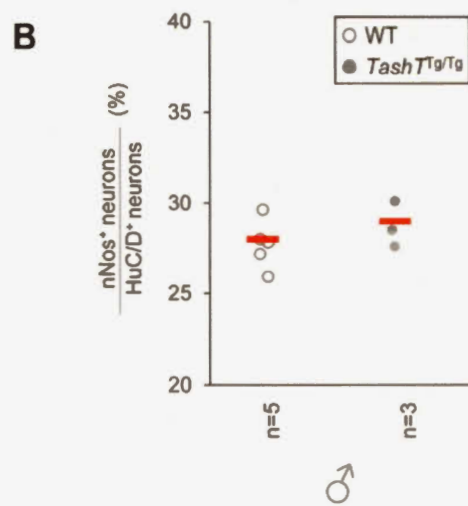
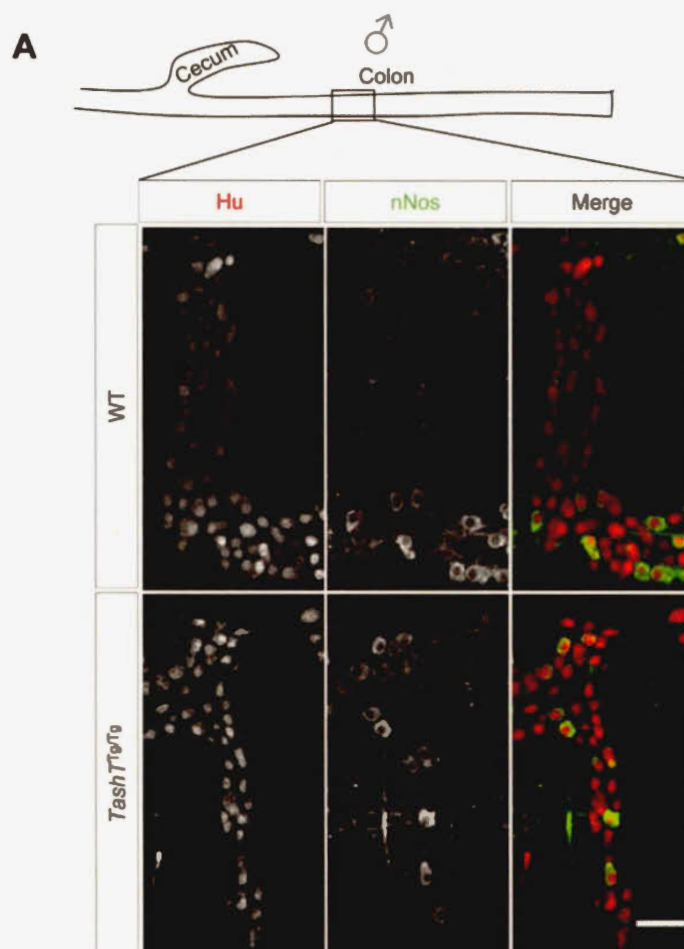


Figure S2.9 The proportion of nNos⁺ myenteric neurons is not altered in the proximal MC of adult *TashT^{Tg/Tg}* males.

(A) Representative Z projection micrographs of myenteric ganglia from the proximal MC of age-matched wild-type and *TashT^{Tg/Tg}* male mice double-labelled with anti-nNos (green) and anti-HuC/D (red) antibodies. Scale bar, 50µm. (B) Quantitative analyses of the average proportion of nNos⁺ myenteric neurons in the proximal MC. No difference is observed between wild-type and *TashT^{Tg/Tg}* mice. MC, mid colon.

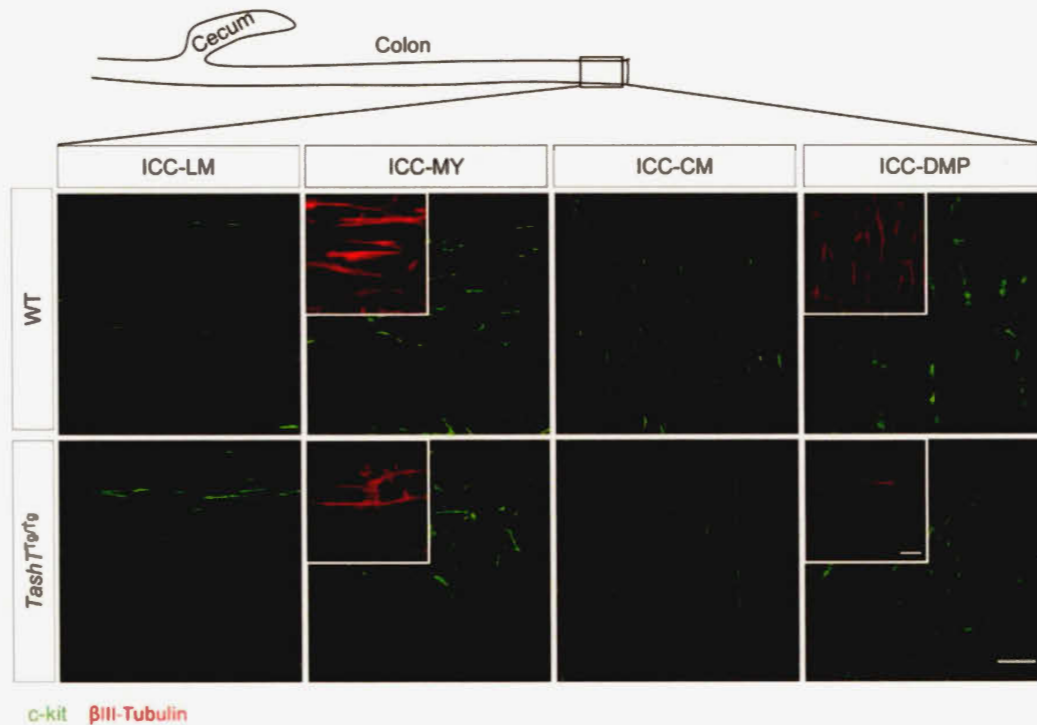


Figure S2.10 Distribution of interstitial cells of Cajal (ICC) in hypoganglionic distal DC of adult *TashT^{Tg/Tg}* mice.

Representative Z projection micrographs of ICC as well as myenteric and deep muscularis neuronal plexuses from the distal DC of adult wild-type and *TashT^{Tg/Tg}* mice labeled with anti-c-Kit (green) and anti-βIII-Tubulin (red), respectively. ICC-LM and ICC-CM are ICC located within the longitudinal and circular smooth muscle layers, respectively. ICC-MY and ICC-DMP are ICC present at the level of the myenteric and the deep muscularis plexuses, respectively. No overt change is detected in the distribution of these different ICC subpopulations between adult wild-type and *TashT^{Tg/Tg}* mice. Scale bar, 100μm.

2.8 Tables

Table 2.1 Comparison of body weight between wild-type and $TashT^{Tg/Tg}$ mice at P21, P28 and 2-3 months.

Sex	Genotype	Age		
		P21	P28	2-3 months
♂	Wild-type	12 ± 1 ($n=25$)	19 ± 1 ($n=25$)	28 ± 1 ($n=11$)
	$TashT^{Tg/Tg}$	10 ± 1 ($n=14$)	16 ± 1 ($n=15$)	22 ± 1 ($n=10$)
	% difference	-16.67%	-15.78%	-21.43%
	<i>p</i> -value	5,279 E-06	1,008 E-05	1,823 E-09
♀	Wild-type	12 ± 1 ($n=11$)	17 ± 1 ($n=11$)	22 ± 2 ($n=12$)
	$TashT^{Tg/Tg}$	11 ± 1 ($n=25$)	15 ± 1 ($n=25$)	20 ± 1 ($n=13$)
	% difference	-8.33%	-11.76%	-9.09%
	<i>p</i> -value	0,018	3,244 E-05	0,012

Table S2.1 List of primary and secondary antibodies used in this study.

Antibody	Dilution	Host species	RRID number	Source
Anti-HuC/D	1 :500	Mouse	AB_2314656	Molecular Probes, A-21271
Anti-Calretinin	1 :500	Goat	AB_10000342	Swant, CG1
Anti-nNos	1 :500	Rabbit	AB_91824	Millipore, AB5380
Anti-Sox10	1 :500	Goat	AB_2195374	Santa Cruz Biotechnology, sc-17342
Anti-C-kit	1 :500	Goat	AB_354750	Cederlane (Canada), AF1356
Anti- β III-Tubulin	1 :200	Mouse	AB_2256751	Abcam, ab78078
Anti-Mouse Alexa Fluor 647	1 :500	Donkey	AB_2340862	Jackson Immuno Research, 715-605-150
Anti-Rabbit Alexa Fluor 594	1 :500	Donkey	AB_2340621	Jackson Immuno Research, 711-585-152
Anti-Goat Alexa Fluor 594	1 :500	Bovine	AB_2340884	Jackson Immuno Research, 805585180

CHAPITRE III

GUT MICROBIOTA-MEDIATED GENE-ENVIRONMENT INTERACTION IN THE *TASHT* MOUSE MODEL OF HIRSCHSPRUNG DISEASE

Le travail de ce chapitre a été publié, en janvier 2019, dans la revue Scientific Reports :
Sci Rep. 2019 Jan 24;9(1):492. doi: 10.1038/s41598-018-36967-z.

Contribution des auteurs : Aboubacrine Mahamane TOURÉ (Design des expériences, traitement des souris avec antibiotiques, analyses des paramètres de la motricité du tractus gastro-intestinal, dissections des animaux, marquage des tissus pour des analyses d'immuno-histochimiques et histologiques, analyses statistiques, interprétation des résultats, recherche bibliographique et rédaction du manuscrit). Mathieu LANDRY (Analyses bio-informatiques des données du séquençage du microbiome intestinal). Ouliana SOUCHKOVA (Dissections des animaux, traitement des souris avec antibiotiques et L-NAME). Steven KEMBEL (Design des amorces utilisés pour le séquençage du microbiote intestinal et analyses bio-informatiques des données de ce séquençage). Nicolas PILON (Supervision des expérimentations et rédaction du manuscrit).

NOTE : Les références de l'article sont incluses dans la bibliographie générale.

3.1 Résumé

Basé sur la relation bilatérale entre le microbiote intestinal et la formation/fonction du système nerveux entérique (SNE), nous avons voulu déterminer si la dysbiose induite par les antibiotiques pouvait avoir un impact sur l'expressivité des anomalies du SNE d'origine génétique. Pour ce faire, nous avons tiré avantage des souris *TashT* – modèle murin pour la maladie de Hirschsprung – chez lesquelles l'aganglionose et l'hypoganglionose dans le côlon sont toutes plus sévères chez les mâles. Ces défauts engendrent deux troubles de la motricité colique biaisés en faveur des mâles : soit le mégacôlon qui est mortel vers l'âge de sevrage, ou la constipation chronique chez l'adulte, cette dernière étant également associée à une augmentation de la proportion des neurones nitrergiques du SNE distal.

L'induction de la dysbiose à l'aide d'un cocktail d'antibiotiques à large spectre a eu un impact spécifique sur le SNE colique des souris *TashT^{Tg/Tg}* d'une manière dépendante du stade de développement. Ceci a diminué la densité neuronale après le sevrage et modulé de manière différentielle la proportion des neurones nitrergiques normalement augmentée, qui apparaît normale vers l'âge du sevrage et augmente davantage après le sevrage. Ces changements ont retardé le développement du mégacôlon autour de la période de sevrage mais ont, plus tard, précipité la survenue de la constipation sévère. Enfin, l'inhibition locale de la signalisation de l'oxyde nitrique a amélioré la motricité et empêché la mort associée au mégacôlon.

Nous concluons donc que l'exposition aux antibiotiques peut négativement influencer l'expressivité d'une neuropathie entérique d'origine génétique.

Manuscrit

Gut microbiota-mediated Gene-Environment interaction in the *TashT* mouse model of Hirschsprung disease

Aboubacrine Mahamane Touré^{1,2,3}, Mathieu Landry^{1,4}, Ouliana Souchkova^{1,2,4}, Steven W. Kembel^{1,2} and Nicolas Pilon^{1,2}*

¹ Département des Sciences Biologiques, Université du Québec à Montréal, Montréal H3C 3P8, Québec, Canada.

² Centre d'Excellence en Recherche sur les Maladies Orphelines – Fondation Courtois (CERMO-FC), Université du Québec à Montréal, Montréal H2X 3Y7, Québec, Canada.

³ Département d'Enseignement et de Recherche de Biologie de la Faculté des Sciences et Techniques de l'Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako, Badalabougou, Colline de Badala, Bamako, Mali.

⁴ These authors contributed equally

* Correspondence to : Nicolas Pilon (pilon.nicolas@uqam.ca)

KEYWORDS: Antibiotics; Dysbiosis; Enteric Nervous System; Hirschsprung disease; Gastrointestinal motility; Gut microbiota; Mouse model; NOS signaling.

3.2 Abstract

Based on the bilateral relationship between the gut microbiota and formation/function of the enteric nervous system (ENS), we sought to determine whether antibiotics-induced dysbiosis might impact the expressivity of genetically-induced ENS abnormalities. To address this, we took advantage of the *TashT* mouse model of Hirschsprung disease, in which colonic aganglionosis and hypoganglionosis are both much more severe in males. These defects result into two male-biased colon motility phenotypes: either megacolon that is lethal around weaning age or chronic constipation in adults, the latter being also associated with an increased proportion of nitrergic neurons in the distal ENS.

Induction of dysbiosis using a cocktail of broad-spectrum antibiotics specifically impacted the colonic ENS of *TashT*^{Tg/Tg} mice in a stage-dependent manner. It further decreased the neuronal density at post-weaning age and differentially modulated the otherwise increased proportion of nitrergic neurons, which appeared normalized around weaning age and further increased at post-weaning age. These changes delayed the development of megacolon around weaning age but led to premature onset of severe constipation later on. Finally, local inhibition of nitric oxide signaling improved motility and prevented death by megacolon.

We thus conclude that exposure to antibiotics can negatively influence the expressivity of a genetically-induced enteric neuropathy.

3.3 Introduction

Hirschsprung disease (HSCR) is a congenital malformation of the enteric nervous system (ENS) that globally affects 1/5000 live births, with an intriguing 4:1 male-biased sex ratio (Heuckeroth, 2018). HSCR is characterized by the absence of enteric neural ganglia (aganglionosis) over a varying length of the distal colon, caused by the failure of neural crest-derived ENS progenitors to reach this region during prenatal development (Bergeron *et al.*, 2013). One of the primary roles of the ENS is to establish rhythmic patterns of contraction and relaxation in enteric smooth muscle layers, thereby controlling bowel motility. In HSCR, the aganglionic segment remains constantly contracted, leading to obstruction and distention of the proximal colon (megacolon) because of excessive accumulation of fecal material. Etiology of HSCR is considered to be multifactorial, with a genetic contribution generally believed to be heavier than that of non-genetic factors (Gui *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2017). However, most if not all of the known HSCR-associated genetic variants are partially penetrant (Alves *et al.*, 2013), suggesting that many HSCR cases do have a critical non-genetic contribution (Heuckeroth et Schafer, 2016). This contribution would most likely only be evident in the presence of HSCR-associated genetic changes that cause aganglionosis but not over a sufficiently long segment to result in functional obstruction. In these circumstances, even a small contribution of non-genetic factors to extent of aganglionosis would render functional obstruction inevitable.

The prenatal period, during which the developing intestines are being colonized by neural crest-derived ENS progenitors, is presumably highly vulnerable to non-genetic factors. In support of this idea, vitamin A deficiency or exposure to drugs like ibuprofen and mycophenolate mofetil during intrauterine development were all found to increase the extent of aganglionosis in HSCR mouse models (Fu *et al.*, 2010; Lake *et al.*, 2013; Schill *et al.*, 2016). Yet, the contribution of non-genetic factors to HSCR is not

expected to be restricted to prenatal development. The postnatal maturation of the ENS, which lasts several weeks after birth (Foong, 2016), is most likely another sensitive period. A tempting hypothesis would be that non-genetic factors might increase HSCR risk by worsening the ENS defects typically observed in the transition zone just upstream of the aganglionic segment, such as decreased neuronal density (hypoganglionosis) and neuronal subtype imbalance (Musser *et al.*, 2015; Ro *et al.*, 2006; Roberts *et al.*, 2008; Shen *et al.*, 2002; Toure *et al.*, 2016). This would provide a plausible explanation as to why the age at which clinical symptoms of HSCR manifest varies across affected children (Heuckeroth, 2018). However, this possibility has not been tested yet.

With an overall genetic composition much larger than the genome of their host (QinLi, *et al.*, 2010), the gut microbiota stands out as a good candidate for postnatally influencing HSCR incidence. This complex microbial community is established through a colonization phase, commonly believed to occur at birth, followed by a maturation phase that is intertwined with the postnatal maturation of the ENS (Veiga-Fernandes et Pachnis, 2017). Accordingly, depletion and/or perturbation of the gut microbiota during early postnatal stages in mice have been linked to alteration of ENS structure and bowel motility (Caputi *et al.*, 2017; Collins *et al.*, 2014). At least part of these defects are apparently due to dysregulated activation of Toll-like receptors (TLRs) by microbial products at the surface of enteric neurons and glial cells (Anitha *et al.*, 2012; Barajon *et al.*, 2009; Brun *et al.*, 2013; Grasa *et al.*, 2015). It is especially striking that the ENS defects observed upon perturbation of the gut microbiota or TLR signaling are very similar to those observed in the transition zone of HSCR mouse models, being predominantly characterized by decreased neuronal density, neuronal subtype imbalance (mostly affecting nitrergic neurons) and/or abnormal development of glial cells (Anitha *et al.*, 2012; Brun *et al.*, 2013; Caputi *et al.*, 2017; Collins *et al.*, 2014; Kabouridis *et al.*, 2015).

The *TashT* mouse line is ideally suited for studying gene-environment interactions in the context of HSCR. This line was generated via an insertional mutation screen for loci with key roles in neural crest cells, which for *TashT* consists of a silencer-enriched region in a chromosome 10 gene desert (Pilon, 2016). The transgenic insertion in this region directly perturbs the expression of *Fam162b* (Bergeron *et al.*, 2015) as well as other genes to be described elsewhere. The *TashT* line is unique in that it is the only HSCR mouse model that recapitulates both the partial penetrance and the male bias of the human condition (Bergeron *et al.*, 2015). Both of these characteristics can be explained by the fact that the extent of aganglionosis in homozygous *TashT* animals (*TashT*^{Tg/Tg}) is close to a “tipping point” for developing functional obstruction, with females generally having a shorter aganglionic segment (Bergeron *et al.*, 2015). In the end, megacolon is observed almost exclusively in male pups, causing the death of about a quarter of them around weaning age (postnatal day (P) 21) (Bergeron *et al.*, 2015). Otherwise, *TashT*^{Tg/Tg} mice are able to evacuate fecal material and survive when more than 4/5 of their colon is innervated. However, we found that surviving males, but not females, suffer from chronic constipation after reaching adulthood (2-3 months old) (Toure *et al.*, 2016). This phenotype is associated with ENS defects in the transition zone that are either more severe (hypoganglionosis) or specifically observed (increased proportion of nitrergic neurons) in males (Toure *et al.*, 2016).

Studies aimed at analyzing perturbations of the gut microbiota in the context of HSCR have so far been focused on the risk of developing HSCR-associated enterocolitis (HAEC) (Frykman *et al.*, 2015; Pierre *et al.*, 2014; Ward, N. L. *et al.*, 2012). In the current study, we used the *TashT* line in order to test the different hypothesis that antibiotics-induced perturbations of the microbial flora – that we term “dysbiosis” in the current context – during the early postnatal period might increase the incidence of aganglionic megacolon. Intriguingly, we found that the global incidence of megacolon is not changed in immature *TashT*^{Tg/Tg} male mice exposed to antibiotics, but that the time window over which this phenotype is more likely to manifest in normal conditions

is shifted by several days in antibiotics-treated *TashT^{Tg/Tg}* male mice. This is mainly associated with dysbiosis-associated temporal modulation of the proportion of nitrergic neurons in the transition zone, which is decreased at P22-23 and increased at P30-36. We further discovered that local inhibition of nitric oxide (NO) signaling using rectal enemas containing NG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) may have therapeutic value for colonic dysmotility. Our work thus strongly suggests that antibiotics-induced dysbiosis might contribute to late-onset HSCR risk, highlighting a key pathogenic role for the transition zone.

3.4 Results

3.4.1 Taxonomic composition of the colonic microbiota in wild-type, *TashT^{Tg/Tg}* and *Holstein^{Tg/Tg}* mice

To determine how the *TashT* line is comparable to other HSCR mouse models in terms of microbiota composition, we first profiled the basal microbiome in the colon of *TashT^{Tg/Tg}* pups in comparison to wild-type (WT) animals of weaning age (P21-22). Given the partial penetrance and male bias of the megacolon phenotype in this mutant line (Bergeron *et al.*, 2015), we also took care to perform this analysis as a function of disease state (with or without megacolon) and sex. Moreover, to determine whether a general microbiome signature might be associated with megacolon, we included another of our previously described HSCR mouse models called *Holstein* (involving overproduction of Collagen VI) (Soret *et al.*, 2015). Using targeted sequencing of the *16S* rRNA gene to profile the microbiome, we first noted a comparable signature in WT mice of both sexes, this signature consisting of the phyla *Firmicutes*, *Proteobacteria* and *Bacteroidetes* (in order of abundance) (Figs.3.1A and S3.1A). Microbiome profiling of *TashT^{Tg/Tg}* and *Holstein^{Tg/Tg}* mutant mice revealed a clear

dysbiotic state in both cases, reminiscent of the previously reported dysbiosis in the *Ednrb*-null HSCR mouse model (Pierre *et al.*, 2014; Ward, N. L. *et al.*, 2012). The observed dysbiosis was largely similar in both of our mutant lines (regardless of sex and health status), being mainly characterized by a marked decrease in abundance of *Firmicutes*, a marked increase of *Proteobacteria*, and a variable increase of *Deferribacteres* (Figs.3.1A, S3.2A, S3.3A and S3.4). At the order level, a small difference (<10% of all taxa) was noted as a function of sex, with *Burkholderiales* being only detected in WT males (Figs.3.1B and S3.1B). Small changes (<15% of all taxa) were also noted between mutant lines as a function of both disease state and genotype. Megacolon-suffering *TashT^{Tg/Tg}* males differed from *TashT^{Tg/Tg}* males unaffected by megacolon by the emergence of *RF32*, whereas *Bifidobacteriales* and *Pasteurellales* were exclusively detected in *Holstein^{Tg/Tg}* mice (Figs.3.1B, S3.2B and S3.3B). Given that the differences in microbiota composition appear minor between mutants in terms of relative abundance, our observations suggest the existence of a general microbiome signature in HSCR mouse models. However, the fact that a broadly similar dysbiotic state is present in all *TashT^{Tg/Tg}* animals, regardless of the presence of megacolon (Figs.S3.2 and S3.4), indicates that microbiota alterations are mainly caused by ENS defects and not by bowel obstruction. Moreover, although critical sex-based differences in gut microbiota have been previously reported in non-obese diabetic (NOD) mice (Markle *et al.*, 2013), our data suggest that sex-based differences are subtle in the context of HSCR (Fig.S3.3).

3.4.2 Impact of early continuous antibiotic treatment on the fecal microbiota of wild-type and *TashT^{Tg/Tg}* male pups

To induce gut dysbiosis during the early postnatal period, mouse pups and their mother were continuously exposed to a cocktail of antibiotics added to drinking water

(Kabouridis *et al.*, 2015), starting before birth until P36. Efficiency of this approach was validated by evaluating the concentration of fecal bacteria at P14, P21 and P28, which revealed marked decreases of 75%, 96% and 80%, respectively (Fig.3.2A). The impact of antibiotic treatment on microbiota composition was then assessed by profiling the fecal microbiome from WT and *TashT^{Tg/Tg}* mice at P28-30, again via targeted sequencing of the *16S* rRNA gene. Of note, for this analysis and the remaining of the current study, only male mice were evaluated because of the strong male bias of *TashT^{Tg/Tg}* ENS defects (Bergeron *et al.*, 2015; Toure *et al.*, 2016). In absence of antibiotics, the changes in microbiota composition previously observed between WT and *TashT^{Tg/Tg}* mice at P21-22 (Fig.3.1A-B) appeared to be maintained at P28-30, at both the phylum and the order levels (Fig.3.2B). Interestingly, despite this difference, the impact of antibiotics was found to be very similar in both WT and *TashT^{Tg/Tg}* mice (Figs.3.2B and S3.5). At the phylum level, exposure to antibiotics resulted in the marked emergence of *Tenericutes* at the expense of *Firmicutes* and *Bacteroidetes* (Fig.3.2B and S3.6A). At the order level, these changes were mainly characterized by the marked emergence of *Mycoplasmatales* and an increase of *Enterobacteriales*, at the expense of *Clostridiales*, *Bacteroidales*, *Campylobacterales* and *Burkholderiales* (Fig.3.2B and S3.6B).

3.4.3 Impact of antibiotics-induced dysbiosis on motility parameters in *TashT^{Tg/Tg}* male mice

Having validated that our antibiotic treatment led to severe dysbiosis, we next sought to determine whether this approach could exacerbate transition zone-associated ENS defects in *TashT^{Tg/Tg}* male mice. In such case, antibiotics-induced dysbiosis would be expected to increase the incidence of either megacolon or chronic constipation, as both of these motility-related phenotypes have been previously reported in *TashT^{Tg/Tg}* male

mice (Bergeron *et al.*, 2015; Toure *et al.*, 2016). Close follow-up of a large number of *TashT^{Tg/Tg}* pups first revealed that death by megacolon did not occur more frequently upon antibiotic treatment, being observed in 18.95% of untreated (29 out of 153 animals) and 18.87% of antibiotics-treated (20 out of 106 animals) males. Intriguingly, we instead observed that exposure to antibiotics delayed age of death by 3 days on average (Fig.3.3A). Visual inspection of colons during the last days of treatment (P33-36) further revealed that surviving *TashT^{Tg/Tg}* males that do not exhibit any of the clinical signs of megacolon in rodents (i.e. lethargy, hunched posture, diarrhea and/or distended abdomen) did exhibit a marked increase of fecal retention upon antibiotic treatment (Fig.3.3B). Quantification of fecal retention using arbitrary units revealed that both the incidence and the severity of this phenotype were affected (Fig.3.3C). Moreover, such effect appeared specific to *TashT^{Tg/Tg}* males, as no fecal retention was observed in the colon of antibiotics-treated WT animals (Fig.3.3B-C). Yet, when compared to untreated animals, all antibiotics-treated mice displayed the expected phenotypic signature (Kabouridis *et al.*, 2015; Reikvam *et al.*, 2011), which include growth retardation (Fig.S3.7A), presence of a brown (Fig.3.3B) and enlarged (Fig.S3.7B) cecum, and depletion of mucosal glial cells (Fig.S3.7C).

To complement the morphological analyses described above, we then directly assessed the transit of luminal content throughout the bowel in another group of P30-36 male mice. Using carmine red dye as tracer, we found that the antibiotic treatment specifically delayed the total gastro-intestinal (GI) transit time in *TashT^{Tg/Tg}* males (Fig.3.3D), whereas it decreased the transit rate in the small intestine of both controls and mutants (Fig.3.3E). In the colon, glass bead expulsion assays revealed that the antibiotic treatment impacted transit time in opposite directions depending of mouse genotype. Indeed, while exposure to antibiotics accelerated the average transit time by 2.5-fold (from 18.8 ± 2.4 min to 7.5 ± 0.8 min) in WT males, the same treatment delayed the average transit time by 2.6-fold (from 25.8 ± 7.0 min to 66.6 ± 15.3 min) in *TashT^{Tg/Tg}* males (Fig.3.3F). These data thus suggest that the *TashT^{Tg/Tg}*-specific

delay of total GI transit time in response to antibiotic treatment is due to impaired transit in both the small intestine and the colon. On the other hand, the apparently normal total GI transit time in antibiotics-treated WT males can be explained by compensation of the impaired transit in the small intestine by accelerated transit in the colon.

Therefore, all of our observations strongly suggest that antibiotics-induced dysbiosis accelerates the development of male-specific chronic constipation in surviving *TashT^{Tg/Tg}* animals, a phenotype that is otherwise only evident in adults (Toure *et al.*, 2016). Yet, our data also indicate that antibiotics-induced dysbiosis may have a positive effect around weaning age, by somehow delaying the development of “typical” megacolon with all of the associated hallmarks including premature death.

3.4.4 Impact of antibiotics-induced dysbiosis on the density and composition of the myenteric plexus in *TashT^{Tg/Tg}* male pups

In an effort to understand how antibiotics-induced dysbiosis specifically impacts colonic motility in *TashT^{Tg/Tg}* males, we examined the myenteric plexus at P22-23 (i.e. the age at which death by megacolon mostly occurs in untreated *TashT^{Tg/Tg}* males) and at P30-36 (i.e. the age at which premature onset of chronic constipation was detected in *TashT^{Tg/Tg}* males). For each time point, we analyzed the mid-distal colon (mid-DC) region expected to correspond to the intermediate zone and two control regions (duodenum and ileum), focusing on parameters that were previously shown to be affected by the *TashT* mutation (i.e. decreased neuronal density and neuronal subtype imbalance characterized by an increased proportion of nitrergic neurons) (Bergeron *et al.*, 2015; Toure *et al.*, 2016).

Consistent with our previous observations, untreated *TashT^{Tg/Tg}* males display a decreased neuronal density (by about 50% on average) and an increased proportion of nitrergic neurons (by about 35% on average) in comparison to untreated controls (Figs.3.4, 3.5 and S3.8A-B). These defects were observed at P22-23 (Fig.3.4) and P30-36 (Fig.3.5), being restricted to the mid-DC region. Interestingly, both of these defects were also found to be specifically modulated by antibiotics-induced dysbiosis. While neuronal density in the small intestine of P30-36 mice tends to be increased in a genotype-independent manner upon antibiotic treatment (Fig.3.5A), the converse was observed in the mid-DC of *TashT^{Tg/Tg}* males, resulting in a further 50% decrease (Fig.3.5A and S3.8A) that seems to spread over the whole colon (Fig.S3.9A). Intriguingly, a biphasic response was observed for the proportion of nitrergic neurons, with the antibiotic treatment leading to either a decrease back to normal levels at P22-23 (Fig.3.4B) or a further 34% increase at P30-36 (Figs.3.5B and S3.8B). As observed for the neuronal density, this *TashT^{Tg/Tg}*-specific supplemental increase of nitrergic neurons upon antibiotic treatment appears not to be restricted to the most distal innervated segment but instead seems to propagate over the whole colon (Fig.S3.9B). Importantly, we further discovered that the increased proportion of nitrergic neurons in the mid-DC appears to be accompanied by a decreased proportion of cholinergic neurons in the adjacent proximal-DC (Figs.3.6A and S3.8C). However, we also found that the proportion of cholinergic neurons is not robustly correlated with the proportion of nitrergic neurons in the same animal (Fig.3.6B), suggesting that other neuronal subtypes might also be affected. That being said, other key parameters of the myenteric plexus previously reported not to be affected by the *TashT* mutation (i.e. the proportion of Calretinin⁺ neurons, the neuron-glia ratio and the density of interstitial cells of Cajal) were all found to remain unaffected by the antibiotic treatment (Fig.S3.10).

Without excluding the possibility that other unknown contributing factors might also be involved, our results thus suggest that exacerbation of both of the previously reported ENS defects in adult *TashT^{Tg/Tg}* males (i.e. decreased neuronal density and

increased proportion of nitrergic neurons) could be responsible of the premature onset of chronic constipation. In support of this idea, it is also noteworthy that robust correlations were detected between both parameters and fecal retention, regardless of experimental conditions (Fig.3.7). Moreover, the apparent normalization of the proportion of nitrergic neurons at P22-23 while neuronal density remains low suggests a role for this specific neuronal subtype in preventing the onset of typical megacolon.

3.4.5 Impact of NO signaling inhibition on dysbiosis-induced fecal retention and life expectancy of *TashT^{Tg/Tg}* male mice

To determine the importance of the specific increased proportion of nitrergic neurons relative to any other potential contributing factors in the dysbiosis-induced premature onset of chronic constipation, we locally reduced colonic NO signaling in antibiotic-treated *TashT^{Tg/Tg}* males by administering L-NAME through rectal enemas for 7 days starting at P26. Interestingly, we found that exposure to this widely used nitric oxide synthase (NOS) inhibitor had a tendency to attenuate the severity of fecal retention in the colon of P33 animals in comparison to control water enemas (Fig.3.8A-B). Based on this observation and the fact that the proportion of nitrergic neurons is also increased in P22-23 *TashT^{Tg/Tg}* male mice not exposed to antibiotics (Fig.3.4B), we next asked whether L-NAME might have therapeutic value for megacolon under normal conditions as well. To answer this question, enemas containing either L-NAME or vehicle only were administered to *TashT^{Tg/Tg}* male pups for a maximum of 7 days, starting as soon as symptoms of megacolon were detected from P20 onwards. These symptoms included growth delay, general weakness and a hunched posture. The impact of L-NAME administration on survival of megacolon-suffering *TashT^{Tg/Tg}* mice was then evaluated for a maximum of 3 weeks post-treatment. Remarkably, L-NAME appeared more potent than water at preventing death of *TashT^{Tg/Tg}* mice under these

experimental conditions (Fig.3.8C). Although these results should be interpreted with caution because of small sample size, our data collectively suggest that the increased proportion of nitrergic neurons play an important role in the colonic dysmotility of *TashT^{Tg/Tg}* mice regardless of the presence or the absence of antibiotic treatment.

3.5 Discussion

Taking advantage of a unique mouse model that displays either male-biased megacolon at weaning age (Bergeron *et al.*, 2015) or male-specific chronic constipation in surviving adults (Toure *et al.*, 2016), we show here that antibiotics-induced dysbiosis can influence the severity of two genetically-induced ENS defects (i.e. decreased neuronal density and neuronal subtype imbalance notably characterized by an increased proportion of nitrergic neurons). The lack of impact on the global incidence of megacolon in *TashT^{Tg/Tg}* males appears to be due to a somehow protective effect around weaning age that is counterbalanced by premature onset of severe constipation later on. We observed that dysbiosis leads to a stage-dependent (post-weaning) aggravation of reduced neuronal density in the colon and a biphasic modulation of the increased proportion of nitrergic neurons, which is normalized around weaning age and then further increased later on. Importantly, all of these effects were found to be specific to *TashT^{Tg/Tg}* animals, being undetectable in WT mice. Moreover, we discovered that a local decrease of NO signaling in *TashT^{Tg/Tg}* animals can improve colonic motility and prevent death by megacolon, thereby suggesting that the nature of the transition zone is an important contributor to HSCR pathogenesis.

3.5.1 A common microbiome signature independent of bowel obstruction in HSCR?

Besides our main objective of evaluating the impact of antibiotics-induced dysbiosis on megacolon incidence, we also wanted to determine whether *TashT^{Tg/Tg}* animals are comparable to other HSCR mouse models in terms of basal microbiota composition. Our data revealed a large degree of overlap between the microbiome profiles of *TashT^{Tg/Tg}* and *Holstein^{Tg/Tg}* mice, with both profiles significantly differing from the WT microbiome profile. At the phylum level, this dysbiotic profile was mainly characterized by a robust increase of *Proteobacteria* at the expense of *Firmicutes*. Given that a similar taxonomic profile was previously reported in a third genetically distinct HSCR mouse model (*Ednrb*-null) (Pierre *et al.*, 2014; Ward, N. L. *et al.*, 2012), it is tempting to speculate that this particular profile might form the basis of a common microbiome signature for HSCR. Testing this possibility in human patients will clearly be challenging since information about the gut microbiota aside from HAEC is currently very limited in the context of HSCR (Neuvonen *et al.*, 2018). Moreover, many HSCR patients must take antibiotics in order to prevent or treat HAEC, and antibiotic treatments can alter microbiota composition in the exact same way that is observed in HSCR mouse models (Korpela *et al.*, 2016).

Interestingly, the dysbiotic signature described above was also noted in *TashT^{Tg/Tg}* mice without megacolon, indicating that bowel obstruction has a very limited impact on causing dysbiosis in comparison to pre-existing ENS defects. Further highlighting a prominent role for ENS defects in this regard, a similar dysbiotic signature was even observed in mice with conditional inactivation of *choline acetyltransferase* (*ChAT*) in the ENS, independently of altered transit (Johnson *et al.*, 2018). Therefore, our findings not only strengthen the notion that the ENS is key for sculpting the microbiota (Rolig *et al.*, 2017), but also indicate that common changes to the gut microbiota can be induced by ENS defects of different genetic origin.

3.5.2 Prolonged course of antibiotics in early life periods impacts both the ENS and bowel motility

In addition to serve as control group in our study, antibiotic-treated WT animals also allowed us to evaluate the impact of prolonged antibiotic treatments on the normally developing ENS. Surprisingly, although antibiotics are widely prescribed in the pediatric human population, information about their impact on ENS architecture and associated bowel motility parameters is very scarce. While the impact of a complete absence of gut microbiota (such as in germ-free mice) on early postnatal development of the ENS has been documented (Collins *et al.*, 2014), our study is the first – to the best of our knowledge – to similarly evaluate the impact of antibiotics-induced dysbiosis on the early postnatal ENS. Others recently addressed this question using a 2-week course of antibiotics on older WT juvenile mice (3 ± 1 weeks of age at beginning of treatment), focusing their analysis on the ileum (Caputi *et al.*, 2017). This work notably revealed delayed proximal GI transit as well as changes in the ileal ENS characterized by a decrease of neuronal density accompanied by neuronal subtype imbalance consisting of a slightly decreased proportion of neuronal (n)NOS⁺ neurons and an increased proportion of substance P⁺ neurons (Caputi *et al.*, 2017). While our proximal GI motility data (Fig.3.3E) are in agreement with this study, this is not the case for the associated ENS defects as we instead observed a slight increase of neuronal density and an unchanged proportion of nNOS⁺ neurons (Figs. 3.4-3.5). Given that the same cocktail of antibiotics was used in both studies, these differences suggest that timing of antibiotic treatment may have completely different impacts on the ENS. This differential response of the ENS might potentially be due to different dysbiotic profiles but, unfortunately, this question cannot currently be addressed since the microbiome was not profiled in the study with juvenile mice (Caputi *et al.*, 2017). All these observations call for further work in this regard, and suggest that analyses of the impact of antibiotic treatment on ENS structure and function should systematically be done in conjunction with an analysis of the gut microbiota.

3.5.3 Antibiotic treatment in the context of HSCR

HAEC is a severe pre- and/or post-operative life-threatening complication of HSCR, still responsible for a high number of HSCR-associated deaths (Frykman et Short, 2012; Gosain et Brinkman, 2015). HAEC must be treated with broad-spectrum antibiotics and usage of a cocktail similar to what we used is not rare (Frykman et Short, 2012). The possibility that HAEC is a major cause of death in the *Ednrb*-null HSCR mouse model has been tested using an antibiotic treatment very similar to ours in terms of both timing (starting at pre-natal stages) and composition (cocktail of broad-spectrum antibiotics) (Cheng, Z. *et al.*, 2010). Interestingly, although this treatment did not prevent death of these animals, it did delay the average age of death by several days as we observed for *TashT^{Tg/Tg}* male pups (Fig.3.3A). As our data strongly suggest that this temporal shift may be explained by dysbiosis-induced changes to the structure and composition of the ENS, it would be especially important to analyze the ENS and microbiota of *Ednrb*-null mice exposed to antibiotics. Since one of the impacts that we observed is the worsening of genetically-induced ENS defects, similar studies should be done on as much HSCR mouse models as possible in order to define global and/or specific rules. Such knowledge could in turn be used to eventually adapt current antibiotic treatments as a function of their impact on the microbiota and the ENS in different genetic contexts.

3.5.4 Contribution of the transition zone to the megacolon phenotype: implication for HSCR

Standard treatment of HSCR involves the resection of the aganglionic segment and reconnection of the most distal innervated region to the anus. Long term motility problems are often present after this surgery (Rintala et Pakarinen, 2012), and

characterization of different HSCR mouse models strongly suggests that this is due to the structure and/or composition of the most distal ENS (Musser *et al.*, 2015; Ro *et al.*, 2006; Roberts *et al.*, 2008; Shen *et al.*, 2002; Toure *et al.*, 2016). The current study now suggests that, when distal aganglionosis is not extensive, this distal ENS might also play a key role in HSCR pathogenesis *per se*. Indeed, our analysis of megacolon-suffering *TashT^{Tg/Tg}* male mice notably revealed an important contribution for increased NO signaling, as highlighted by the fact that L-NAME treatments can promote their survival (Fig.3.8C). Since the proportion of nitrergic neurons in these mice can be modulated by antibiotics-induced dysbiosis in a temporal manner (Figs.3.4-3.5), our work calls for detailed characterization of the distal ENS as a function of age and exposure to antibiotics not only in HSCR mouse models but also in human HSCR patients. Indeed, given that the proportion of nitrergic neurons is increased in HSCR patients as well (Cheng, L. S. *et al.*, 2016), this could have a direct influence on how these patients are being taken care of.

3.6 Materials and methods

3.6.1 Animals

All experiments were performed according to the guidelines of the Canadian Council on Animal Care (CCAC) and approved by the relevant institutional committee (*Comité institutionnel de protection des animaux*; CIPA reference #899) of University of Quebec at Montreal (UQAM). Euthanasia was performed via CO₂ inhalation following isoflurane anesthesia. All mice used in this study, including *TashT^{Tg/Tg}* (Bergeron *et al.*, 2015; Toure *et al.*, 2016) and *Holstein^{Tg/Tg}* (Soret *et al.*, 2015) mutants, were of the same genetic background (FVB/N). These mice were housed in the same room of UQAM's animal facility under a 12h/12h light/dark cycle, with *ad libitum* access to water and standard chow pellets. Breeding couples were separated upon detection of a

vaginal plug, and pups were left with their mothers until weaning at P28. Weaned siblings of the same sex were then housed at 3 to 4 per cage.

For antibiotic treatment, 10-day pregnant mice were exposed to a previously described cocktail of broad-spectrum antibiotics (Kabouridis *et al.*, 2015) sweetened with sucrose (or sucrose alone as control) in their drinking water until weaning of their pups. The same procedure was used for newly weaned pups until reaching P36. The cocktail included 0.5 mg.ml⁻¹ Vancomycin hydrochloride (V200-25, GoldBio), 0.5 mg.ml⁻¹ Neomycin Trisulfate (400-150 XG, Multicell), 1 mg.ml⁻¹ Ampicillin Sodium Salt (AB0028, BioBasic), 1 mg.ml⁻¹ Metronidazole (M3761-25G, Sigma) and 10 mg.ml⁻¹ Sucrose (57-50-1, Amresco), and was refreshed every 48 hours. Bodyweight of control and antibiotic-treated pups was assessed in the morning at P1, P7, P14, P21 and P28, using a high precision digital scale (Kilotech KHA5001).

To locally reduced NO signaling in the colon of antibiotics-treated or megacolon-suffering *TashT^{Tg/Tg}* male pups, 200 µl rectal enemas containing 2 µg.µl⁻¹ L-NAME (NG-nitro-L-arginine-methyl ester hydrochloride; N5751-1G, Sigma) or vehicle only (H₂O) were given once a day during 7 days, starting either at P26 (for antibiotics-treated animals) or upon the detection of symptoms of aganglionic megacolon (growth delay, general weakness and hunched posture) (Bergeron *et al.*, 2015).

3.6.2 Sampling and quantification of fecal bacteria

To profile the basal microbiome of *TashT^{Tg/Tg}*, *Holstein^{Tg/Tg}* and WT mice, the fecal matter of single P21-22 pups (each coming from a different cross) was collected from dissected colons (without the cecum) and immediately transferred into sterile tubes. For all other analyses, mice were individually placed in sterile partitioned cages for at

least 1 hour until a sufficient amount of stool was present (between 5-10 fecal pellets). Fecal pellets were then collected for each mouse and pooled into a sterile tube. For P14 pups, feces from up to 3 animals were pooled to obtain enough material for subsequent analysis. Every recovered fecal sample was stored at -80° C until analysis.

The concentration of bacteria in stools was quantified by slightly modifying a previously described protocol (Lee *et al.*, 2010). Briefly, thawed stool samples were weighed and solubilized at a concentration of 10 mg/ml in counting buffer (10 mg.ml⁻¹ bovine serum albumin and 0.2 g.l⁻¹ NaN₃ in PBS). After overnight incubation at 4°C, samples were homogenized and transferred on ice for 1 hour to allow sedimentation of large fiber pieces. A 1:400 dilution of the supernatant was then prepared in counting buffer and filtered through a 40 µm cell strainer (Fisherbrand, cat. No. 22363547). Bacteria were fluorescently labeled by adding SYTO-13 (Molecular Probes, cat. No. S7575) at 5µM final concentration and, after 10 min of incubation in the dark at room temperature, an additional 1:100 dilution was made in sterile water before analysis on a BD Accuri C6 cytometer (Becton Dickinson Canada, Mississauga, ON) to count the number of bacteria within a 5 min timeframe. The concentration of bacteria was then calculated as a function of final volume and dilution factor, and expressed in bacteria per µl of stool homogenate.

3.6.3 Amplicon sequencing and bioinformatics

Extraction of bacterial DNA was performed using the QIAamp® Fast DNA Stool Mini Kit (QIAGEN Cat. No. 51604). A total of 26 (2 Forward and 24 Reverse) barcoded primers (Laforest-Lapointe *et al.*, 2016; Laforest-Lapointe *et al.*, 2017) were then used to amplify the V5-V6 region of the *16S* rRNA gene using the Feldan PCR kit (Bio Basic Inc) and 100 ng of DNA per sample (final volume of 25 µl). PCR conditions

consisted of an initial denaturation step of 2 min at 95°C, followed by 35 cycles of 30 s at 95 °C, 30 s at 64 °C and 30 s at 72 °C, and completed by a final extension of 5 minutes at 72°C. PCR reactions also included two negative controls: a water blank with a Forward/Reverse primer pair, and 100 ng of DNA from sample number 1 with only a Forward primer (Table S3.1). To confirm the efficiency of PCR reactions, 5 µl of each sample was visualized on a 2% agarose gel. DNA content from the remaining 20 µl was normalized using the Invitrogen Sequelprep PCR Cleanup and Normalization Kit, and pooled at equal concentrations (0.8ng/µl). Sequencing was performed on an Illumina MiSeq sequencer as previously described (Laforest-Lapointe *et al.*, 2016; Laforest-Lapointe *et al.*, 2017).

Raw sequences were paired and processed using the MOTHUR pipeline (Schloss *et al.*, 2009). Sequences with low quality scores (<30), long homopolymers, ambiguous bases and abnormal length were removed from the dataset. The UCHIME algorithm (Edgar *et al.*, 2011) was used to remove chimeras. Sequences within a 97% identity threshold were binned into Operational Taxonomic Units (OTUs) and OTUs with a single read (singletons) were removed. Taxonomic classification of the sequences was performed with the BLAST algorithm (Altschul *et al.*, 1990) and the Greengenes database (DeSantis *et al.*, 2006) implemented in the MOTHUR pipeline. Biom files consisting of OTUs abundance tables and metadata (McDonald *et al.*, 2012) were generated, and the BIOM package (McDonald *et al.*, 2012) was then used to import biom files into R (statistical et computing. R Foundation for Statistical Computing) for subsequently exporting taxa abundance tables in CSV format. Pie charts to display the distribution per phyla or order were prepared with Microsoft Excel while all other graphs were prepared with R.

3.6.4 Tissue preparation and immunofluorescence

Tissue were processed as previously described (Toure *et al.*, 2016). Muscle strips (containing the myenteric plexus between both the longitudinal and the circular muscle layers) from the duodenum, ileum and/or colon were either labeled immediately or store at 4 °C in PBS for up to 1 month until subsequent labeling. The position of bowel sub-regions used in this study is indicated where relevant in figures and/or figure legends.

For immunolabeling, muscle strips from relevant bowel segment were incubated 2 hours at room temperature in blocking solution (10% fetal bovine serum, 0.66% Triton-X100 in PBS), and then incubated overnight at 4°C with different combination of primary antibodies (HuC/D;Calretinin;nNOS, HuC/D;Calretinin, HuC/D;nNOS, HuC/D;ChAT, HuC/D;S100 β , Tuj1;S100 β or c-Kit;Tuj1). Tissues were subsequently washed in blocking solution and incubated with relevant secondary antibodies for 2 hours at room temperature. All antibodies were diluted in blocking solution. Dilution factors and other antibody details are shown in Table S3.2. Transverse sections (150 μ m) of distal ileum previously doubly labeled with anti-Tuj1 and anti-S100 β were prepared using a vibrating blade microtome (Microm HM650V, Thermo Scientific) as previously described (Coutaud et Pilon, 2013).

Confocal images (4 μ m-thick stacks) of immunolabeled tissues were captured on a Nikon A1 confocal unit (run with the NIS-Element AR4 software). The number of HuC/D⁺, Calretinin⁺, nNOS⁺, ChAT⁺ and S100 β ⁺ cells in myenteric ganglion from the duodenum, ileum, proximal-mid colon (MC), proximal-distal colon (DC) and/or mid-DC was counted (using the Image J cell counter manual function) in five random fields of view (0.3923 mm²) captured with a 20X objective (Plan Fluor, Multi Immersion, NA 0.75, Nikon). A similar approach was used to count interganglionic c-Kit⁺ interstitial cells of Cajal (ICCs) from the proximal-DC in five random fields of view

(0.0449 mm²) captured with a 60X objective (Plan Apo, Oil, NA 1.4, Nikon). For each bowel segment, the total number of myenteric HuC/D⁺ neurons or c-Kit⁺ ICCs contained in the five fields of view were determined and expressed in cells per mm² of longitudinal surface area. The proportion of Calretinin⁺, nNOS⁺ and ChAT⁺ neurons as well as the HuC/D⁺:S100 β ⁺ neuron:glia ratio in myenteric ganglia were evaluated by normalizing the total number of Calretinin⁺, nNOS⁺ or ChAT⁺ cells to that of HuC/D⁺ neurons, and the total number of S100 β ⁺ cells to the sum of HuC/D⁺ and S100 β ⁺ cells, respectively.

3.6.5 Gastrointestinal (GI) motility assays

GI motility parameters were evaluated using carmine red dye gavage (for total GI transit time and proximal GI transit rate) or the bead expulsion assay (for distal colonic transit time) as previously described (Toure *et al.*, 2016).

3.6.6 Statistical analysis

Data are presented as the mean $\pm$ standard deviation with the number (n) of biological replicates included in figures and/or figure legends. Where relevant, *P* values were determined using the One-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey's Multiple comparison of means (95% family-wise confidence level) post hoc test, with the exception of Fig.6A, Fig.2A and Fig. S7B (Unpaired two-tailed Student's *t*-test), Fig.3A (Mantel-Cox test) and Figs.3C, 8A (Chi-square test), and 0.05 was used as significance cut-off value.

Acknowledgements

The authors thank Denis Flipo (UQAM) for assistance with confocal imaging and flow cytometry analysis, Dr Maria Carolina Garcia Chaves (UQAM) for assistance with SYTO 13 labeling of bacteria, Dr Rodolphe Soret for assistance with bioinformatics analysis of amplicon sequence data, and all the other members of the Pilon lab for thoughtful discussions about the manuscript. This work was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR #MOP-26037) to NP. AMT was supported by a PhD scholarship from the *Fonds de la recherche du Québec - Nature et technologies* (FRQNT) and the *Programme Formation des Formateurs* (PFF) from Bamako University. SK holds the Canada Research Chair in Plant Microbiomes. NP is a *Fonds de la Recherche du Québec - Santé* (FRQS) Senior Research Scholar and the recipient of the UQAM Research Chair on Rare Genetic Diseases. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Disclosure: No conflict of interests exists.

Data availability: All materials, data and associated protocols will be made promptly available to readers

Author contribution

Conceived and supervised the study: NP. Designed the experiments: AMT and NP. Performed the experiments: AMT, OS and ML. Collected, analyzed and interpreted data: AMT, OS, ML, SK and NP. Wrote the manuscript: AMT and NP. Revised the manuscript: AMT, ML, SK and NP.

3.7 Figures

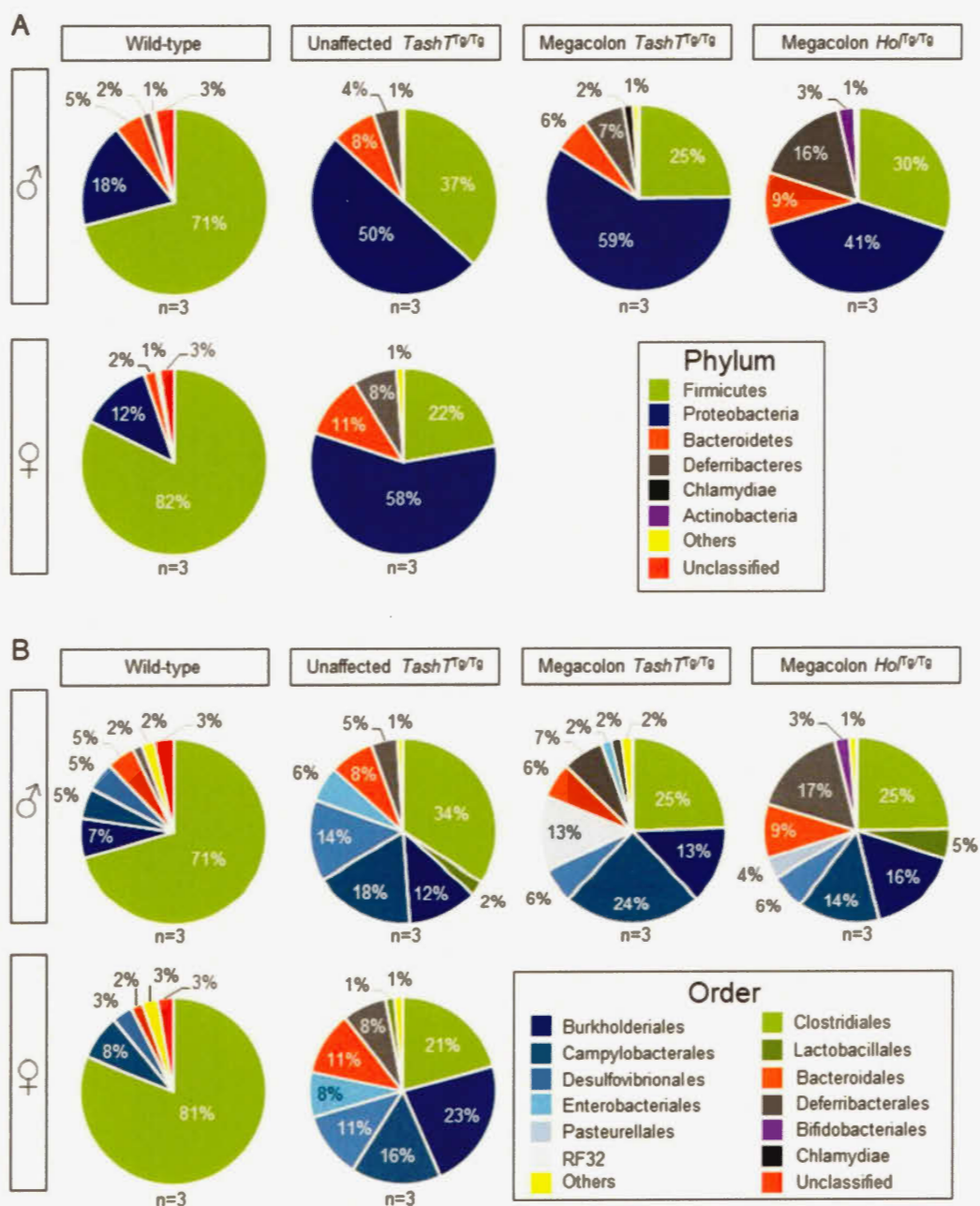


Figure 3.1 Basal bacterial composition of colonic content from wild-type, *TashT^{Tg/Tg}* (with or without megacolon) and *HolsteinT^{Tg/Tg}* mice at P21-22.

(A, B) The pie charts display the relative average abundance of *16S* rRNA gene sequences at the phylum (A) and order (B) levels. Taxonomic groups are color-coded and indicated on the bottom right side of each panel. “Others” and “Unclassified” stand for the sum of low-abundance (<1.5%) taxa or yet unknown taxa, respectively.

Figure 3.2 Antibiotics-induced dysbiosis in wild-type and *TashT^{Tg/Tg}* mice at P28-30.

(A) Flow cytometry-based quantitative analysis of SYTO 13-labeled bacteria in stool homogenates prepared from antibiotics-treated (Abx) mice in comparison to untreated (Ctl) mice at P14, P21 and P28. At each stage, antibiotics-induced reduction of the average concentration of bacteria per μl of stool homogenate (red numbers on the left of each panel) was determined and expressed as percentage difference (red numbers at the bottom of lower panels) of the average bacterial concentration in untreated mice. A blank solution without bacteria (negative control) was used for gating purposes. (B) Profile of bacteria extracted from stool pellets of P28-30 WT and *TashT^{Tg/Tg}* males exposed or not to antibiotics in their drinking water, which was sweetened with sucrose. The pie charts display the relative average abundance of 16S rRNA gene sequences at the phylum and order levels. Taxonomic groups are color-coded and indicated at the bottom of each panel. “Others” and “Unclassified” stand for the sum of low-abundance (<1.5%) taxa or yet unknown taxa, respectively. (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; Student’s *t*-test)

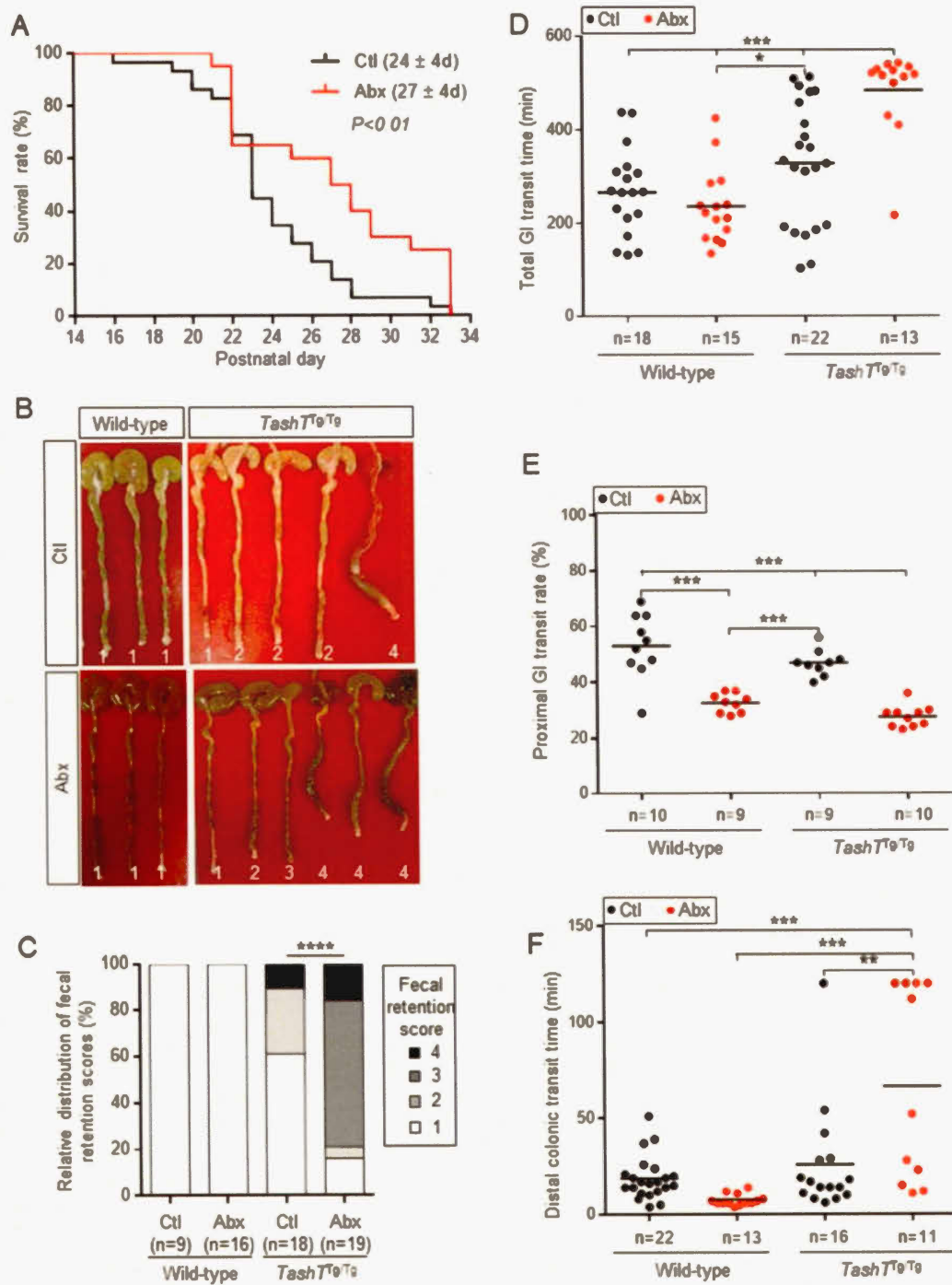


Figure 3.3 Antibiotics-induced dysbiosis specifically impacts survival and motility parameters of *TashT^{flg/flg}* male mice.

(A) Kaplan-Meier curve showing the age of death of megacolon-suffering *TashT^{flg/flg}* male mice exposed (Abx) or not (Ctl) to antibiotics (n= 29 for Ctl group and 20 for Abx group). Average age of death is indicated between parentheses. (B) Representative images of whole colons from P33-36 WT or *TashT^{flg/flg}* male mice treated (Abx) or not (Ctl) with antibiotics. Numbers are arbitrary units assigned by someone who was blinded to experimental conditions and genotypes in order to grade fecal retention severity: 1-Well-separated pellets as observed in the colon of WT mice; 2-Presence of compacted feces of any consistence restricted to the most distal third of the colon; 3-Presence of compacted feces of any consistence in the most distal third of the colon and beyond; 4-Megacolon-like phenotype characterized by distal obstruction and proximal distention. (C) Relative distribution of fecal retention scores within each mouse group, using the arbitrary units described in B. (D-F) GI motility parameters in WT and *TashT^{flg/flg}* male mice exposed (Abx) or not (Ctl) to antibiotics. Total GI transit (D) was evaluated by the time (minutes) required for expelling the first red pellet following oral gavage with carmine red dye. Of note, mice for which this amount of time was ≥ 480 minutes (8 hours) are those that did not expel red pellets at the end of the manipulation. Proximal GI transit (E) was evaluated by the distance travelled by the carmine red dye 15 min after gavage and expressed in percentage of the total length of the small intestine. Distal colonic transit (F) was evaluated using the bead latency assay and expressed in time (minutes) required to expel the bead. Distal colonic transit time was capped to 120 minutes (2 hours) in order to simplify the graph without altering statistical significances. (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$; Mantel-Cox test in A, Chi-square test in C, and one-way ANOVA with Tukey's post hoc test in D-F)

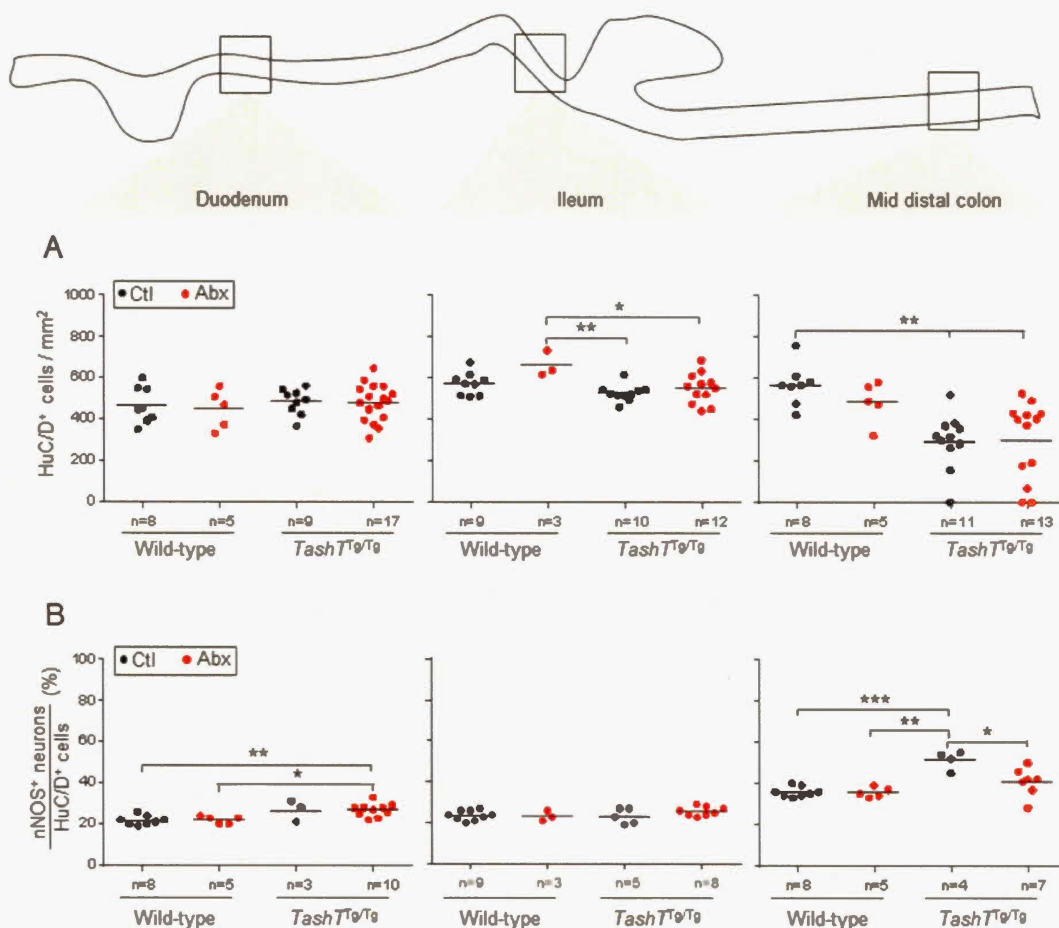


Figure 3.4 Impact of antibiotics-induced dysbiosis on neuronal density and proportion of nitrergic neurons in the myenteric plexus of wild-type and *TashTg/Tg* male mice at P22-23.

(A) Neuronal density was evaluated via immunofluorescence labeling of the pan-neuronal marker HuC/D and is expressed as the number of neurons per mm² of longitudinal surface area. (B) The proportion of nitrergic (nNOS⁺) neurons was evaluated by double-immunofluorescence labeling and is expressed as the percentage of nitrergic neurons among the total number of neurons. (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; one-way ANOVA with Tukey's post hoc test)

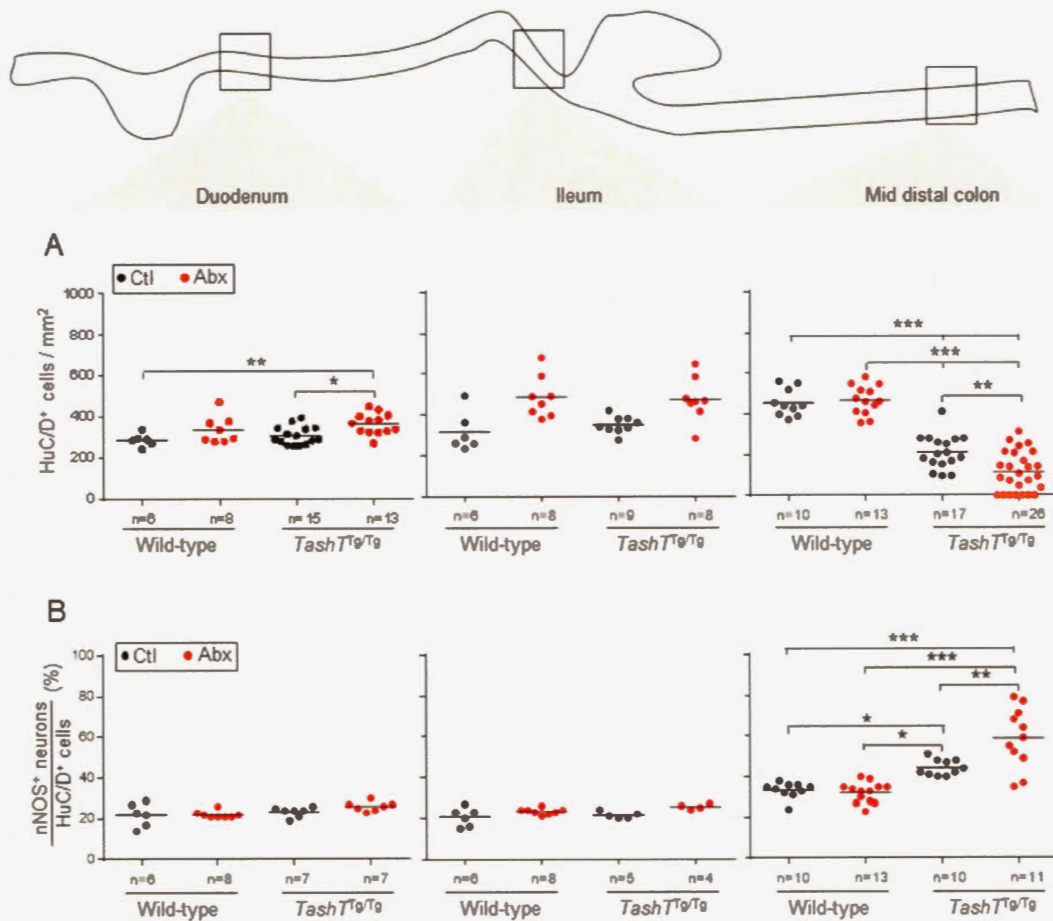


Figure 3.5 Impact of antibiotics-induced dysbiosis on neuronal density and proportion of nitrergic neurons in the myenteric plexus of wild-type and *TashTg/Tg* male mice at P30-36.

(A) Neuronal density was evaluated via immunofluorescence labeling of the pan-neuronal marker HuC/D and is expressed as the number of neurons per mm² of longitudinal surface area. (B) The proportion of nitrergic (nNOS⁺) neurons was evaluated by double-immunofluorescence labeling and is expressed as the percentage of nitrergic neurons among the total number of neurons. (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; one-way ANOVA with Tukey's post hoc test)

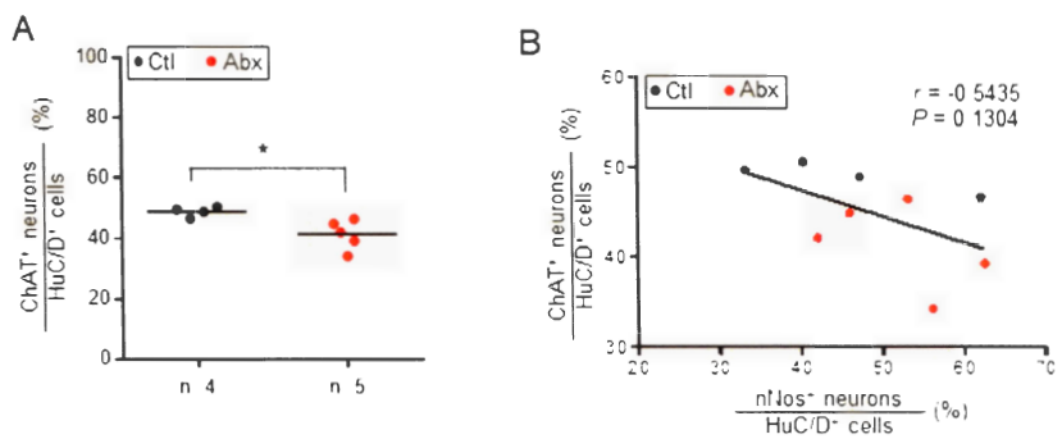


Figure 3.6 Impact of antibiotics-induced dysbiosis on the proportion of cholinergic neurons in the myenteric plexus of *TashT^{Tg}Tg* male mice at P30-36.

(A) The proportion of cholinergic (ChAT⁺) neurons was evaluated in the proximal-DC by double-immunofluorescence labeling and is expressed as the percentage of cholinergic neurons among the total number of neurons. (B) Correlation between the proportion of cholinergic neurons in the proximal-DC and the proportion of nitrergic neurons in the adjacent mid-DC. (* $P < 0.05$; Student's *t*-test)

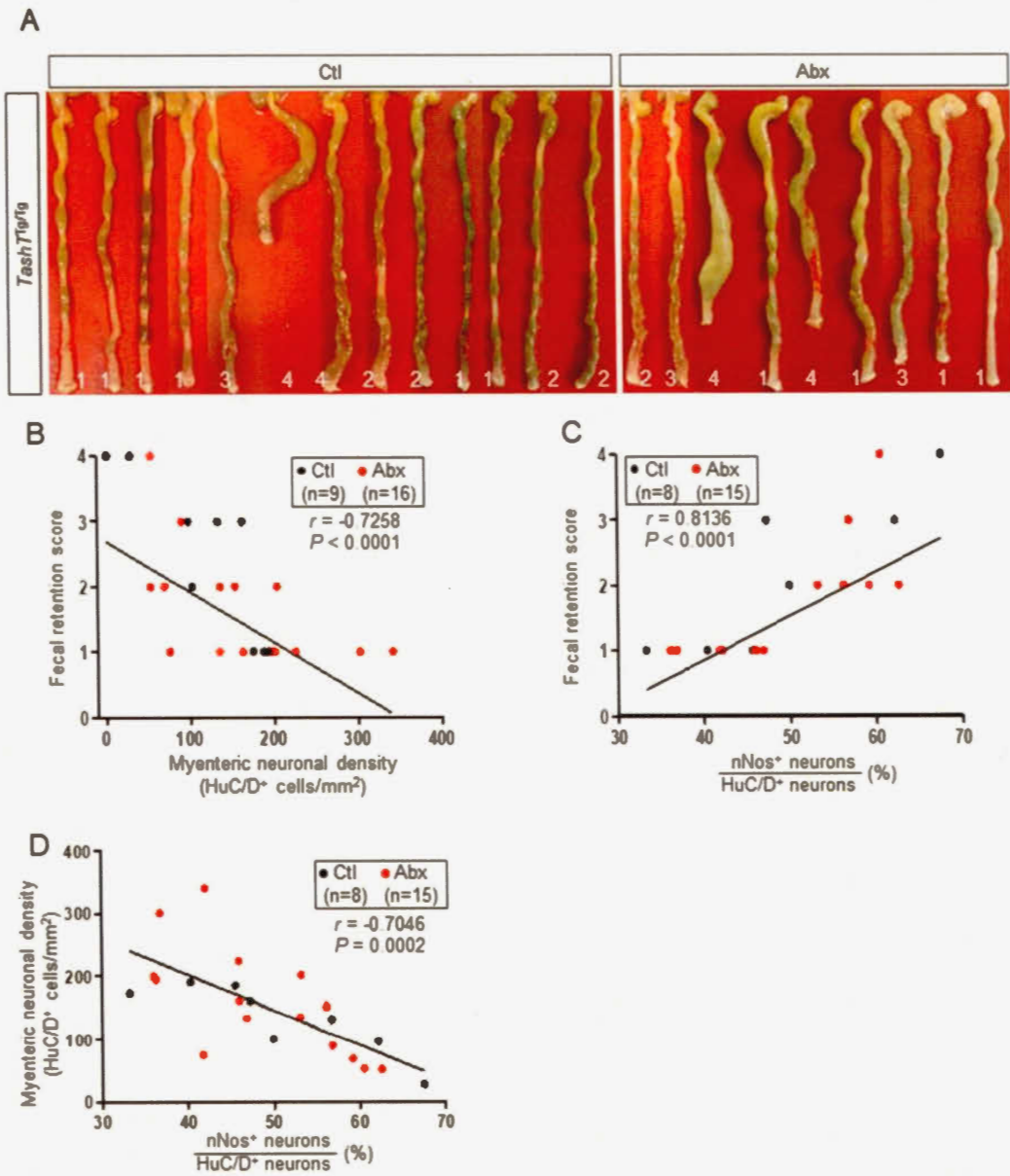


Figure 3.7 Correlations between neuronal density, increased proportion of nitrergic neurons and fecal retention in *TashT^{Tg}/Tg* male mice at P30-36.

(A) Picture of all *TashT^{Tg}/Tg* colons used for correlation analyses in B-D, along with their respective fecal retention score (numbers at the bottom). For each group, samples were randomly selected to ensure that the full spectrum of fecal retention scores was covered. (B) Correlation between fecal retention and neuronal density in the myenteric plexus of mid-DC. (C) Correlation between fecal retention and proportion of nitrergic neurons in the myenteric plexus of mid-DC. (D) Correlation between neuronal density and proportion of nitrergic neurons in the myenteric plexus of mid-DC.

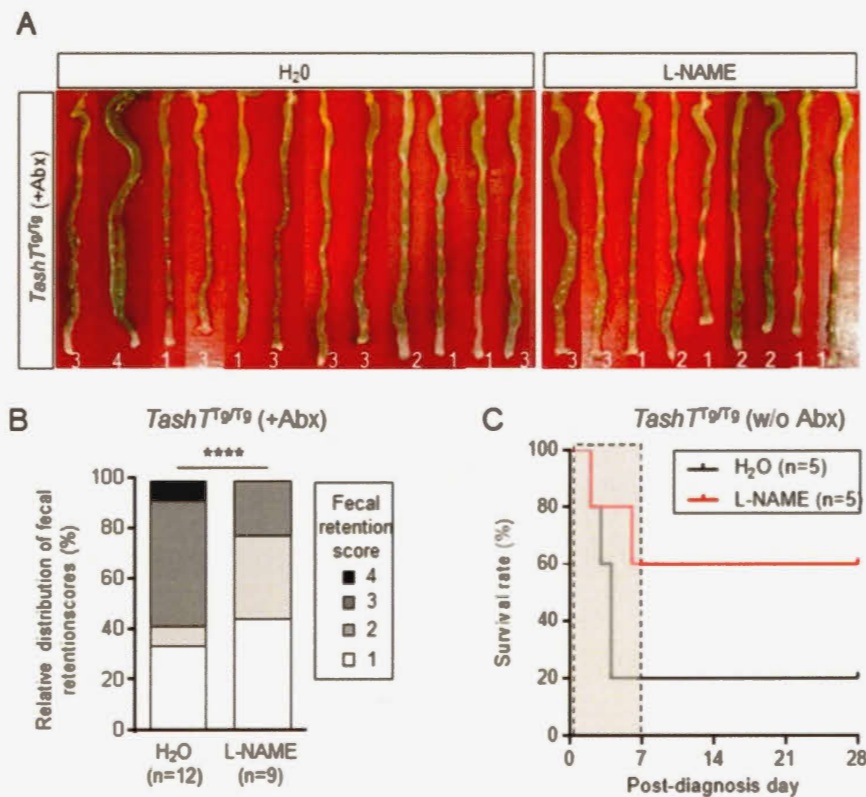


Figure 3.8 Impact of inhibition of NO signaling on fecal retention and life expectancy of *TashT^g/T^g* male mice exposed or not to antibiotics.

(A) Picture of all antibiotics-treated *TashT^g/T^g* colons used for the quantitative analysis in B, along with their respective fecal retention score (numbers at the bottom). (B) Quantitative analyses of fecal retention (using the arbitrary units described in Fig.3B-C) in P33 *TashT^g/T^g* male mice exposed to antibiotics and subjected to daily rectal enemas with L-NAME or vehicle (H₂O) for 7 days starting at P26. (C) Kaplan-Meier curve showing the survival rate of megacolon-suffering P20-29 *TashT^g/T^g* male mice not exposed to antibiotics but subjected to daily rectal enemas with L-NAME or vehicle (H₂O) for a maximum of 7 days (delineated by the grey box) starting on the day where megacolon symptoms were detected. Animal survival was then evaluated over another 3-week period, for a maximum total of 28 days post-diagnosis. (**** $P < 0.0001$; Chi-square test)

Supplemental Figures

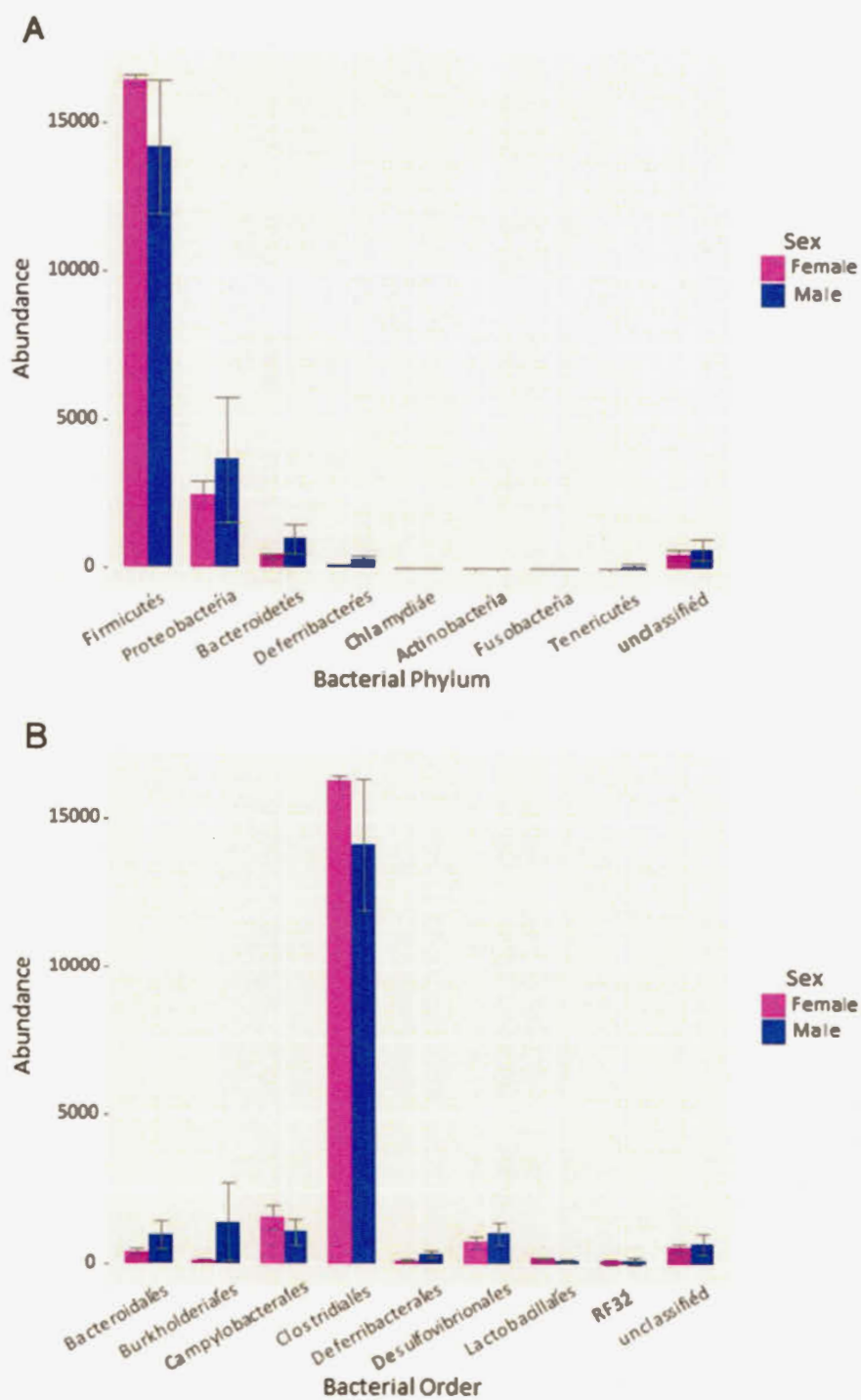


Figure S3.1 Sex-stratified analysis of colonic bacterial composition in wild-type mice at P21-22.
(A, B) The bar histograms display the relative average abundance of *16S* rRNA gene sequences at the phylum (A) and order (B) levels. “Unclassified” stands for the sum of yet unknown taxa.

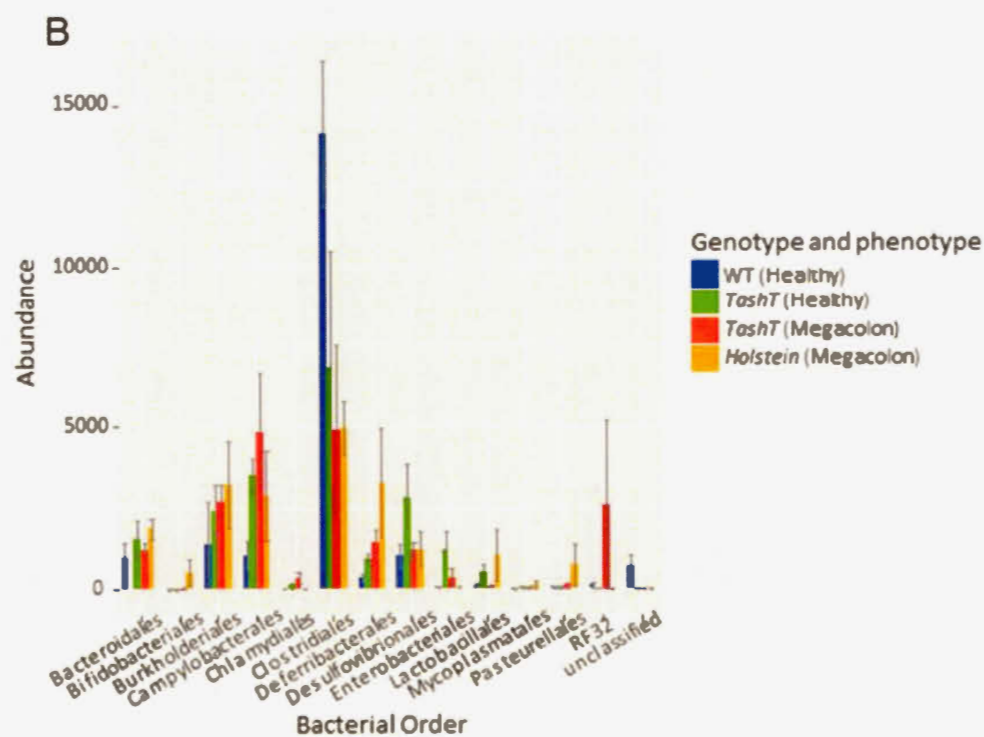
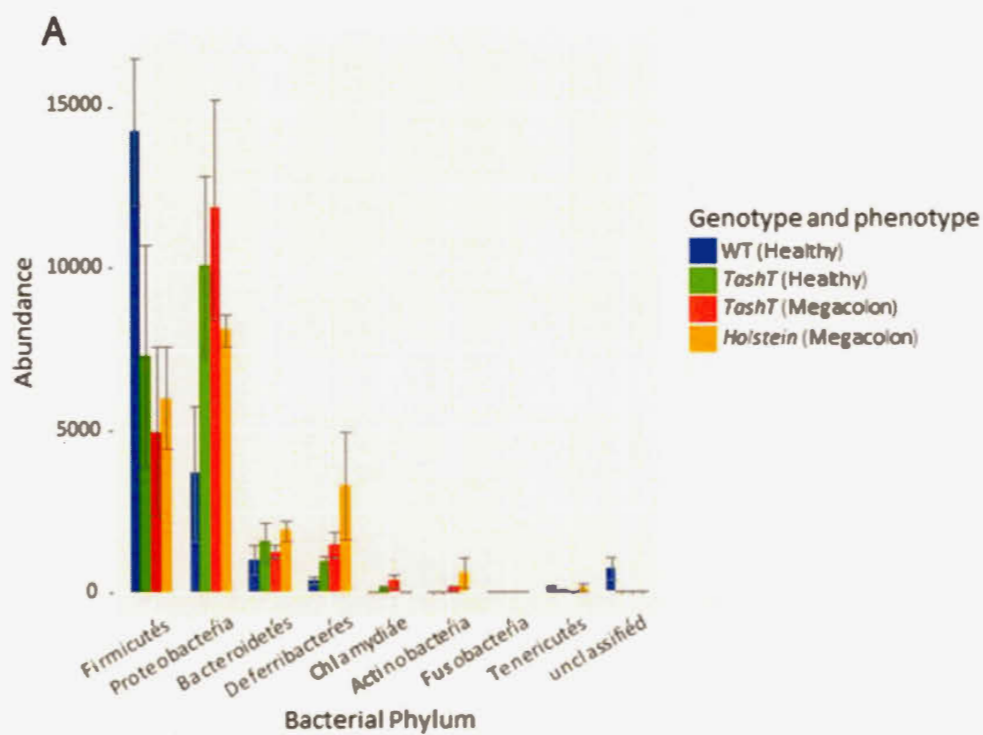


Figure S3.2 Genotype- and phenotype-stratified analysis of colonic bacterial composition in wild-type, *TashT*^{Tg/Tg} and *Holstein*^{Tg/Tg} male mice at P21-22.

(A, B) The bar histograms display the relative average abundance of 16S rRNA gene sequences at the phylum (A) and order (B) levels. “Unclassified” stands for the sum of yet unknown taxa.

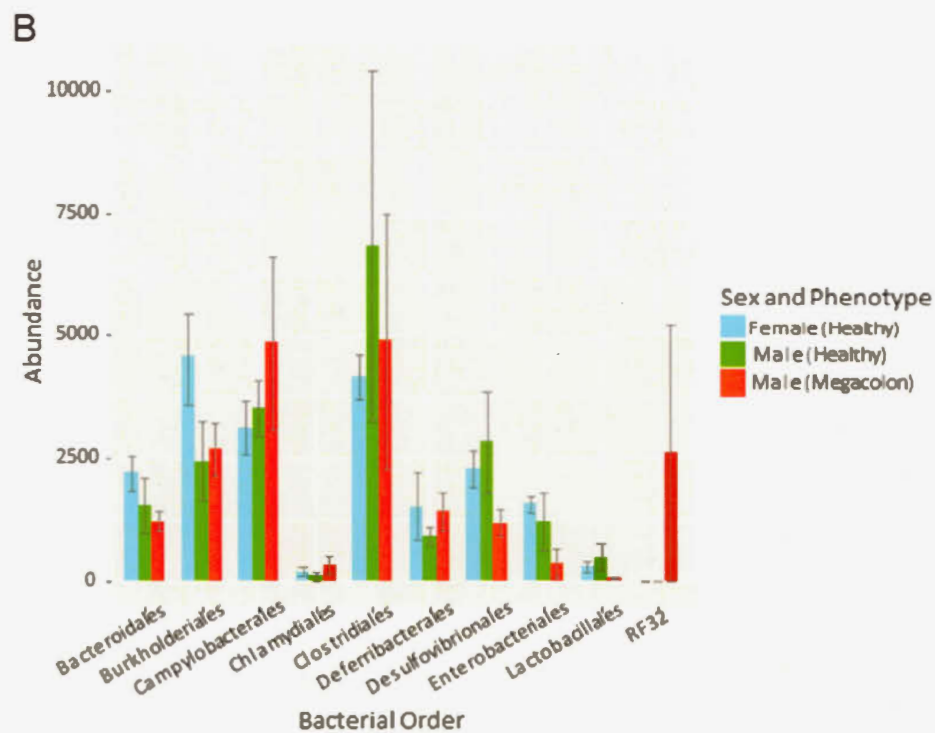
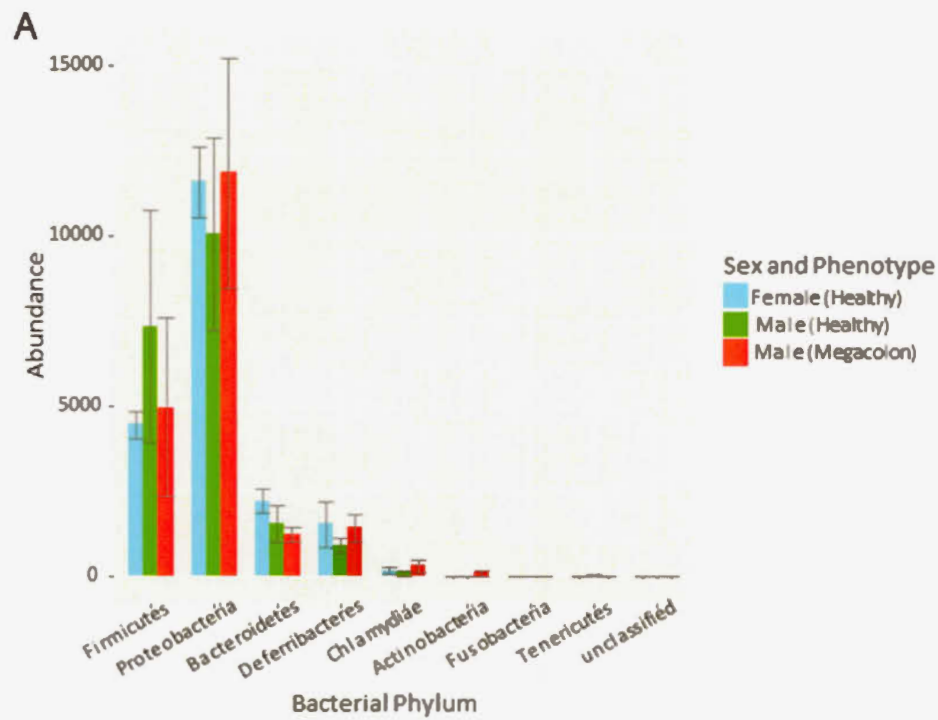
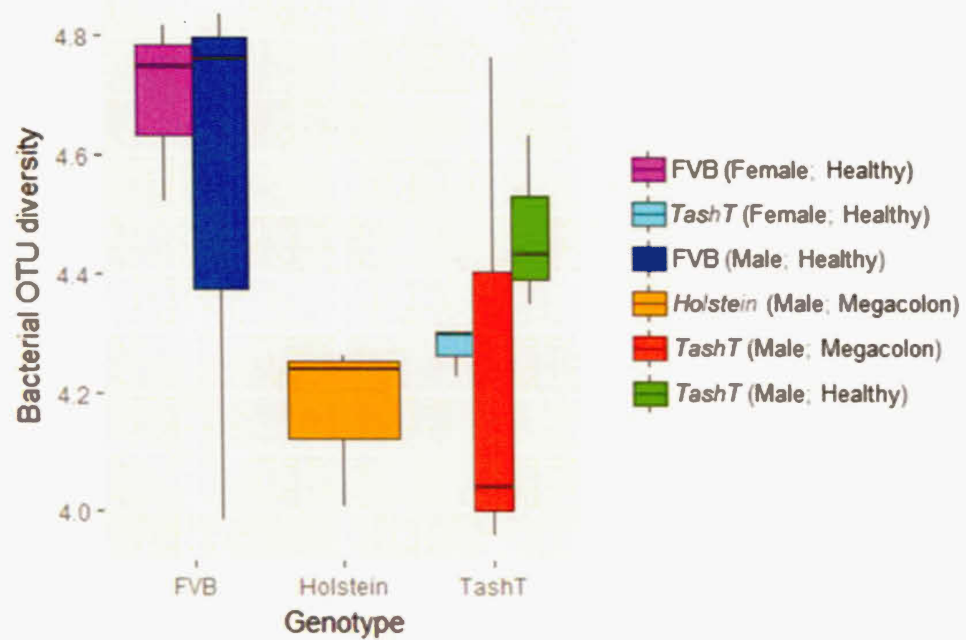


Figure S3.3 Sex- and phenotype-stratified analysis of colonic bacterial composition in *TashT*^{Tg/Tg} mice at P21-22.

(A, B) The bar histograms display the relative average abundance of 16S rRNA gene sequences at the phylum (A) and order (B) levels. “Unclassified” stands for the sum of yet unknown taxa.

A



B

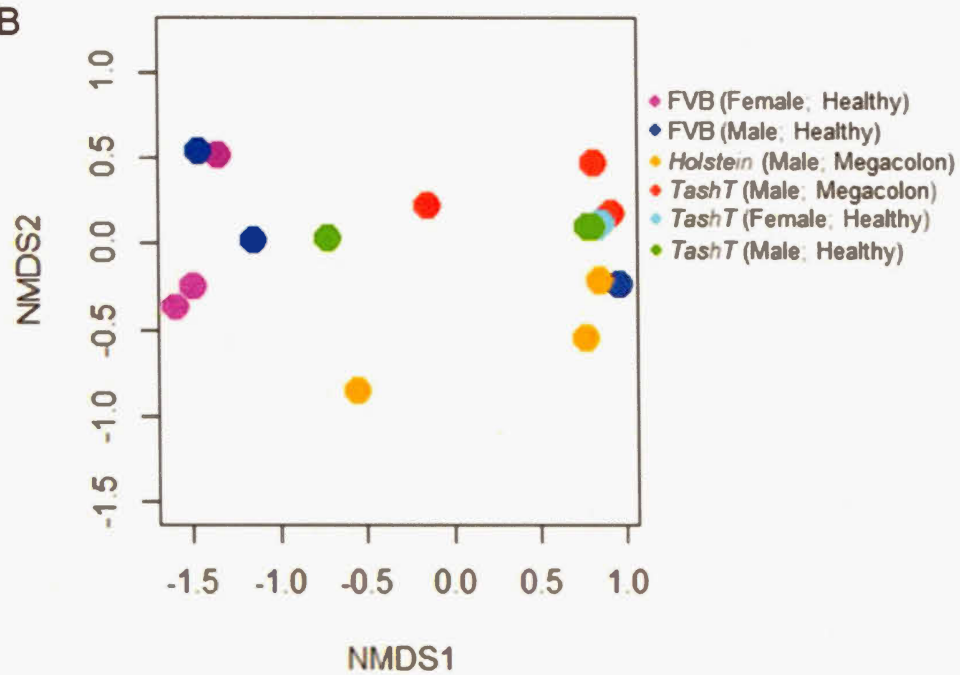


Figure S3.4 Alpha- and beta-diversity comparisons of gut microbiomes of wild-type and megacolon mouse lines at P21-22.

(A) Alpha diversity based on Shannon diversity of OTU relative abundances. (B) Beta diversity based on non-metric multidimensional scaling (NMDS) of Bray-Curtis dissimilarity of OTU relative abundances among samples.

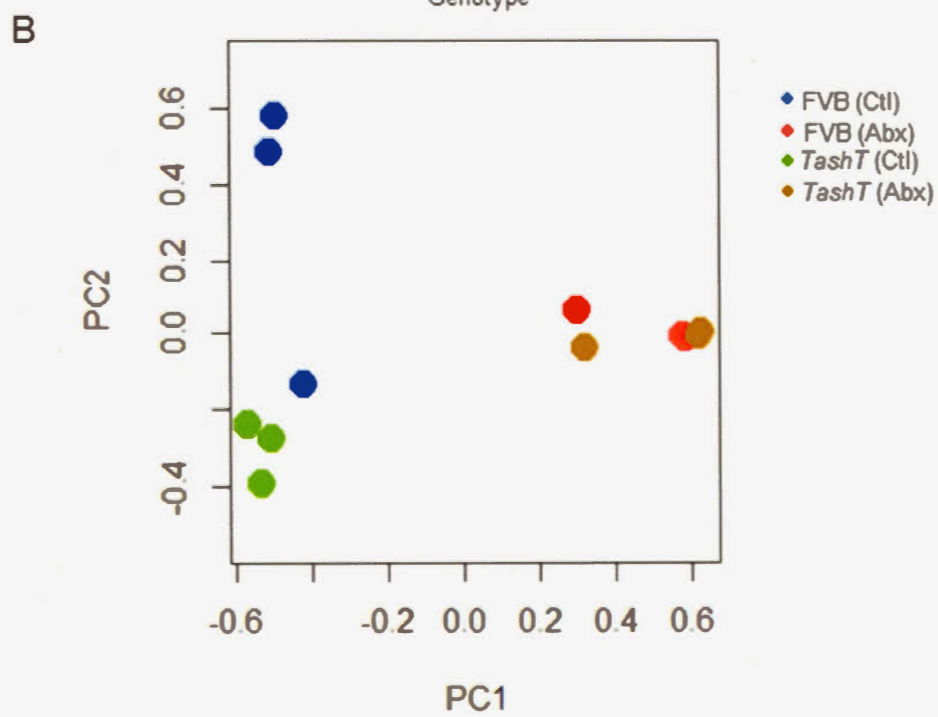
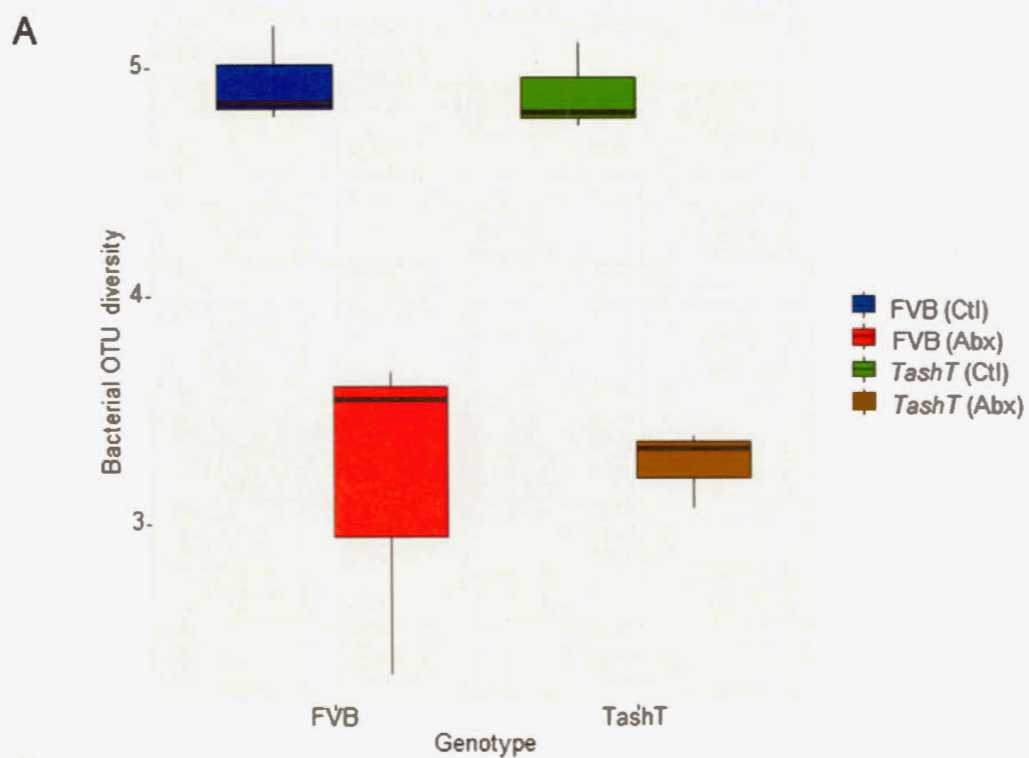
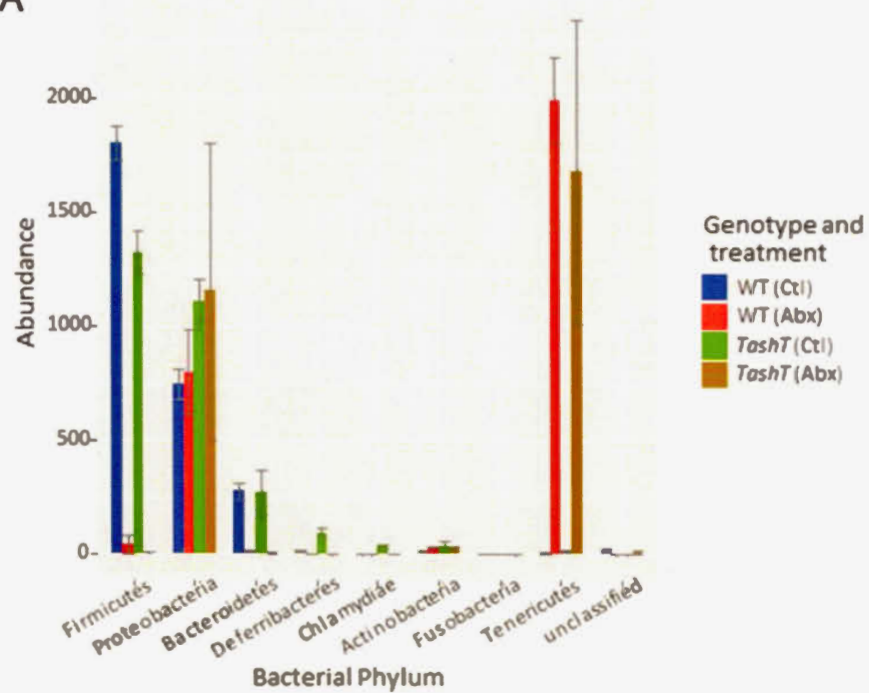


Figure S3.5 Alpha- and beta-diversity comparisons of gut microbiomes of wild-type and *TashT*^{Tg/Tg} P28-30 mice exposed or not to antibiotics.

(A) Alpha diversity based on Shannon diversity of OTU relative abundances. (B) Beta diversity based on principal components (PC) analysis of Hellinger transformed OTU relative abundances among samples.

A



B

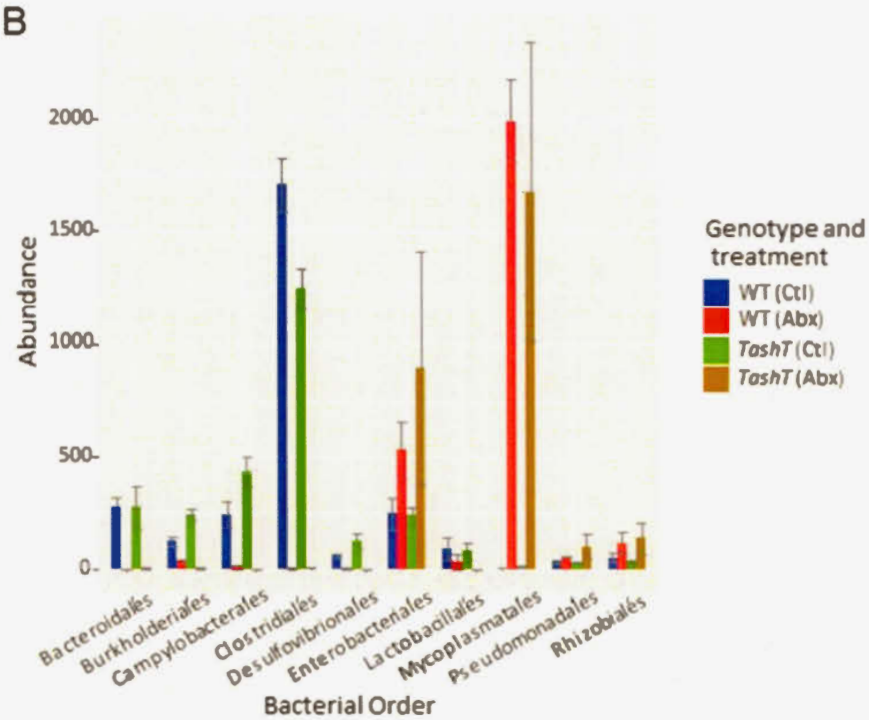


Figure S3.6 Genotype-stratified analysis of colonic bacterial composition as a function of antibiotic treatment in WT and *TashT*^{Tg/Tg} mice at P28-30.

(A, B) The bar histograms display the relative average abundance of 16S rRNA gene sequences at the phylum (A) and order (B) levels. “Unclassified” stands for the sum of yet unknown taxa.

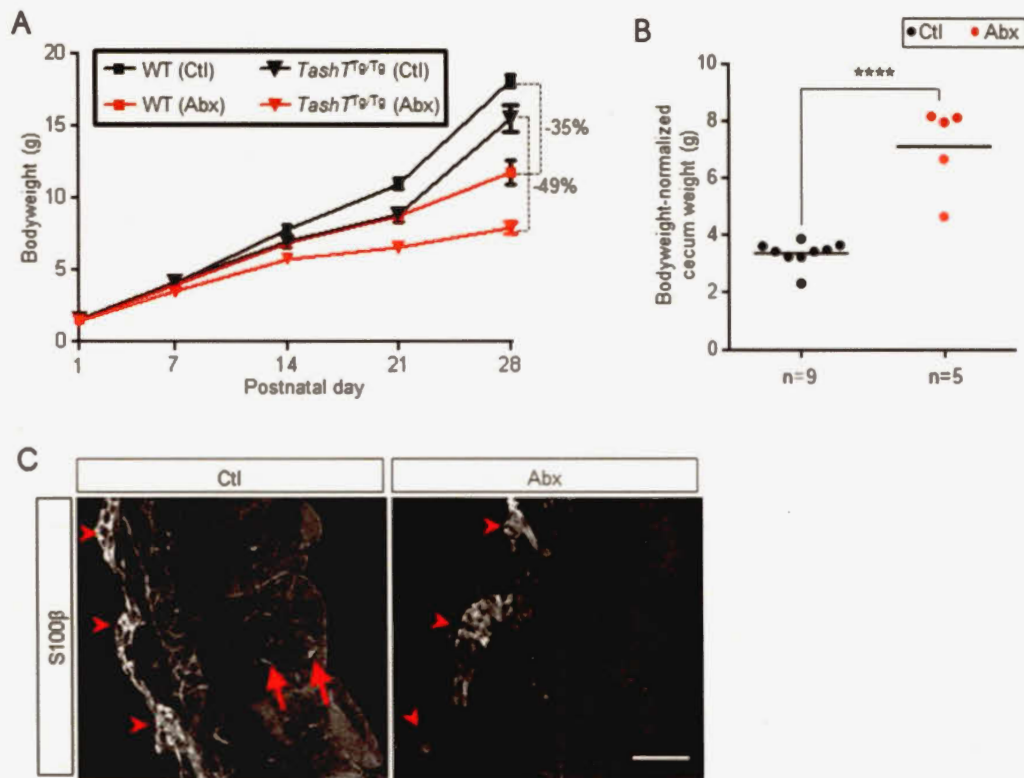


Figure S3.7 Impact of antibiotic treatment on bodyweight, cecum size and mucosal glia. (A-B) Exposure to antibiotics causes progressive growth retardation (A) as well as an enlarged cecum (B; shown here is data for P30-36 animals) in both wild-type and *TashT^g/T^g* mice. (C) Representative confocal images of enteric glial cells labeled with anti-S100β showing the specific depletion of mucosal glia (arrows) in the distal ileum of antibiotics-treated P30-36 mice, while myenteric glia (arrowheads) are not affected. Scale bar, 100μm. (**** $P < 0.0001$; Student's *t*-test)

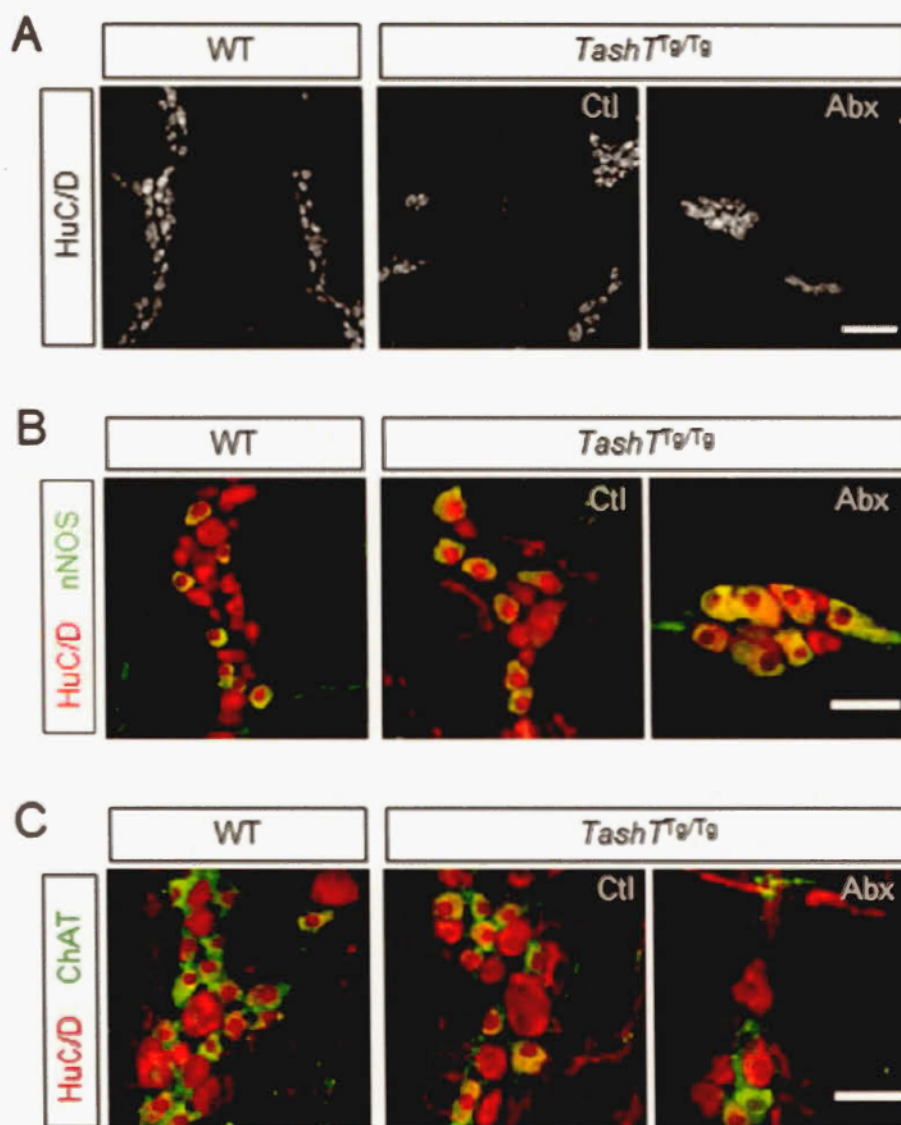


Figure S3.8 Representative images of the quantification of neuronal density and proportion of nitrergic and cholinergic neurons.

(A-C) Confocal images of myenteric neurons labeled with anti-HuC/D only (A), or in combination with anti-nNOS (B) or anti-ChAT (C), in the distal colon of P30-36 WT or *Tash^{Tg/Tg}* males exposed (Abx) or not (Ctl) to antibiotics. Scale bar, 100 μ m (A) and 50 μ m (B, C).

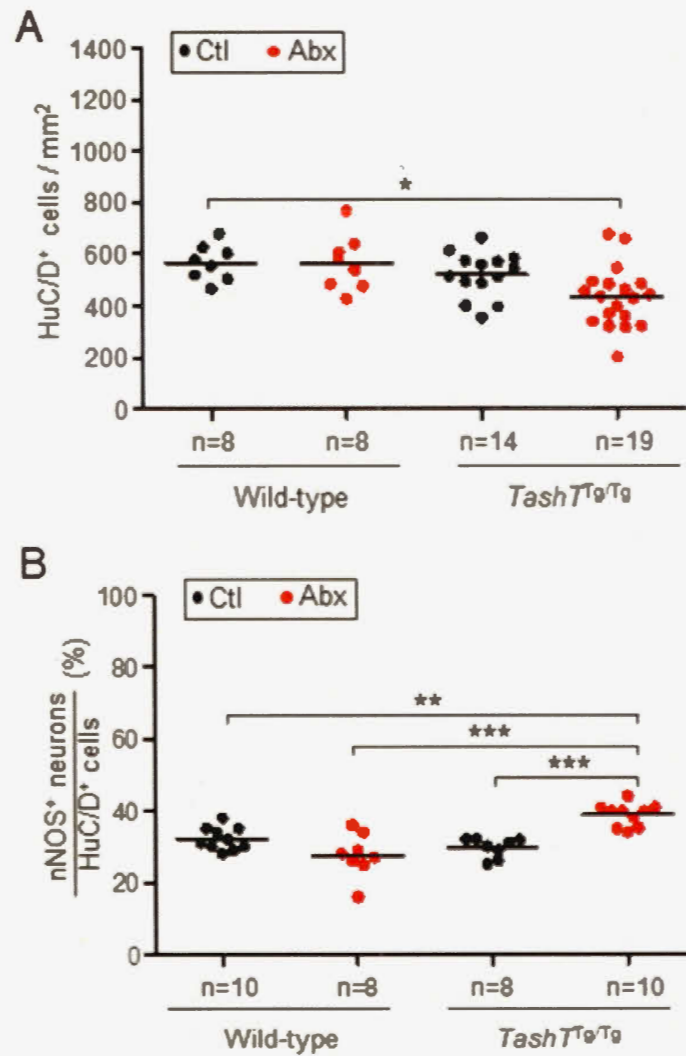


Figure S3.9 Impact of antibiotics-induced dysbiosis on myenteric neuronal density and proportion of nitrergic neurons in the mid-colon of P30-36 wild-type and *TashT^g/T^g* male mice.

(A) Neuronal density was evaluated via immunofluorescence labeling of the pan-neuronal marker HuC/D and is expressed as the number of neurons per mm² of longitudinal surface area. (B) The proportion of nitrergic (nNOS⁺) neurons was evaluated by double-immunofluorescence labeling and is expressed as the percentage of nitrergic neurons among the total number of neurons. (* $p < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $p < 0.001$; one-way ANOVA)

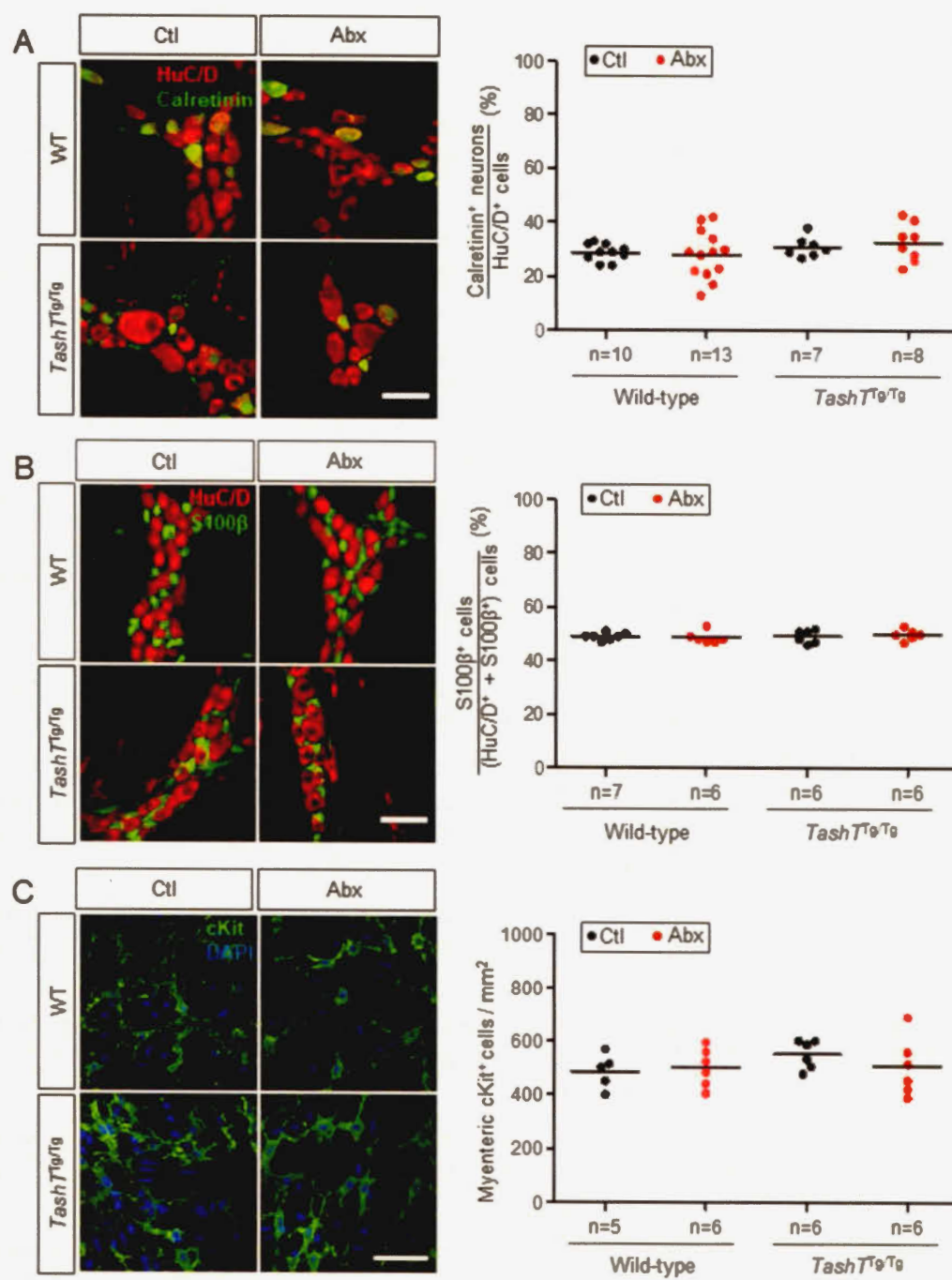


Figure S3.10 Proportion of myenteric Calretinin⁺ neurons, neuron: glia ratio and number of interstitial cells of Cajal in the distal colon of P30-36 wild-type and *TashT*^{Tg/Tg} male mice exposed or not to antibiotics.

(A-C) Representative confocal images of myenteric ganglia (A-B) or myenteric interstitial cells of Cajal (C) labeled with the indicated antibodies, and with their associated quantifications shown on the right. The proportion of Calretinin⁺ neurons (A), neuron: glia ratio (B) and number of interstitial cells of Cajal all remain unaffected by genotype and exposition to antibiotics. Scale bar, 50μm.

3.8 Supplemental tables

Table S3.1 Information on samples used for amplicon sequencing analysis of the gut microbiota

Sample information					Treatment	
Number	Genotype	Sex	Age	Megacolon	Sucrose	Antibiotics
1	Wild-type	Male	P28	-	+	-
2	Wild-type	Male	P28	-	+	-
3	Wild-type	Male	P28	-	+	-
4	Wild-type	Male	P28	-	-	+
5	Wild-type	Male	P28	-	-	+
6	Wild-type	Male	P28	-	-	+
7	<i>TashT^{Tg/Tg}</i>	Male	P28	-	+	-
8	<i>TashT^{Tg/Tg}</i>	Male	P28	-	+	-
9	<i>TashT^{Tg/Tg}</i>	Male	P28	-	+	-
10	<i>TashT^{Tg/Tg}</i>	Male	P30	-	-	+
11	<i>TashT^{Tg/Tg}</i>	Male	P30	-	-	+
12	<i>TashT^{Tg/Tg}</i>	Male	P30	-	-	+
13	Wild-type	Male	P22	-	-	-
14	Wild-type	Male	P22	-	-	-
15	Wild-type	Male	P21	-	-	-
16	Wild-type	Female	P22	-	-	-
17	Wild-type	Female	P22	-	-	-
18	Wild-type	Female	P21	-	-	-
19	<i>TashT^{Tg/Tg}</i>	Male	P22	-	-	-

20	<i>TashT^{Tg/Tg}</i>	Male	P22	-	-	-
21	<i>TashT^{Tg/Tg}</i>	Male	P22	-	-	-
22	<i>TashT^{Tg/Tg}</i>	Female	P22	-	-	-
23	<i>TashT^{Tg/Tg}</i>	Female	P22	-	-	-
24	<i>TashT^{Tg/Tg}</i>	Female	P22	-	-	-
25	<i>TashT^{Tg/Tg}</i>	Male	P22	+	-	-
26	<i>TashT^{Tg/Tg}</i>	Male	P22	+	-	-
27	<i>TashT^{Tg/Tg}</i>	Male	P22	+	-	-
28	<i>Hol^{Tg/Tg}</i>	Male	P22)	+	-	-
29	<i>Hol^{Tg/Tg}</i>	Male	P22	+	-	-
30	<i>Hol^{Tg/Tg}</i>	Male	P22	+	-	-
Control	Water blank	-	-	-	-	-
Control	sample #1 DNA + F*	-	-	-	-	-

* A forward primer

Table S3.2 List of primary and secondary antibodies used in this study

Antibody	Dilution	Host species	RRID number	Source
Anti-HuC/D	1 :500	Mouse	AB_2314656	Molecular Probes, A-21271
Anti-Calretinin	1 :500	Goat	AB_10000342	Swant, CG1
Anti-nNOS	1 :1000	Rabbit	AB_91824	Millipore, AB5380
Anti-S100 β	1 :500	Rabbit	AB_10013383	DakoCytomation, Z0311
Anti-cKit	1 :500	Goat	AB_354750	Cederlane (Canada), AF1356
Anti- β III Tubulin (Tuj1)	1 :200	Mouse	AB_2256751	Abcam, ab78078
Anti-Mouse Alexa Fluor 647	1 :500	Donkey	AB_2340862	Jackson Immuno Research, 715-605-150
Anti-Rabbit Alexa Fluor 594	1 :500	Donkey	AB_2340621	Jackson Immuno Research, 711-585-152
Anti-Goat Alexa Fluor 594	1 :500	Bovine	AB_2340884	Jackson Immuno Research, 805-585-180
Anti-Goat Alexa Fluor 488	1 :500	Bovine	AB_2340883	Jackson ImmunoResearch, 805-545-180

CHAPITRE IV

THE *TASHT* LOCUS GENETICALLY INTERACTS WITH OTHER HIRSCHSPRUNG DISEASE-ASSOCIATED LOCI

Le travail de ce chapitre sera prochainement le sujet d'un article présentement en préparation.

Contribution des auteurs : Aboubacrine Mahamane TOURÉ (Design des expériences, dissections des animaux, coloration des tissus pour des analyses histologiques, analyses statistiques, interprétation des résultats, recherche bibliographique et rédaction du manuscrit). Nicolas PILON (Supervision des expérimentations).

NOTE : Les références de l'article sont incluses dans la bibliographie générale.

4.1 Résumé

Contexte : La variabilité phénotypique et le biais mâle généralement observés chez les patients atteints de la maladie de Hirschsprung (HSCR) indiquent l'existence et l'effet des gènes/loci modificateurs sur les mutations individuelles à l'origine de la maladie. Selon les résultats des études de génétique moléculaire humaine, ces gènes/loci modificateurs incluent, en plus des séquences codantes, des séquences non-codantes. Cependant, à ce jour les études visant à comprendre le rôle et/ou le mode d'action des mutations non-codantes dans la pathogénèse de HSCR sont manquantes. Pour commencer à combler cette lacune, nous avons tiré avantage des souris transgéniques *TashT*, *Holstein* et *Spot* – qui sont respectivement des modèles pour HSCR et le syndrome de Waardenburg type 4 – chez lesquelles le mégacôlon aganglionnaire résulte exclusivement des mutations non-codantes à l'état homozygote.

Méthodes : Des croisements visant à générer des souris double mutantes ont été réalisés. L'incidence du mégacôlon a été évaluée. La structure du plexus myentérique colique a été analysée à l'issue de la coloration de l'activité de l'acétylcholinestérase. L'étendue de l'innervation du côlon a été évaluée et corrélée avec le phénotype de mégacôlon.

Résultats clés : Les souris simple hétérozygotes *TashT*^{Tg/+}, *Hol*^{Tg/+} et *Spot*^{Tg/+} ne montrent aucune forme d'aganglionose colique. Cependant, une importante sous-population des souris double hétérozygotes *TashT*^{Tg/+}; *Spot*^{Tg/+} développent le mégacôlon aganglionnaire vers l'âge du sevrage. De plus, l'ajout d'un allèle *Holstein* sur le background *TashT*^{Tg/Tg} (*TashT*^{Tg/Tg}; *Hol*^{Tg/+}) augmente drastiquement l'incidence du mégacôlon de même que la sévérité de l'aganglionose colique chez les animaux *TashT*^{Tg/Tg}.

Conclusions et impacts : Les interactions génétiques entre les loci *TashT* et *Spot* ou *Holstein* augmentent la prévalence du mégacôlon et/ou la gravité du phénotype entérique chez les souris double mutantes. La caractérisation cellulaire et moléculaire de ces interactions pourrait aider à comprendre le mode d'action des mutations non-codantes dans la pathogénèse de HSCR.

Mots-clés : Maladie de Hirschsprung ; Mégacôlon aganglionnaire ; Aganglionose colique ; Modèles de souris ; Loci modificateurs ; Séquences codantes ; Séquences non-codantes ; Interactions génétiques.

Manuscrit

The *TashT* locus genetically interacts with other Hirschsprung disease-associated loci

Aboubacrine Mahamane Touré^{1,2,3} and Nicolas Pilon^{1,2 *}

¹ Département des Sciences Biologiques, Université du Québec à Montréal, Montréal H3C 3P8, Québec, Canada.

² Centre d'Excellence en Recherche sur les Maladies Orphelines – Fondation Courtois (CERMO-FC), Université du Québec à Montréal, Montréal H2X 3Y7, Québec, Canada.

³ Département d'Enseignement et de Recherche de Biologie de la Faculté des Sciences et Techniques de l'Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako, Badalabougou, Colline de Badala, Bamako, Mali.

* Correspondence to: Nicolas Pilon (pilon.nicolas@uqam.ca)

Key-words: Hirschsprung disease; Aganglionic megacolon; Colonic aganglionosis; Mouse models; Modifier loci; Coding sequences; Non-coding sequences; Genetic interactions.

Abbreviations: ChAT, choline acetyl transferase; DC, distal colon; ENS, enteric nervous system; HSCR, Hirschsprung disease; MC, mid-colon; P, post-natal day; PC, proximal colon; PBS, phosphate-buffered saline; PFA, paraformaldehyde; WT, wild-type

4.2 Abstract

Background: The phenotypic variability and the male bias commonly observed in Hirschsprung disease (HSCR) patients indicate the existence and the effect of modifier genes/loci on individual disease-causing mutations. According to results from human molecular genetic studies, these modifier genes/loci include, in addition to coding sequences, non-coding sequences. However, to date efforts aimed at understanding the role and/or the mode of action of non-coding sequences in the pathogenesis of HSCR are lacking. In an effort to begin addressing this gap, we took advantage of *TashT*, *Holstein* and *Spot* transgenic mice – representing models of HSCR and Waardenburg syndrome type 4 respectively – in which aganglionic megacolon results exclusively from homozygous non-coding mutations. *Methods:* Crosses were performed to generate double mutant mice. The incidence of megacolon was scored. The structure of the colonic myenteric plexus was analysed upon staining for acetylcholinesterase activity. The extent of colonic ganglionosis was evaluated and correlated with the megacolon phenotype. *Key-Results:* Simple heterozygous mice $TashT^{Tg/+}$, $Hol^{Tg/+}$ and $Spot^{Tg/+}$ do not display any form of colonic aganglionosis. However, a significant subset of $TashT^{Tg/+};Spot^{Tg/+}$ double heterozygous mice develop aganglionic megacolon around weaning age. Additionally, the presence of a single *Holstein* allele in the $TashT^{Tg/Tg}$ background ($TashT^{Tg/Tg};Hol^{Tg/+}$) increases the incidence of megacolon as well as the severity of colonic aganglionosis in $TashT^{Tg/Tg}$ animals. *Conclusions and Inferences:* Genetic interactions between *TashT* and *Spot* or *Holstein* loci increase the megacolon prevalence and/or the severity of enteric phenotype in double mutant mice. Cellular and molecular characterization of these interactions might aid to understand the mode of action of non-coding mutations in the pathogenesis of HSCR. *Key-words:* Hirschsprung disease; Aganglionic megacolon; Colonic aganglionosis; Mouse models; Modifier loci; Coding sequences; Non-coding sequences; Genetic interactions.

4.3 Introduction

The enteric nervous system (ENS) provides intrinsic innervation to the gastrointestinal (GI) in order to control vital functions such as motility, secretion, epithelial barrier and local blood flow (Burns et Pachnis, 2009). The ENS regulates these functions without input from the central nervous system, instead collaborating with other gut-associated cell types such as interstitial cells of Cajal. It is composed of hundreds of interconnected ganglia that contain both neurons and glia, which are distributed along two main plexuses: the myenteric plexus that controls motility and the submucosal plexus that controls mucosal functions.

The great majority of neuronal and glial cells that make up enteric ganglia are derived from neural crest cells (NCCs) coming from the vagal region of the neural tube. These cells first invade the embryonic foregut mesenchyme and then migrate rostrocaudally to colonize the whole developing gut. In mice this process takes 5 embryonic days (E) beginning around E9.5, while in human it lasts 3 weeks commencing at the 4th week of gestation (Anderson *et al.*, 2006; Burns et Le Douarin, 2001; Wallace et Anderson, 2011). NCCs originating from trunk (via a Schwann cell precursor intermediate) and sacral regions of the neural tube also contribute a subset of enteric neurons and glia, but these supplemental enteric (e) NCCs cannot compensate for a lack of vagal-derived eNCCs (Burns *et al.*, 2000; Uesaka *et al.*, 2015). Proper gut colonization by eNCCs heavily depends upon their capacity to migrate, survive, proliferate and differentiate into well-balanced neural lineages. These interdependent cellular processes are tightly regulated by several genes which, when mutated, cause colonization defects leading to developmental ENS abnormalities including Hirschsprung disease (HSCR) (Obermayr *et al.*, 2013).

With an approximate global incidence of 1/5000 live births, HSCR is a severe congenital malformation of the ENS that mostly affect boys (4 males for 1 female). It is characterized by the absence of enteric ganglia (aganglionosis) in distal bowel regions because of incomplete colonization by eNCCs (Amiel *et al.*, 2008; Gariepy, 2004; Wallace et Anderson, 2011). In the majority of cases (~80%), aganglionosis is restricted to the rectum and sigmoid colon, which defines the short segment form of HSCR. Longer forms of HSCR include (in decreasing order of incidence): long segment HSCR (with aganglionosis extending beyond the sigmoid), total colon aganglionosis, and total intestinal aganglionosis (Amiel *et al.*, 2008).

HSCR can be familial or sporadic, and occurs either as an isolated trait (70% of cases) or as part of syndromes such as Down syndrome and Waardenburg syndrome type 4 (WS4) (Amiel *et al.*, 2008; Newgreen et Young, 2002; Obermayr *et al.*, 2013; Wallace et Anderson, 2011). It is a multifactorial condition where the genetic contribution is believed to be heavier than that of non-genetic factors (Amiel *et al.*, 2008). Accordingly, mutations in more than a dozen of genes including *GDNF* (Angrist *et al.*, 1996; Ivanchuk *et al.*, 1996; Salomon *et al.*, 1996), *RET* (Angrist *et al.*, 1995; Attie *et al.*, 1995; Edery *et al.*, 1994; Sancandi *et al.*, 2000), *ET-3* (Bidaud *et al.*, 1997), *EDNRB* (Amiel *et al.*, 1996; Auricchio *et al.*, 1996; Kusafuka *et al.*, 1996), *NTN* (Doray *et al.*, 1998; Ruiz-Ferrer *et al.*, 2011), *ECE* (Hofstra *et al.*, 1999), *SOX10* (Pingault *et al.*, 1998; Touraine *et al.*, 2000), *ZFHXIB* (Sasongko *et al.*, 2007; Wakamatsu *et al.*, 2001), *PHOX2B* (Trang *et al.*, 2005; Trochet *et al.*, 2005), *KIAA1279* (Brooks *et al.*, 2005) and *TCF4* (Zweier *et al.*, 2007), *PLDI*, *BACE1* and *BACE2* (Tang et al., 2018) have been linked to HSCR. Moreover, beyond these individual mutations, gene-gene interactions as well as the influence of modifier genes/loci on known disease-causing mutations have been identified and suggested to be causal for some patients (Angrist *et al.*, 1996; Auricchio *et al.*, 1999; Carrasquillo *et al.*, 2002; Garcia-Barcelo *et al.*, 2009; Ivanchuk *et al.*, 1996; Okamoto *et al.*, 1997; Parisi *et al.*, 2002; Salomon *et al.*, 1996). Furthermore, some of these interactions have been confirmed and new ones have

been identified through analyses of HSCR mouse models (Barlow, A. *et al.*, 2003; Barlow, A. J. *et al.*, 2013; Broders-Bondon *et al.*, 2012; Cantrell *et al.*, 2004; Maka *et al.*, 2005; McCallion *et al.*, 2003; Saldana-Caboverde *et al.*, 2015; Stanchina *et al.*, 2006; Stanchina *et al.*, 2010; Wallace *et al.*, 2010; Wallace *et al.*, 2011). However, only a small fraction of HSCR cases can currently be explained by these genetic findings. Therefore, identifying new disease susceptibility loci as well as evaluating their potentials for interacting either with each other or with known HSCR genes is of major importance for explaining the missing heritability of HSCR.

Our laboratory has recently generated two HSCR mouse models and one WS4 mouse model called respectively *TashT*, *Holstein* and *Spot*. For each of these models, heterozygous animals (*TashT*^{Tg/+}, *Hol*^{Tg/+} and *Spot*^{Tg/+}) are viable and fertile, without any form of colonic aganglionosis, whereas homozygotes succumb to aganglionic megacolon around weaning age. While this phenotype is fully penetrant without sex bias in *Spot*^{Tg/Tg} and *Hol*^{Tg/Tg} animals, it occurs in only 13% of *TashT*^{Tg/Tg} mice with a strong male bias (~15:1). In all three cases, aganglionosis is due to defective eNCC migration. The underlying molecular mechanism is however different, involving decreased sensitivity to RET and EDNRB signaling in *TashT*^{Tg/Tg} eNCCs (Bergeron *et al.*, 2015), overproduction of Collagen VI by *Hol*^{Tg/Tg} eNCCs (Soret *et al.*, 2015), and premature glial differentiation of *Spot*^{Tg/Tg} eNCCs (Bergeron *et al.*, 2016). Interestingly, in contrast to most of other HSCR mouse models (with the exception of a *Sox10* mutant model (Antonellis *et al.*, 2006)), *TashT*, *Holstein* and *Spot* transgenic insertion-induced mutations all disrupt non-coding sequences. Evidences from human molecular genetic studies support a role for that kind of alterations in influencing disease incidence, expressivity and/or sex bias as result of their interactions with one another or with coding mutations (Burzynski *et al.*, 2005; Emison *et al.*, 2005; Garcia-Barcelo *et al.*, 2009; Griseri *et al.*, 2007; Jannot *et al.*, 2013; Jiang *et al.*, 2011; Lecerf *et al.*, 2014; Moore et Zaahl, 2012; Sribudiani *et al.*, 2011; Tang *et al.*, 2018). However, such possibility has not been verified in mouse models.

In this study, we investigated whether the *TashT* locus could genetically interact with *Spot* or *Holstein* loci. We found that an important subset of *TashT*^{Tg/+};*Spot*^{Tg/+} double heterozygous mice succumb to aganglionic megacolon in a male-biased manner, whereas *TashT*^{Tg/+};*Hol*^{Tg/+} double heterozygotes never develop megacolon. However, presence of a single *Holstein* allele in the *TashT*^{Tg/Tg} background (*TashT*^{Tg/Tg};*Hol*^{Tg/+}) increases the severity of colonic aganglionosis and drastically increases incidence of megacolon in *TashT*^{Tg/Tg} mice.

4.4 Materials and methods

4.4.1 Animals

All experiments were performed according to the guidelines of the Canadian Council on Animal Care (CCAC) and approved by the relevant institutional committee (*Comité institutionnel de protection des animaux*; CIPA reference #899) of University of Quebec at Montreal (UQAM). Wild-type and mutant mice: *TashT*^{Tg/Tg} (Bergeron *et al.*, 2015), *Spot*^{Tg/T} (Bergeron *et al.*, 2016) and *Hol*^{Tg/Tg} (Soret *et al.*, 2015) are from the same genetic background (FVB/N). The incidence of megacolon was scored between the postnatal age (P) of 15 and 40 days, while the analysis of the myenteric plexus was performed using mice between P20 and P40.

For tissue preparation, mice were euthanized following isoflurane anesthesia and the whole colon (without cecum) were immediately dissected out, cut longitudinally along the mesentery, and pinned serosal side down on agar-coated dishes in phosphate buffer saline (PBS). The tissues were fixed overnight at 4°C in a solution containing 4% phosphate-buffered paraformaldehyde (PFA). Following the fixation, tissues were washed extensively and immediately stained or store at 4 °C in PBS for up to 1 month until subsequent labeling.

4.4.2 Staining of acetylcholinesterase activity

The above whole colon was stained for acetylcholinesterase (AChE) activity as previously described (gEnomoto *et al.*, 1998). The length of the myenteric plexus was measured with a millimeter ruler and then converted into percentage of the entire length of the colon. To show the density of the myenteric plexus, images were captured at 20X magnification from the proximal mid-colon and distal distal-colon using a DFC-495 camera mounted on a M205FA stereomicroscope (Leica microsystems).

4.4.3 Statistical analysis

Data are presented as the mean with the number (n) of experiments/animals included in figures and/or figure legends. The significance of differences was evaluated using the unpaired two-tailed Student's t-test. Differences were considered significant for p values ≤ 0.05 .

4.5 Results

4.5.1 Interaction between *TashT* and *Spot* loci

The fact that by different molecular mechanisms *TashT* (Bergeron et al., 2015) and *Spot* (Bergeron et al., 2016) mutations result in delayed *TashT*^{Tg/Tg} or *Spot*^{Tg/Tg} eNCC migration during the formation of the ENS suggests that both loci might be jointly required for proper gut colonisation by ENS precursors. To test this possibility, we first crossed *TashT*^{Tg/Tg} and *Spot*^{Tg/+} mice and followed up double heterozygous mice (*TashT*^{Tg/+}; *Spot*^{Tg/+}) for signs of aganglionic megacolon. We observed that 20.37% of

these mice succumb to megacolon around weaning age in a slightly male-biased manner (1.88:1) (Table 4.1). As the manifestation of this phenotype (e.g. partial penetrance and male bias) is similar to what we have previously reported in *TashT^{Tg/Tg}* mice (Bergeron *et al.*, 2015), we next compared the colonic myenteric plexus of diseased and healthy mice *TashT^{Tg/+};Spot^{Tg/+}* as a function of sex. Consistent with the notion of a critical threshold (~80% of colonic innervation in FVB/n mice beneath which distal obstruction is more likely to occur), the extent of colonic innervation of the majority of megacolon-suffering *TashT^{Tg/+};Spot^{Tg/+}* mice was found to be under this threshold (Fig. 4.1A). However, in contrast to *TashT^{Tg/Tg}*, the extent of innervation was comparable between male and female *TashT^{Tg/+};Spot^{Tg/+}* mice. Nonetheless, the female *TashT^{Tg/+};Spot^{Tg/+}* sub-population was enriched in animals having fully innervated colon 35% (7 out of 20 animals) as compared to males 10% (2 out of 20 animals); providing a contextual possibility for explaining the observed slight sex bias. Moreover, gross observation of the myenteric plexus in the most distal colon of *TashT^{Tg/+};Spot^{Tg/+}* mice of both sexes without aganglionosis revealed a strong reduction in myenteric plexus density when compared to single heterozygous *TashT^{Tg/+}* or *Spot^{Tg/+}* mice (Fig.4.2). Taken together, these observations demonstrate a strong genetic interaction between the *TashT* and *Spot* loci.

4.5.2 Interaction between *TashT* and *Holstein* loci

In addition to sharing delayed eNCC migration as pathogenic mechanism for the megacolon phenotype, *TashT^{Tg/Tg}* (Bergeron *et al.*, 2015) and *Hol^{Tg/Tg}* (Soret *et al.*, 2015) mice also display overlap in the transcriptional signature of their eNCC illustrated by overexpression of the *Col6a4* gene; suggesting a possible molecular explanation for the genetic interactions between *TashT* and *Holstein* loci during ENS development. To test this possibility, we crossed *TashT^{Tg/Tg}* and *Hol^{Tg/+}* mice and

followed up double heterozygous *TashT*^{Tg/+};*Hol*^{Tg/+} mice for signs of aganglionic megacolon. However, these mice never developed megacolon. To complement these observations, we performed direct comparison of the myenteric plexus structure in the colon for a random subset (>10 for each genotype) of P20-40 animals. *TashT*^{Tg/+};*Hol*^{Tg/+} mice of both sexes showed striking decreased myenteric plexus density in the most distal colon as compared to *TashT*^{Tg/+} or *Hol*^{Tg/+} mice (Figure 4.2). These findings led us to speculate that the *Holstein* locus can act as modifier to augment the penetrance of the megacolon phenotype in *TashT*^{Tg/Tg} mice by increasing the severity of distal aganglionosis. Placing a *Holstein* allele on the *TashT*^{Tg/Tg} background resulted in a 4.75-fold increased megacolon incidence without sex bias (Table 4.2) in *TashT*^{Tg/Tg};*Hol*^{Tg/+} as compared to *TashT*^{Tg/Tg} mice. However, the extent of colonic innervation tended to be slightly reduced in males compared to females (Fig. 4.1B). As observed with the *Spot* locus, these results demonstrate a genetic interaction between *TashT* and *Holstein* loci.

4.6 Discussion

The incomplete penetrance, variable phenotype and male bias commonly observed in HSCR strongly suggest the existence and influence of modifier genes/loci as determinants of the disease. Like human patients, *TashT*^{Tg/Tg} mice exhibit partially penetrant male-biased megacolon phenotype; making them a powerful model for identifying such modifiers and decipher the molecular mechanism underlying their influence. We found that a significant subset of *TashT*^{Tg/+};*Spot*^{Tg/+} double heterozygous mice succumb to aganglionic megacolon in a male-biased manner. We also found that *TashT*^{Tg/+};*Hol*^{Tg/+} double heterozygous animals never develop megacolon but instead exhibit severe hypoganglionosis in the most distal colon. Importantly, other data

demonstrate that the presence of a single *Holstein* allele in the *TashT*^{Tg/Tg} background (*TashT*^{Tg/Tg};*Hol*^{Tg/+}) increases the severity of colonic aganglionosis and drastically increases the incidence of megacolon in *TashT*^{Tg/Tg} mice. Taken together, our data demonstrate a strong genetic interaction between the *TashT* locus and *Spot* or *Holstein* loci.

4.6.1 Interactions between the *TashT* locus and *Spot* or *Holstein* loci: implication for ENS formation

We investigated potentials of genetic interactions between the *TashT* locus and *Spot* or *Holstein* loci during ENS development. We observed the occurrence of male-biased aganglionic megacolon in 20.37% of double heterozygous *TashT*^{Tg/+};*Spot*^{Tg/+} mice (Table 4.1), strongly supporting interaction between these two loci. In marked contrast to this observation, double heterozygous *TashT*^{Tg/+};*Hol*^{Tg/+} mice never developed aganglionic megacolon but instead exhibited severe hypoganglionosis in the most distal colon. This difference in the severity of enteric phenotype between *TashT*^{Tg/+};*Hol*^{Tg/+} and *TashT*^{Tg/+};*Spot*^{Tg/+} mice is likely to result from that related to the transcriptional signature of *TashT*^{Tg/+};*Hol*^{Tg/+} and *TashT*^{Tg/+};*Spot*^{Tg/+} eNCC. It would be important to verify this possibility by characterizing the molecular profile of *TashT*^{Tg/+};*Hol*^{Tg/+} and *TashT*^{Tg/+};*Spot*^{Tg/+} eNCC with emphasis on key-ENS genes as well as those shown to be dysregulated (e.g. *Fam162b*, *Gdnf*, *Edn-3*, *Nr2f1*, *Plp1*, *S100b* and *Col6a4*) in *TashT*^{Tg/Tg}, *Spot*^{Tg/Tg} and *Hol*^{Tg/Tg} eNCC (Bergeron *et al.*, 2015; Bergeron *et al.*, 2016; Soret *et al.*, 2015).

4.6.2 Is the *Holstein* locus a modifier for the *TashT* locus?

The megacolon incidence and/or the extent of colonic aganglionosis that result from partially penetrant HSCR-causing individual mutations can be increased under the influence of modifier genes. Accordingly, the individual presence of *Zfhlx1b*, *Ret* or *Edn-3* mutated alleles respectively in the *Sox^{LacZ/+}* (*Sox^{LacZ/+};Zfhlx1b^{Δ/+}* (Stanchina *et al.*, 2010)), *Ednrb^{s/s}* (*Ret^{+/-};Ednrb^{s/s}* (Carrasquillo *et al.*, 2002; McCallion *et al.*, 2003)) or *Sox10^{Dom/+}* (*Sox10^{Dom/+};End-3^{ls/+}* (Stanchina *et al.*, 2006)) backgrounds was shown to enhance the cases of megacolon and/or the severity of colonic aganglionosis in double mutant mice. Our data for *TashT^{Tg/Tg};Hol^{Tg/+}* mice (Table 4.2 and Fig.4.1B) are in total agreement with these studies and further identify the *Holstein* locus as a modifier for the *TashT* locus.

Unlike *TashT^{Tg/Tg}*, *TashT^{Tg/Tg};Hol^{Tg/+}* mice of both sexes are equally affected by the megacolon even though the underlying colonic aganglionosis is slightly more severe in males compared to females (Fig. 4.1B). One possibility for explaining this observation is that the presence of the *Holstein* allele in the *TashT^{Tg/Tg}* context further delayed the migration of eNCC in double mutant embryos of both sexes so that the extent of colonic innervation of many more females is beneath the above mentioned critical threshold (~80% of colonic innervation) (Bergeron *et al.*, 2015).

4.6.3 Role of non-coding sequences in the pathogenesis of HSCR

Data from molecular genetic studies in HSCR patients suggest a role for non-coding mutations in influencing the disease penetrance, severity and/or sex bias as a result of their interactions either with one another or with coding mutations (Burzynski *et al.*, 2005; Emison *et al.*, 2005; Garcia-Barcelo *et al.*, 2009; Griseri *et al.*, 2007; Jannot *et*

al., 2013; Jiang *et al.*, 2011; Lecerf *et al.*, 2014; Moore et Zaahl, 2012; Sribudiani *et al.*, 2011; Tang *et al.*, 2018). Efforts aimed at either confirming or dispelling this possibility in HSCR mouse models are missing. Our study is the first – to the best of our knowledge – to investigate genetic interaction involving non-coding mutations. Collectively, our findings support the human genetic studies and extent the network of gene-gene interactions underlying normal ENS development. Collectively, our data call for further studies aimed at analysing the molecular and cellular mechanisms underlying the mode of action non-coding sequences not only in HSCR but also in health.

Acknowledgements

This work was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR #MOP-26037) to NP. AMT was supported by a PhD scholarship from the Fonds de la recherche du Québec - Nature et technologies (FRQNT) and the Programme Formation des Formateurs (PFF) from Bamako University. NP is a Fonds de la Recherche du Québec - Santé (FRQS) Senior Research Scholar and the recipient of the UQAM Research Chair on Rare Genetic Diseases. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Disclosure: No conflict of interests exists.

Data availability: all materials, data and associated protocols will be made promptly available to readers

Author contribution

Conceived and supervised the study: NP. Designed the experiments: AMT. Performed the experiments: AMT. Collected, analyzed and interpreted data: AMT. Wrote the manuscript: AMT.

4.7 Figures

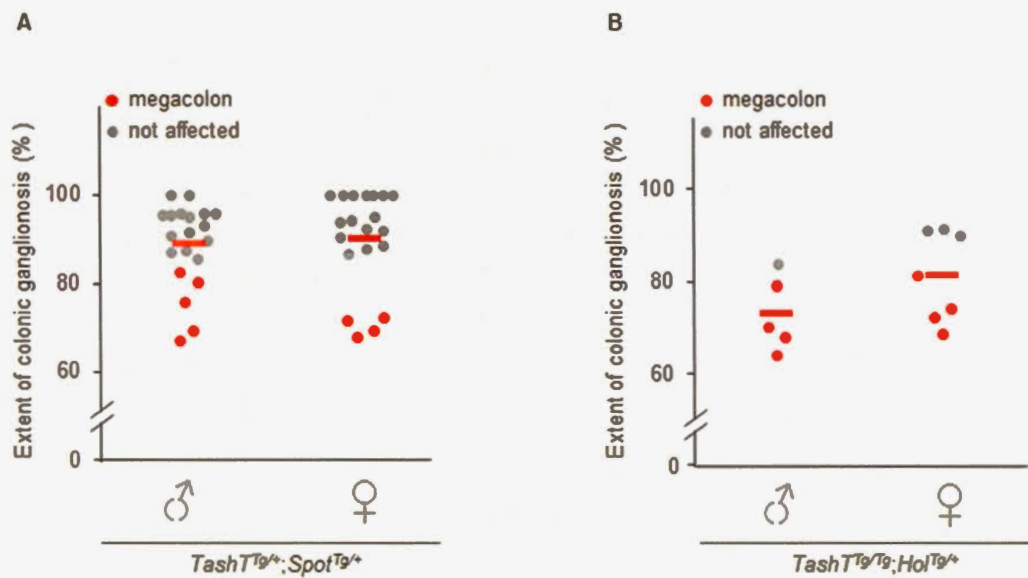


Figure 4.1 The extent of ganglionosis in the colon of $TashT^{Tg/+};Spot^{Tg/+}$ and $TashT^{Tg/Tg};Hol^{Tg/+}$ mice between P20 and P40.

Quantification of the extent of ganglionosis expressed in percentage of total colon length in (A) $TashT^{Tg/+};Spot^{Tg/+}$ and (B) $TashT^{Tg/Tg};Hol^{Tg/+}$ mice.

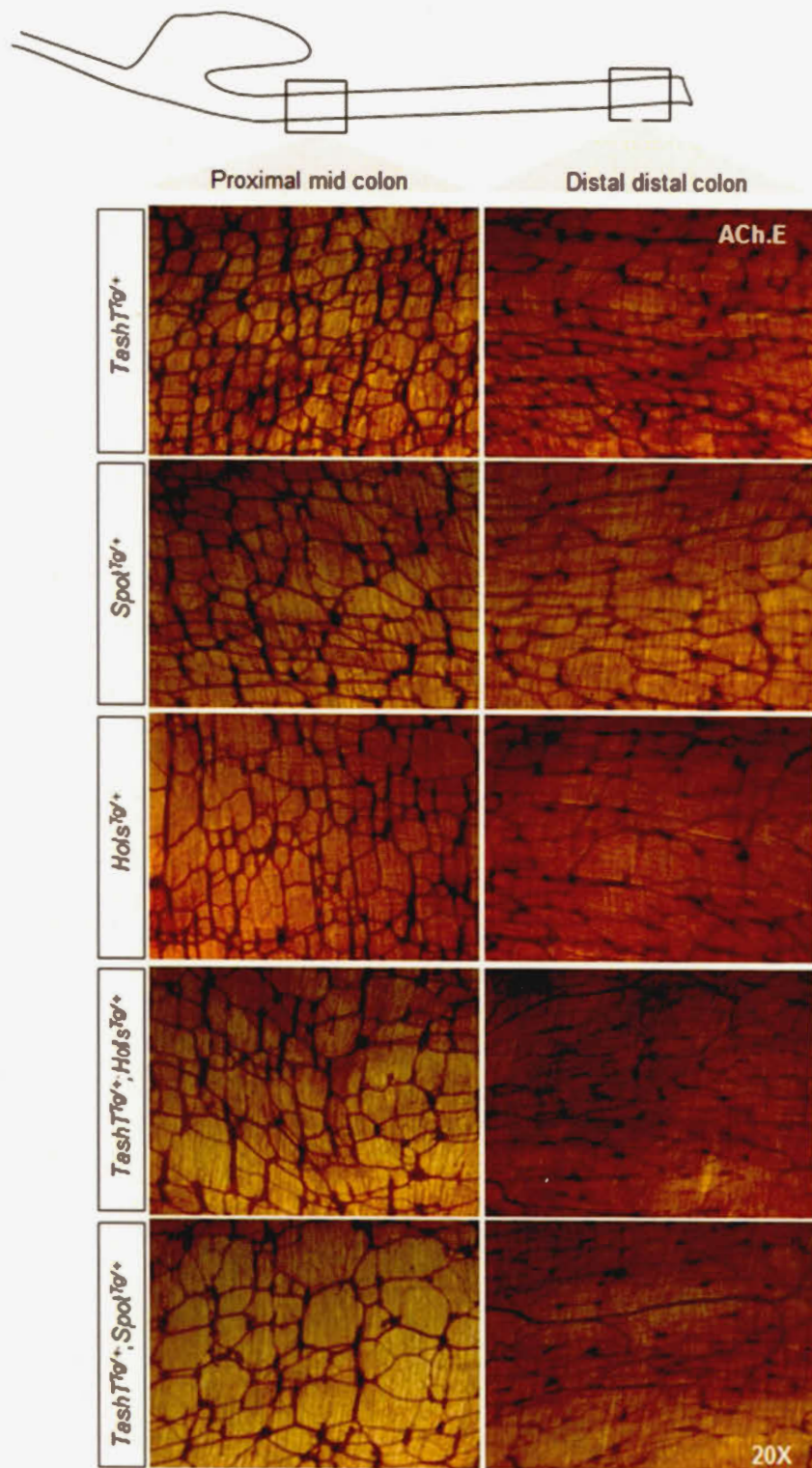


Figure 4.2 The density of the myenteric plexus in the colon of *TashT^{Tg/+}*, *Hol^{Tg/+}*, *Spot^{Tg/+}*, *TashT^{Tg/+};Spot^{Tg/+}* and *TashT^{Tg/+};Hol^{Tg/+}* mice between P40 and P43.

Representative 20X images of whole-mount staining of acetylcholinesterase activity in the colon of *TashT^{Tg/+}*, *Spot^{Tg/+}*, *Hol^{Tg/+}*, *TashT^{Tg/+};Hol^{Tg/+}* and *TashT^{Tg/+};Spot^{Tg/+}* mice.

4.8 Tables

Table 4.1 Incidence of aganglionic megacolon in *TashT^{Tg/+};Spot^{Tg/+}* mice between P20 and P40

Mice		Aganglionic megacolon		
Sex	Number	Case	%	Ratio
Male	26	7	26.92	1.88
Female	28	4	14.28	1
Total	54	11	20,37	-

Table 4.2 Incidence of aganglionic megacolon in *TashT^{Tg/Tg};Hol^{Tg/+}* mice between P20 and P40

Mice		Aganglionic megacolon		
Sex	Number	Case	%	Ratio
Male	10	7	70	1.26
Female	9	5	55.55	1
Total	19	12	63.15	-

CHAPITRE V

DISCUSSION, CONCLUSION ET PERSPECTIVES

5.1 Les complications post-opératoires de HSCR : Implication de la zone de transition (ZT)

À l'heure actuelle, le seul traitement de HSCR est une intervention chirurgicale qui consiste en la résection du segment aganglionnaire suivie de l'anastomose de l'intestin proximal avec l'anus afin de rétablir la continuité digestive. Malheureusement, après cette intervention les complications sont loin d'être rares. Celles-ci incluent les souillures, l'incontinence, l'entérocolite et la constipation, et touchent 10 à 50% des patients (Jarvi *et al.*, 2010; Neuvonen *et al.*, 2017; Yanchar et Soucy, 1999). Il est admis que sous ces troubles post-opératoires se cachent des altérations du SNE dans la région en amont du segment aganglionnaire, la zone de transition (ZT). Il existe très peu de données quant à la nature exacte de ces défauts. Cependant, basé sur les résultats de deux études, les patients de HSCR ont en commun l'augmentation de la proportion des neurones nitrergiques (nNOS⁺) du plexus myentérique dans la ZT (Cheng, L. S. *et al.*, 2016; Coyle *et al.*, 2016). À l'instar des patients, les modèles murins pour HSCR (e.g. *Sox10*^{Dom/+}, *Ednrb*^{-/-} et *Edn3*^{-/-}) partagent également cette augmentation de la proportion des neurones nNos⁺ associée à une diminution du nombre de neurones (hypoganglionose) et de la motricité du côlon (Musser *et al.*, 2015; Roberts *et al.*, 2008; Zaitoun *et al.*, 2013). Par ailleurs, étant donné l'existence du biais mâle (4 garçons vs 1 fille) dans l'incidence de HSCR, il est raisonnable de s'attendre à ce que la sévérité

de ces anomalies du plexus myentérique dans la ZT soit influencée par le sexe. Mais aucune des études mentionnées ci-dessus n'a été faite en fonction du sexe.

Dans le chapitre II (Toure *et al.*, 2016) nos analyses phénotypiques du plexus myentérique montrent une réduction la densité neuronale dans les régions distales du côlon (englobant la ZT) chez toutes les souris *TashT^{Tg/Tg}* adultes (Fig.2.3 C-D). Toutefois comparativement aux femelles, cette réduction est plus prononcée chez les mâles où elle est exclusivement associée à une augmentation d'environ 100% de la proportion des neurones nitrergiques ainsi que la constipation chronique (Fig.2.2 C, Fig.2.6). De manière générale, nos observations supportent les études ci-dessus. De plus, dans le contexte de HSCR, elles suggèrent que la caractérisation du SNE dans la ZT devrait systématiquement être faite en fonction du sexe.

5.2 La constipation associée à HSCR : Rôle de la densité neuronale et des neurones nitrergiques du plexus myentérique dans la ZT

Les complications post-opératoires précédemment évoquées suggèrent une contribution des défauts du SNE dans la ZT dans la survenue des dysfonctionnements du côlon (e.g. la constipation sévère) associés à HSCR. Cette hypothèse est supportée par le fait que les patients souffrants par exemple de l'hypoganglionose isolée ou de l'immaturité des ganglions sont sévèrement constipés et/ou montrent des signes cliniques caractéristiques de HSCR (e.g. la distension abdominale) et ce malgré la présence de neurones sur toute la longueur de leur côlon (Friedmacher et Puri, 2013). Ensemble, ces observations suggèrent que l'aganglionose et/ou les altérations de la structure/composition du plexus myentérique (e.g. l'hypoganglionose) joueraient un rôle dans la survenue de la constipation. À cet égard, les résultats du chapitre II sont une fois de plus intéressants car ils montrent une corrélation entre ces deux aspects et

la constipation chez les souris mâles *TashT^{Tg/Tg}* adultes (Fig.2.4 A-B). Ils suggèrent également que la contribution de l'hypoganglionose est plus importante que celle de l'aganglionose, et que la survenue de la constipation nécessiterait une augmentation de la proportion des neurones nitrergiques combinée à une baisse d'au-delà environ 40% de la densité neuronale. Nous avons confirmé cette hypothèse dans le chapitre III en montrant une corrélation positive entre l'hypoganglionose et l'augmentation de la proportion des neurones nNos⁺ ; qui, individuellement à leur tour, sont aussi positivement corrélées à la constipation (Fig.3.7 A-D). Il est important de noter qu'une corrélation similaire entre l'hypoganglionose et la proportion des neurones nitrergiques a également été montrée chez les souris *Sox10^{Dom/+}* (Musser *et al.*, 2015) même si les auteurs de cette étude n'ont pas étendu leur analyses à la motricité du côlon. De plus, la surabondance des neurones nitrergiques dans la ZT a été associée à la survenue des complications post-opératoires de HSCR chez certains patients (Cheng, L. S. *et al.*, 2016).

Basé sur l'association ci-dessus entre l'hypoganglionose et/ou la surabondance des neurones nNos⁺ et la constipation chez les souris *TashT^{Tg/Tg}* exposées ou non aux antibiotiques (Fig.3.7 A-D), nous avons cherché à déterminer le poids exact de la contribution des neurones nitrergiques à cette baisse de la motricité colique. Nous avons pour cela soumis les animaux *TashT^{Tg/Tg}* sous antibiothérapie à un lavement quotidien du côlon avec un inhibiteur de la signalisation nitrergique (i.e. N omega-Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME)) ou l'eau pendant une semaine à partir de P26 (soit l'âge autour duquel commence la constipation). Nous observons que le traitement L-NAME atténue significativement la sévérité de la constipation induite par l'antibiothérapie chez les animaux mâles et immatures *TashT^{Tg/Tg}* (Fig.3.8 A-B). Alors que cette observation suggérait que la thérapie L-NAME pourrait également atténuer la sévérité du phénotype de mégacôlon chez les *TashT^{Tg/Tg}*, nous avons identifié et soumis les souris mâles *TashT^{Tg/Tg}* malades au même type de traitement. Nous remarquons que, par rapport à l'eau, le traitement L-NAME augmente

leur espérance de vie (Fig.3.8 C). Ensemble, ces résultats démontrent pour la première fois chez un modèle animal pour HSCR le potentiel d'une thérapie moléculaire pour atténuer l'impact fonctionnel des défauts du SNE sous-jacents HSCR.

5.3 L'antibiothérapie dans le contexte de HSCR

Des altérations du plexus myentérique – principalement caractérisées par l'hypoganglionose associée à la disproportion des neurones nitrergiques et/ou des troubles de la motricité – rapportées à la fois chez les souris immatures axéniques ou traitées avec des antibiotiques (Caputi *et al.*, 2017; Collins *et al.*, 2014) soulignent l'importance de la colonisation normale du tractus gastrointestinal par le microbiote au maintien de l'architecture/fonction du plexus myentérique. Parallèlement, l'importante similitude entre ces défauts et ceux rapportés dans la ZT (décrits ci-dessus) des patients et les modèles murins pour HSCR suggèrent fortement que l'exposition fréquente aux antibiotiques durant l'enfance pourrait aggraver les défauts congénitaux (ou encore préexistants) du plexus myentérique. Il est surprenant de constater que cette hypothèse n'a fait l'objet d'aucun test (avant cette thèse) et ce malgré l'usage courant et fréquent des antibiotiques lors de la prise en charge des patients de HSCR en particulier ceux atteints de l'entérocolite associée à HSCR (ECAH).

ECAH est la complication pré- et/ou post-opératoire la plus grave de HSCR, et demeure la cause principale des décès liés à la maladie (Frykman et Short, 2012; Gosain et Brinkman, 2015). Il s'agit d'une inflammation des muqueuses du petit intestin ou du côlon dont les symptômes incluent les diarrhées, la distension abdominale et la septicémie. L'antibiothérapie occupe une place très importante dans la prise en charge des patients atteints d'ECAH. Les antibiotiques sont également utilisés en traitement préventif étant donné que les patients de HSCR sont théoriquement tous prédisposés à

développer l'ECAH. À l'heure actuelle – à notre connaissance – dans la littérature, il n'existe aucune donnée épidémiologique par rapport aux effets à long et/ou à court-terme de l'antibiothérapie sur la structure/composition et la fonction du plexus myentérique chez les patients de HSCR.

À cet égard, nos résultats du chapitre III sont intéressants. Dans un premier temps nous montrons qu'à court-terme l'exposition des souris mâles et immatures *TashT^{Tg/Tg}* aux antibiotiques retarde d'environ 3 jours l'âge moyen des décès attribuables au mégacôlon dans les conditions normales (Fig.3.3 A) sans altérer la pénétrance globale de la maladie. Notez qu'un effet similaire des antibiotiques a été rapporté chez le modèle *Ednrb^{-/-}* (Cheng, Z. *et al.*, 2010). Ensuite, nous remarquons qu'à long-terme le traitement induit la constipation chronique chez les souris mâles et immatures *TashT^{Tg/Tg}* ayant survécu au mégacôlon (Fig.3.3 B-F). Pour expliquer ces observations, nous émettons l'hypothèse selon laquelle : à court-terme, l'antibiothérapie contribuerait au maintien de l'homéostasie du plexus myentérique dans le côlon tandis qu'à long-terme elle aggraverait la sévérité des défauts de ce dernier. Il convient de noter, qu'à la base les souris mâles et immatures *TashT^{Tg/Tg}* montrent une hypoganglionose sévère et une augmentation de la proportion des neurones nitrergiques spécifiquement dans le côlon distal incluant la ZT (Fig.3.4 A-B, Fig.3.5 A-B et Fig.S.3.9 A-B). Conformément à l'hypothèse émise, d'abord à P22-23 (i.e. la fourchette d'âge où l'antibiothérapie semble interférer avec le développement du mégacôlon chez les mâles *TashT^{Tg/Tg}*) nous observons que la proportion des neurones nitrergiques est réduite vers des niveaux normaux chez les souris *TashT^{Tg/Tg}* traitées comparativement au non traitées (Fig.3.4 B-F). Par opposition, à P30-36 (i.e. la fourchette d'âge où l'antibiothérapie induit la constipation chronique chez les mâles *TashT^{Tg/Tg}*) nous notons que le traitement aggrave la sévérité de l'hypoganglionose tout en engendrant une augmentation supplémentaire de la proportion des neurones nitrergiques. Un effet qui semble se propager bien au-delà de la ZT jusqu'à l'iléon (Fig.3.5 A-B et Fig.S.3.9 A-B). Ensemble, ces observations suggèrent que l'exposition

à long-terme aux antibiotiques pourrait aggraver la sévérité des défauts congénitaux du plexus myentérique.

Nos résultats actuels ne nous permettent pas d'expliquer les mécanismes moléculaires à la base de ces observations. Néanmoins, on peut envisager l'hypothèse que l'antibiothérapie perturbe, au moins, la disponibilité d'une molécule jouant un rôle clé dans le maintien de l'homéostasie et/ou la maturation du SNE après la naissance, et dont l'expression fait intervenir les bactéries intestinales. Cette hypothèse est corroborée par une étude récente montrant que les bactéries intestinales influencent la maturation du SNE postnatal en induisant la production de la sérotonine (5-HT) à la fois par les neurones et les cellules de la muqueuse intestinale, et en activant 5-HT₄R – le récepteur de la sérotonine (5-HT) présent sur certains types cellulaires du tractus gastro-intestinal incluant les neurones entériques – (De Vadder *et al.*, 2018). Il est important de noter que l'activation de 5-HT₄R est nécessaire au maintien de la densité et à la survie des neurones entériques après la naissance (Liu *et al.*, 2009). Des expériences futures de lavement du côlon des souris *TashT^{Tg/Tg}* sous antibiothérapie avec des agonistes de 5-HT₄ (e.g. prucalopride et tégasérod) devront permettre de déterminer si l'effet biphasique du traitement antibiotique (évoqué ci-dessus) sur leur SNE dans le côlon est médié ou pas par 5-HT₄R. Ceci constituerait un premier pas pour comprendre les bases moléculaires de nos observations.

5.4 La dysbiose associée à HSCR : Cause ou conséquence de l'occlusion intestinale ?

La dysbiose intestinale a été décrite chez les patients de HSCR. Pour l'heure, il n'est pas possible de déterminer si cette dysbiose est innée ou consécutive à l'occlusion intestinale, ni de savoir si sa nature change en fonction du sexe ou des mutations qui

causent la maladie. Dans le chapitre III, mettant à profit le caractère incomplet de la pénétrance du phénotype de mégacôlon aganglionnaire des souris *TashT^{Tg/Tg}* et la disponibilité des souris *Hol^{Tg/Tg}* nous avons tenté de répondre à cette question en analysant la composition des bactéries intestinales en fonction du sexe et de l'état de santé (i.e. souris affectées par le mégacôlon vs non-affectées). Nous montrons que toutes les souris *TashT^{Tg/Tg}* (indépendamment du sexe et de l'état de santé) présentent une dysbiose intestinale qui, au niveau des phyla, est caractérisée principalement par une augmentation des *Proteobacteria* au détriment des *Firmicutes*. Nous montrons également une importante similitude entre ce profil de dysbiose et celui des souris *Hol^{Tg/Tg}* affectées par le mégacôlon (Fig.3.1 A). Il est important de noter qu'un déséquilibre similaire du microbiote a été rapporté chez un autre modèle de souris pour HSCR (*Endrb^{-/-}*) et ce bien avant la survenue de l'occlusion intestinale (Pierre *et al.*, 2014; Ward, N. L. *et al.*, 2012).

Nos résultats indiquent que la contribution des défauts congénitaux du SNE à la dysbiose associée à HSCR est beaucoup plus importante que celle de l'occlusion intestinale. De plus, ils suggèrent que le SNE déterminerait la composition qualitative du microbiote ; auquel cas il serait raisonnable de s'attendre à ce que des anomalies comparables du SNE engendrent un profil similaire de la dysbiose intestinale. Cette idée est supportée par la similitude du profil du microbiome entre nos mutants et le model (*Endrb^{-/-}*) principalement caractérisé par l'augmentation des *Proteobacteria* au détriment des *Firmicutes*. Nous spéculons que ce profil pourrait être la signature générale du microbiome dans HSCR. Cette hypothèse mériterait d'être testée chez les patients. Mais cela relèverait d'un défi car, comme évoqué précédemment, l'usage des antibiotiques occupe une place très importante dans la prise en charge des patients de HSCR, et peut en soit induire une dysbiose similaire à celle observée chez les modèles murins pour HSCR (Korpela *et al.*, 2016).

5.5 Le rôle des séquences non-codantes dans la pathogénèse de HSCR

De nombreuses interactions génétiques ont été montrées comme gouvernant le développement normal et pathologique du SNE (Barlow, A. *et al.*, 2003; Barlow, A. J. *et al.*, 2013; Broders-Bondon *et al.*, 2012; Cantrell *et al.*, 2004; Maka *et al.*, 2005; McCallion *et al.*, 2003; Saldana-Caboverde *et al.*, 2015; Stanchina *et al.*, 2006; Stanchina *et al.*, 2010; Wallace *et al.*, 2010; Wallace *et al.*, 2011). Il est important de noter que toutes ces études visaient seulement à analyser les interactions entre des séquences codantes alors que les résultats des études de génétique moléculaire chez les patients atteints de HSCR suggèrent l'existence et l'effet des mutations non-codantes sur les mutations individuelles connues à l'origine de la maladie (Burzynski *et al.*, 2005; Emison *et al.*, 2005; Garcia-Barcelo *et al.*, 2009; Griseri *et al.*, 2007; Jannot *et al.*, 2013; Jiang *et al.*, 2011; Lecerf *et al.*, 2014; Moore et Zaahl, 2012; Sribudiani *et al.*, 2011; Tang *et al.*, 2018).

Spot (Bergeron *et al.*, 2016) et *Holstein* (Soret *et al.*, 2015) sont respectivement des modèles murins pour HSCR et le syndrome de Waardenburg type 4 générés de la même manière que les souris *TashT* (Bergeron *et al.*, 2015) (voir la section 1.5). Tout comme la lignée *TashT*, l'insertion transgénique a lieu dans une séquence non-codante. Les animaux hétérozygotes pour l'insertion transgénique (*Spot*^{Tg/+} et *Hol*^{Tg/+}) ne montrent aucune forme d'aganglionose colique tandis que toutes les souris homozygotes *Spot*^{Tg/Tg} et *Hol*^{Tg/Tg} meurent du mégacôlon aganglionnaire autour de l'âge du sevrage sans aucun biais sexuel. Pour ces deux lignées, l'aganglionose résulte d'un retard de migration des CCNe au cours du développement. Toutefois, les mécanismes moléculaires à la base de ce retard diffèrent pour ces deux mutants : une surproduction du collagène VI par les CCNe des *Hol*^{Tg/Tg} et une différenciation gliale précoce des CCNe des *Spot*^{Tg/Tg}.

Nos observations phénotypiques montrent que 20.37% des $TashT^{Tg/+};Spot^{Tg/+}$ succombent du mégacôlon avec un biais sexuel de ~ 2 mâles vs 1 femelle (Tableau 4.1). Nous observons également que l'introduction d'un allèle *Holstein* dans le contexte de la mutation *TashT* ($TashT^{Tg/Tg};Hol^{Tg/T+}$) augmente drastiquement d'environ 4 fois la pénétrance du mégacôlon aganglionnaire, et aggrave la sévérité de l'aganglionose colique chez les souris $TashT^{Tg/Tg}$ (Tableau 4.2 and Fig.4.1B). Dans cette étude nous démontrons pour la toute première fois des interactions entre des séquences non-codantes. Nos résultats supportent les hypothèses découlant des études de génétique moléculaire humaine selon lesquelles les mutations non-codantes auraient le potentiel d'influencer la pénétrance, la variabilité phénotypique et le biais sexuel des mutations individuelles codantes à l'origine de HSCR (Burzynski *et al.*, 2005; Emison *et al.*, 2005; Garcia-Barcelo *et al.*, 2009; Griseri *et al.*, 2007; Jannot *et al.*, 2013; Jiang *et al.*, 2011; Lecerf *et al.*, 2014; Moore et Zaahl, 2012; Sribudiani *et al.*, 2011; Tang *et al.*, 2018).

5.6 Conclusion

Malgré le progrès de nos connaissances sur les altérations du SNE et du microbiote associées à HSCR, avant cette thèse, beaucoup de questions demeuraient ouvertes. En effet, on se demandait, s'il existait une signature commune des altérations du SNE dans la zone de transition pouvant potentiellement servir de cible thérapeutique à caractère palliatif. On se posait également la question à savoir si la sévérité de ces défauts pouvait être influencée par : (i) le sexe (à l'image de la maladie elle-même), (ii) les facteurs environnementaux nuisibles aux SNE (comme la dysbiose induite par l'antibiothérapie), (iii) la présence d'autres mutations associées à HSCR, ou (iv) une combinaison des points i-iii. Enfin, on se posait des questions quant à l'origine de la dysbiose associé à HSCR : serait-elle une cause ou une conséquence de l'occlusion

intestinale ? Aurait-elle un profil commun indépendamment des mutations individuelles à l'origine de la maladie et/ou la nature des défauts du SNE qui résultent de ces mutations. Dans cette étude nous avons tenté de répondre à ces différentes questions en tirant le maximum de profit de l'unique modèle murin, à ce jour, qui recapitule les principales caractéristiques de HSCR (e.g. l'incomplétude de la pénétrance, la variabilité phénotypique et le biais mâle), *TashT*.

Les travaux de cette thèse, pour la première fois dans le domaine, montrent chez la souris :

- I. Que la signature de la dysbiose colique est largement similaire entre les modèles murins pour HSCR, et est indépendante du phénotype de mégacôlon.
- II. Que la sévérité des défauts du SNE dans la zone de transition peut être influencée par le sexe, et contribue à la pathogénèse du mégacôlon.
- III. Le potentiel d'une thérapie moléculaire pour atténuer l'impact fonctionnel des défauts du SNE.
- IV. Qu'à long-terme l'antibiothérapie aggrave la sévérité des défauts préexistants du SNE.
- V. Des interactions génétiques impliquant des séquences non-codantes.

5.7 Perspectives

Les travaux de cette thèse contribuent à l'avancement des connaissances des défauts histo-cytologiques du SNE qui sont à la base du phénotype de mégacôlon aganglionnaire, et l'effet des facteurs environnementaux et génétiques sur la sévérité de ces défauts. Cependant, de nombreux aspects nos travaux restent à approfondir aux niveaux moléculaires et/ou cellulaires. Le lavement du côlon des animaux *TashT^{Tg/Tg}* sous antibiothérapie avec des agonistes des molécules impliquées dans la maturation

du SNE postnatal, et dont l'expression est influencée par les bactéries intestinales (e.g. 5-HT₄) fait partie des approches qui nous permettra de comprendre les mécanismes moléculaires de l'impact de l'antibiothérapie sur la sévérité des altérations du SNE observées chez les souris mâles et immatures *TashT^{Tg/Tg}*. La caractérisation cellulaire de la formation du SNE couplée à l'analyse de l'expression des gènes clés gouvernant ce processus – avec emphase sur ceux rapportés comment étant significativement modulés dans les CCNe des *TashT^{Tg/Tg}*, *Spot^{Tg/Tg}* et *Hol^{Tg/Tg}* – chez les embryons double mutants *TashT^{Tg/+};Spot^{Tg/+}* et *TashT^{Tg/Tg};Hol^{Tg/+}* permettra, de manière générale, d'avoir un aperçu des mécanismes de l'effet des mutations non-codantes sur les mutations individuelles codantes à l'origine du mégacôlon. La validation de l'efficacité du traitement L-NAME pour atténuer la sévérité de la dysmotilité colique chez d'autres modèles murins pour HSCR qui montrent une surabondance des neurones nitrergiques dans la zone de transition (e.g. *Sox10^{Dom/+}* et *Ednrb^{-/-}*) constituerait un premier pas important vers la recherche translationnelle. Enfin la confirmation ou la réfutation de notre hypothèse relative à l'existence d'une signature commune de la dysbiose colique associée à HSCR chez d'avantage de patients/modèles animaux pour la maladie permettra d'améliorer la prise en charge des cas d'entérocolite associée à HSCR.

APPENDICE A : AUTRES CONTRIBUTIONS SCIENTIFIQUES

Article publié dans la revue scientifique : *Development*

© 2016. Published by The Company of Biologists Ltd | Development (2016) 143, 1363-1374 doi:10.1242/dev.132159



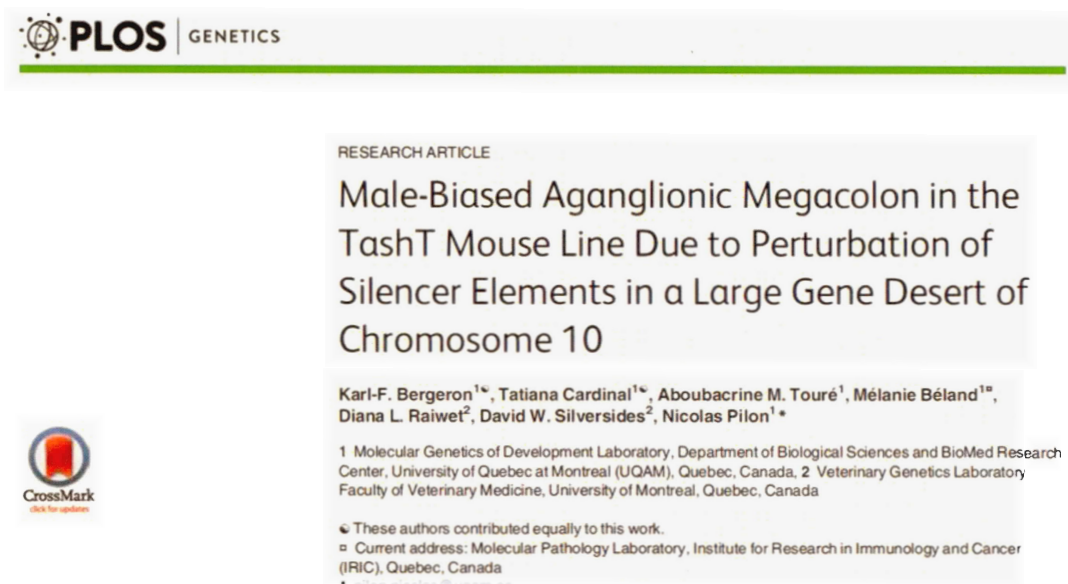
RESEARCH ARTICLE

A direct role for murine Cdx proteins in the trunk neural crest gene regulatory network

Oraly Sanchez-Ferras^{*,‡}, Guillaume Bernas[‡], Omar Farnos, Aboubacrine M. Touré, Ouliana Souchkova and Nicolas Pilon[§]

Contribution personnelle : expérimentation, interprétation de la Figure 4 (I-L).

Article publié dans la revue scientifique : *PLOS genetics*



Contribution personnelle : Design des amorces et optimisation des conditions de PCR pour le génotypage des souris *TashT^{Tg/Tg}*. Analyses statistiques de la pénétrance du mégacôlon aganglionnaire chez les souris *TashT^{Tg/Tg}*. Évaluation de l'entendu de colonisation dans le côlon des souris *TashT^{Tg/Tg}* âgées de P0 à P40 (P : jour post natal). Validation par RT-PCR semi quantitative des résultats du séquençage du transcriptôme des cellules de la crête neurale entériques des embryons à E12.5 (E : jour embryonnaire).

APPENDICE B : PARTICIPATION À DES CONGRÈS SCIENTIFIQUES

Présentations orales :

Touré A.M., Souchkova O., Landry M., Kembel S. and Pilon N. Gut microbiota-mediated Gene x Environment interactions in the *TashT* mouse model of Hirschsprung disease. *Actual Problems of Modern Genetics tenue*. 20-22 Octobre 2016, Institute of Fundamental Medicine and Biology of Kazan Federal University, Kazan, Fédération de Russie.

Touré A.M., Souchkova O., Landry M., Kembel S. and Pilon N. Gut microbiota-mediated Gene x Environment interactions in the *TashT* mouse model of Hirschsprung disease. *World Congress of Pediatric Gastroenterology, Hepathology and Nutrition*, 5-8 Octobre 2016, Montréal (Québec), Canada.

Touré AM Cardinal T, Bergeron KF, Béland M, Souchkova O, Raiwet DL, Silversides DW and Pilon N (2012). *TashT*: A new model for Hirschsprung disease. *8^e Colloque Annuel du Centre BioMed de l'Université du Québec à Montréal*, 26-27 Avril 2012, Montréal, (Québec), Canada.

Présentations par affiche :

Touré AM, Souchkova O., Landry M. Kembel SW. and Pilon N (2018). Gut microbiota-mediated Gene x Environment interactions in the *TashT* mouse model of Hirschsprung disease, 8-11 Avril, Development of the Enteric Nervous System: cells, signals, genes and therapy, Boston (MA) USA.

Touré AM, Charrier B, and Pilon N (2015). Un nouveau modèle de souris pour la maladie de Hirschsprung chez les adolescents et les adultes. 11ième colloque annuel de Biomed. St-Adèle (Qc) Canada.

Cardinal T, Bergeron KF, Touré AM et Pilon N. (2015). Utilisation de la lignée de souris *TashT* pour bien comprendre le biais mâle de la maladie de Hirschsprung. 11ième colloque annuel de Biomed. St-Adèle (Qc) Canada.

Pilon N, Bergeron KF, Cardinal T, Soret R, Touré AM, Bélanger C and Silversides DW. (2015). A forward genetic screen identifies three new mouse models of aganglionic megacolon. 4th international symposium on Enteric nervous system development. Rotterdam. Pays-Bas.

Cardinal T, Bergeron K-F, Touré AM and Pilon N. (2015). Using the *TashT* mouse line to better understand the sexual dimorphism in Hirschsprung disease. 4th international symposium on Enteric nervous system development. Rotterdam. Pays-Bas.

Touré AM, Charrier B, Deschambault V and Pilon N (2014). The *TashT* locus genetically interacts with other Hirschsprung's disease-associated loci in a male-biased manner. 7th Canadian Developmental Biology Conference and the 5th Canada Regional SDB Conference 2014 at Mont-Tremblant, (Qc) Canada.

Bergeron KF, Cardinal T, Touré AM and Pilon N. (2014). Strong male sex bias in a new mouse model of Hirschsprung's disease. 2014 European Human Genetics Conference. Milan. Italie

Cardinal T, Bergeron KF, Touré AM et Pilon N. (2014). Fort biais mâle dans un modèle de souris de la maladie de Hirschsprung causée par la surexpression du gène *Fam162b*. Colloque La recherche en santé. Montréal (Qc) Canada.

Bergeron KF, Cardinal T, Touré AM and Pilon N. (2014). *TashT* is a novel mouse model that phenocopies both the variable penetrance and male sex-bias of Hirschsprung's disease. 7th Canadian Developmental Biology Conference. Montréal, (Qc) Canada.

Cardinal T, Bergeron K-F, Touré AM and Pilon N. (2013). Caractérisation moléculaire et cellulaire des précurseurs neuraux entériques de la souris *TashT*. 9th annual symposium of the Biomed Research Center. Montréal, (Qc) Canada.

Cardinal T, Bergeron KF, Touré AM and Pilon N. (2013). Molecular and cellular characterization of *TashT* enteric neural precursors. 1st Mostly Mammals in Montreal (M3) meeting. Montréal, (Qc) Canada.

Touré AM, Bergeron KF, Cardinal T, Silversides DW and Pilon N. (2013). *TashT* is a novel sex-influenced locus critical for proper development of the enteric nervous system. 1st Mostly Mammals in Montreal (M3) meeting. Montréal, (Qc) Canada.

Touré AM, Bergeron KF, Cardinal T, Béland M, Silversides DW and Pilon N. (2012). *TashT*, a novel mouse model for Hirschsprung disease. Society for Developmental Biology 71st international meeting. Montreal, (Qc) Canada.

Bergeron K-F, Cardinal T, Touré AM, Béland M, Souchkova O, Raiwet DL, Silversides DW and Pilon N. (2011). Novel mouse models for Hirschsprung disease. 2011 Montreal Area Developmental Biology Symposium. Montréal, (Qc) Canada.

Touré AM and Pilon N (2011). Characterization of a new model of mouse for Hirschsprung's disease. 2011 Ph.D. project, conference on Modern Problems of Genetics dedicated to the 35th Anniversary of the Department of Genetics. Kazan Federal University, Kazan, Tatarstan, Russian Federation.

APPENDICE C : PRIX ET DISTINCTIONS

Bourse de participation à un congrès (2016), Département de chimie de la Faculté des Sciences de l'Université du Québec à Montréal (UQAM).

Bourse Hydro –Québec (2015), Faculté des Sciences de l'UQAM.

Bourse d'Exemption de Frais de Scolarité Supplémentaire pour étudiants étrangers (2012-2016), Faculté des Sciences de l'UQAM.

Bourse d'Excellence de Doctorat en Recherche pour Étudiants Étrangers (2012-2015), FRQNT (Fonds de Recherche du Québec – Nature et Technologie).

Bourse de Perfectionnement en Français (2011-2012), Fondation de l'UQAM.

Bourse d'Excellence Lapointe-Rosendahl en biochimie (2011-2012), Fondation de l'UQAM.

Bourse d'Excellence FARE, Hydro –Québec, Faculté des Sciences de l'UQAM.

Bourse d'Exemption de Frais de Scolarité Supplémentaire pour étudiants étrangers (2011-2012), Ministère de l'Éducation, du Loisir et du Sport du Québec via l'Ambassade du Mali au Canada.

Soutien à la formation (2011-2014), PFF (Programme Formation des Formateurs) de l'Université de Bamako.

Bourse d'Études Universitaires (2003-2009) Fédération de Russie/République du Mali.

BIBLIOGRAPHIE

- Abdo, H., Derkinderen, P., Gomes, P., Chevalier, J., Aubert, P., Masson, D., Lardeux, B. (2010). Enteric glial cells protect neurons from oxidative stress in part via reduced glutathione. *FASEB J*, 24(4), 1082-1094. doi: 10.1096/fj.09-139519
- Ahlman, H. et Nilsson. (2001). The gut as the largest endocrine organ in the body. *Ann Oncol*, 12 Suppl 2, S63-68.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. et Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, 215(3), 403-410. doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2
- Alves, M. M., Sribudiani, Y., Brouwer, R. W., Amiel, J., Antinolo, G., Borrego, S., Hofstra, R. M. (2013). Contribution of rare and common variants determine complex diseases-Hirschsprung disease as a model. *Dev Biol*, 382(1), 320-329. doi: 10.1016/j.ydbio.2013.05.019
- Amiel, J., Attie, T., Jan, D., Pelet, A., Edery, P., Bidaud, C., Lyonnet, S. (1996). Heterozygous endothelin receptor B (EDNRB) mutations in isolated Hirschsprung disease. *Hum Mol Genet*, 5(3), 355-357.
- Amiel, J., Sproat-Emison, E., Garcia-Barcelo, M., Lantieri, F., Burzynski, G., Borrego, S., Hirschsprung Disease, C. (2008). Hirschsprung disease, associated syndromes and genetics: a review. *J Med Genet*, 45(1), 1-14. doi: 10.1136/jmg.2007.053959
- Anderson, R. B., Stewart, A. L. et Young, H. M. (2006). Phenotypes of neural-crest-derived cells in vagal and sacral pathways. *Cell Tissue Res*, 323(1), 11-25. doi: 10.1007/s00441-005-0047-6
- Angrist, M., Bolk, S., Halushka, M., Lapchak, P. A. et Chakravarti, A. (1996). Germline mutations in glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) and

- RET in a Hirschsprung disease patient. *Nat Genet*, 14(3), 341-344. doi: 10.1038/ng1196-341
- Angrist, M., Bolk, S., Thiel, B., Puffenberger, E. G., Hofstra, R. M., Buys, C. H., Chakravarti, A. (1995). Mutation analysis of the RET receptor tyrosine kinase in Hirschsprung disease. *Hum Mol Genet*, 4(5), 821-830.
- Anitha, M., Vijay-Kumar, M., Sitaraman, S. V., Gewirtz, A. T. et Srinivasan, S. (2012). Gut microbial products regulate murine gastrointestinal motility via Toll-like receptor 4 signaling. *Gastroenterology*, 143(4), 1006-1016 e1004. doi: 10.1053/j.gastro.2012.06.034
- Antonellis, A., Bennett, W. R., Menhenniott, T. R., Prasad, A. B., Lee-Lin, S. Q., Program, N. C. S., Ward, A. (2006). Deletion of long-range sequences at Sox10 compromises developmental expression in a mouse model of Waardenburg-Shah (WS4) syndrome. *Hum Mol Genet*, 15(2), 259-271. doi: 10.1093/hmg/ddi442
- Attie, T., Pelet, A., Edery, P., Eng, C., Mulligan, L. M., Amiel, J., et al. (1995). Diversity of RET proto-oncogene mutations in familial and sporadic Hirschsprung disease. *Hum Mol Genet*, 4(8), 1381-1386.
- Auricchio, A., Casari, G., Staiano, A. et Ballabio, A. (1996). Endothelin-B receptor mutations in patients with isolated Hirschsprung disease from a non-inbred population. *Hum Mol Genet*, 5(3), 351-354.
- Auricchio, A., Griseri, P., Carpentieri, M. L., Betsos, N., Staiano, A., Tozzi, A., Ceccherini, I. (1999). Double heterozygosity for a RET substitution interfering with splicing and an EDNRB missense mutation in Hirschsprung disease. *Am J Hum Genet*, 64(4), 1216-1221.
- Aziz, Q., Dore, J., Emmanuel, A., Guarner, F. et Quigley, E. M. (2013). Gut microbiota and gastrointestinal health: current concepts and future directions. *Neurogastroenterol Motil*, 25(1), 4-15. doi: 10.1111/nmo.12046
- Barajon, I., Serrao, G., Arnaboldi, F., Opizzi, E., Ripamonti, G., Balsari, A. et Rumio, C. (2009). Toll-like receptors 3, 4, and 7 are expressed in the enteric nervous

- system and dorsal root ganglia. *J Histochem Cytochem*, 57(11), 1013-1023. doi: 10.1369/jhc.2009.953539
- Barlow, A., de Graaff, E. et Pachnis, V. (2003). Enteric nervous system progenitors are coordinately controlled by the G protein-coupled receptor EDNRB and the receptor tyrosine kinase RET. *Neuron*, 40(5), 905-916.
- Barlow, A. J., Dixon, J., Dixon, M. et Trainor, P. A. (2013). Tcof1 acts as a modifier of Pax3 during enteric nervous system development and in the pathogenesis of colonic aganglionosis. *Hum Mol Genet*, 22(6), 1206-1217. doi: 10.1093/hmg/dd528
- Barlow, A. J., Wallace, A. S., Thapar, N. et Burns, A. J. (2008). Critical numbers of neural crest cells are required in the pathways from the neural tube to the foregut to ensure complete enteric nervous system formation. *Development*, 135(9), 1681-1691. doi: 10.1242/dev.017418
- Bayliss, W. M. et Starling, E. H. (1899). The movements and innervation of the small intestine. *J Physiol*, 24(2), 99-143.
- Baynash, A. G., Hosoda, K., Giaid, A., Richardson, J. A., Emoto, N., Hammer, R. E. et Yanagisawa, M. (1994). Interaction of endothelin-3 with endothelin-B receptor is essential for development of epidermal melanocytes and enteric neurons. *Cell*, 79(7), 1277-1285.
- Bergeron, K. F., Cardinal, T., Toure, A. M., Beland, M., Raiwet, D. L., Silversides, D. W. et Pilon, N. (2015). Male-biased aganglionic megacolon in the TashT mouse line due to perturbation of silencer elements in a large gene desert of chromosome 10. *PLoS Genet*, 11(3), e1005093. doi: 10.1371/journal.pgen.1005093
- 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

- Bergeron, K. F., Silversides, D. W. et Pilon, N. (2013, Jan). The developmental genetics of Hirschsprung's disease. *Clin Genet*, 83(1), 15-22. doi: 10.1111/cge.12032
- Bernex, F., De Sepulveda, P., Kress, C., Elbaz, C., Delouis, C. et Panthier, J. J. (1996). Spatial and temporal patterns of c-kit-expressing cells in *WlacZ/+* and *WlacZ/WlacZ* mouse embryos. *Development*, 122(10), 3023-3033.
- Bettolli, M., De Carli, C., Jolin-Dahel, K., Bailey, K., Khan, H. F., Sweeney, B., Rubin, S. (2008). Colonic dysmotility in postsurgical patients with Hirschsprung's disease. Potential significance of abnormalities in the interstitial cells of Cajal and the enteric nervous system. *J Pediatr Surg*, 43(8), 1433-1438. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2007.10.067
- Bidaud, C., Salomon, R., Van Camp, G., Pelet, A., Attie, T., Eng, C., Lyonnet, S. (1997). Endothelin-3 gene mutations in isolated and syndromic Hirschsprung disease. *Eur J Hum Genet*, 5(4), 247-251.
- Blair, P. J., Rhee, P. L., Sanders, K. M. et Ward, S. M. (2014). The significance of interstitial cells in neurogastroenterology. *J Neurogastroenterol Motil*, 20(3), 294-317. doi: 10.5056/jnm14060
- 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
- Boesmans, W., Martens, M. A., Weltens, N., Hao, M. M., Tack, J., Cirillo, C. et Vanden Berghe, P. (2013). Imaging neuron-glia interactions in the enteric nervous system. *Front Cell Neurosci*, 7, 183. doi: 10.3389/fncel.2013.00183
- Bondurand, N., Natarajan, D., Barlow, A., Thapar, N. et Pachnis, V. (2006). Maintenance of mammalian enteric nervous system progenitors by SOX10 and endothelin 3 signalling. *Development*, 133(10), 2075-2086. doi: 10.1242/dev.02375
- Bondurand, N. et Southard-Smith, E. M. (2016). Mouse models of Hirschsprung disease and other developmental disorders of the enteric nervous system: Old and new players. *Dev Biol*, 417(2), 139-157. doi: 10.1016/j.ydbio.2016.06.042

- Braun, N., Seigny, J., Robson, S. C., Hammer, K., Hanani, M. et Zimmermann, H. (2004). Association of the ecto-ATPase NTPDase2 with glial cells of the peripheral nervous system. *Glia*, 45(2), 124-132. doi: 10.1002/glia.10309
- Broders-Bondon, F., Paul-Gilloteaux, P., Carlier, C., Radice, G. L. et Dufour, S. (2012). N-cadherin and beta1-integrins cooperate during the development of the enteric nervous system. *Dev Biol*, 364(2), 178-191. doi: 10.1016/j.ydbio.2012.02.001
- Brookes, S. J. (2001). Classes of enteric nerve cells in the guinea-pig small intestine. *Anat Rec*, 262(1), 58-70.
- Brooks, A. S., Bertoli-Avella, A. M., Burzynski, G. M., Breedveld, G. J., Osinga, J., Boven, L. G., Hofstra, R. M. (2005). Homozygous nonsense mutations in KIAA1279 are associated with malformations of the central and enteric nervous systems. *Am J Hum Genet*, 77(1), 120-126. doi: 10.1086/431244
- Brun, P., Giron, M. C., Qesari, M., Porzionato, A., Caputi, V., Zoppellaro, C., Castagliuolo, I. (2013). Toll-like receptor 2 regulates intestinal inflammation by controlling integrity of the enteric nervous system. *Gastroenterology*, 145(6), 1323-1333. doi: 10.1053/j.gastro.2013.08.047
- 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.
- Burns, A. J. et Le Douarin, N. M. (2001). Enteric nervous system development: analysis of the selective developmental potentialities of vagal and sacral neural crest cells using quail-chick chimeras. *Anat Rec*, 262(1), 16-28.
- Burns, A. J. et Pachnis, V. (2009). Development of the enteric nervous system: bringing together cells, signals and genes. *Neurogastroenterol Motil*, 21(2), 100-102. doi: 10.1111/j.1365-2982.2008.01255.x
- Burns, A. J., Roberts, R. R., Bornstein, J. C. et Young, H. M. (2009). Development of the enteric nervous system and its role in intestinal motility during fetal and

- early postnatal stages. *Semin Pediatr Surg*, 18(4), 196-205. doi: 10.1053/j.sempedsurg.2009.07.001
- Burzynski, G. M., Nolte, I. M., Bronda, A., Bos, K. K., Osinga, J., Plaza Menacho, I., Hofstra, R. M. (2005). Identifying candidate Hirschsprung disease-associated RET variants. *Am J Hum Genet*, 76(5), 850-858. doi: 10.1086/429589
- Cannon, W. B. (1907). Oesophageal peristalsis after bilateral vagotom. *Am. J. Physiol*, 19(3), 436-444. doi: 0.1152/ajplegacy.1907.19.3.436
- Cantrell, V. A., Owens, S. E., Chandler, R. L., Airey, D. C., Bradley, K. M., Smith, J. R. et Southard-Smith, E. M. (2004). Interactions between Sox10 and EdnrB modulate penetrance and severity of aganglionosis in the Sox10Dom mouse model of Hirschsprung disease. *Hum Mol Genet*, 13(19), 2289-2301. doi: 10.1093/hmg/ddh243
- Caputi, V., Marsilio, I., Filpa, V., Cerantola, S., Orso, G., Bistoletti, M., Giron, M. C. (2017). Antibiotic-induced dysbiosis of the microbiota impairs gut neuromuscular function in juvenile mice. *Br J Pharmacol*, 174(20), 3623-3639. doi: 10.1111/bph.13965
- Carrasquillo, M. M., McCallion, A. S., Puffenberger, E. G., Kashuk, C. S., Nouri, N. et Chakravarti, A. (2002). Genome-wide association study and mouse model identify interaction between RET and EDNRB pathways in Hirschsprung disease. *Nat Genet*, 32(2), 237-244. doi: 10.1038/ng998
- Charrier, B. et Pilon, N. (2017). Toward a better understanding of enteric gliogenesis. *Neurogenesis (Austin)*, 4(1), e1293958. doi: 10.1080/23262133.2017.1293958
- Cheng, L. S., Schwartz, D. M., Hotta, R., Graham, H. K. et Goldstein, A. M. (2016). Bowel dysfunction following pullthrough surgery is associated with an overabundance of nitrergic neurons in Hirschsprung disease. *J Pediatr Surg*, 51(11), 1834-1838. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2016.08.001
- Cheng, Z., Dhall, D., Zhao, L., Wang, H. L., Doherty, T. M., Bresee, C. et Frykman, P. K. (2010). Murine model of Hirschsprung-associated enterocolitis. I: phenotypic characterization with development of a histopathologic grading system. *J Pediatr Surg*, 45(3), 475-482. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2009.06.009

- Coelho-Aguiar Jde, M., Bon-Frauches, A. C., Gomes, A. L., Verissimo, C. P., Aguiar, D. P., Matias, D., Moura-Neto, V. (2015). The enteric glia: identity and functions. *Glia*, 63(6), 921-935. doi: 10.1002/glia.22795
- Collins, J., Borojevic, R., Verdu, E. F., Huizinga, J. D. et Ratcliffe, E. M. (2014). Intestinal microbiota influence the early postnatal development of the enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil*, 26(1), 98-107. doi: 10.1111/nmo.12236
- Corpening, J. C., Deal, K. K., Cantrell, V. A., Skelton, S. B., Buehler, D. P. et Southard-Smith, E. M. (2011). Isolation and live imaging of enteric progenitors based on Sox10-Histone2BVenus transgene expression. *Genesis*, 49(7), 599-618. doi: 10.1002/dvg.20748
- Coutaud, B. et Pilon, N. (2013). Characterization of a novel transgenic mouse line expressing Cre recombinase under the control of the Cdx2 neural specific enhancer. *Genesis*, 51(11), 777-784. doi: 10.1002/dvg.22421
- Coyle, D., O'Donnell, A. M., Gillick, J. et Puri, P. (2016). Altered neurotransmitter expression profile in the ganglionic bowel in Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg*, 51(5), 762-769. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2016.02.018
- Cryan, J. F. et O'Mahony, S. M. (2011). The microbiome-gut-brain axis: from bowel to behavior. *Neurogastroenterol Motil*, 23(3), 187-192. doi: 10.1111/j.1365-2982.2010.01664.x
- D'Autreaux, F., Margolis, K. G., Roberts, J., Stevanovic, K., Mawe, G., Li, Z., Gershon, M. D. (2011). Expression level of Hand2 affects specification of enteric neurons and gastrointestinal function in mice. *Gastroenterology*, 141(2), 576-587. doi: 10.1053/j.gastro.2011.04.059
- de Graaff, E., Srinivas, S., Kilkenny, C., D'Agati, V., Mankoo, B. S., Costantini, F. et Pachnis, V. (2001). Differential activities of the RET tyrosine kinase receptor isoforms during mammalian embryogenesis. *Genes Dev*, 15(18), 2433-2444. doi: 10.1101/gad.205001

- de Pontual, L., Pelet, A., Trochet, D., Jaubert, F., Espinosa-Parrilla, Y., Munnich, A., Amiel, J. (2006). Mutations of the RET gene in isolated and syndromic Hirschsprung's disease in human disclose major and modifier alleles at a single locus. *J Med Genet*, 43(5), 419-423. doi: 10.1136/jmg.2005.040113
- De Vadder, F., Grasset, E., Manneras Holm, L., Karsenty, G., Macpherson, A. J., Olofsson, L. E. et Backhed, F. (2018, Jun 19). Gut microbiota regulates maturation of the adult enteric nervous system via enteric serotonin networks. *Proc Natl Acad Sci USA*, 115(25), 6458-6463. doi: 10.1073/pnas.1720017115
- Der-Silaphet, T., Malysz, J., Hagel, S., Larry Arsenault, A. et Huizinga, J. D. (1998). Interstitial cells of cajal direct normal propulsive contractile activity in the mouse small intestine. *Gastroenterology*, 114(4), 724-736.
- DeSantis, T. Z., Hugenholtz, P., Larsen, N., Rojas, M., Brodie, E. L., Keller, K., Andersen, G. L. (2006). Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl Environ Microbiol*, 72(7), 5069-5072. doi: 10.1128/AEM.03006-05
- Di Mauro, A., Neu, J., Riezzo, G., Raimondi, F., Martinelli, D., Francavilla, R. et Indrio, F. (2013). Gastrointestinal function development and microbiota. *Ital J Pediatr*, 39, 15. doi: 10.1186/1824-7288-39-15
- Doray, B., Salomon, R., Amiel, J., Pelet, A., Touraine, R., Billaud, M., Lyonnet, S. (1998). Mutation of the RET ligand, neurturin, supports multigenic inheritance in Hirschsprung disease. *Hum Mol Genet*, 7(9), 1449-1452.
- Druckenbrod, N. R. et Epstein, M. L. (2005). The pattern of neural crest advance in the cecum and colon. *Dev Biol*, 287(1), 125-133. doi: 10.1016/j.ydbio.2005.08.040
- Druckenbrod, N. R. et Epstein, M. L. (2007). Behavior of enteric neural crest-derived cells varies with respect to the migratory wavefront. *Dev Dyn*, 236(1), 84-92. doi: 10.1002/dvdy.20974
- Durbec, P. L., Larsson-Blomberg, L. B., Schuchardt, A., Costantini, F. et Pachnis, V. (1996). Common origin and developmental dependence on c-ret of subsets of enteric and sympathetic neuroblasts. *Development*, 122(1), 349-358.

- Edery, P., Lyonnet, S., Mulligan, L. M., Pelet, A., Dow, E., Abel, L., Munnich, A. (1994). Mutations of the RET proto-oncogene in Hirschsprung's disease. *Nature*, 367(6461), 378-380. doi: 10.1038/367378a0
- Edgar, R. C., Haas, B. J., Clemente, J. C., Quince, C. et Knight, R. (2011). UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*, 27(16), 2194-2200. doi: 10.1093/bioinformatics/btr381
- El-Sharkawy, T. Y., Markus, H. et Diamant, N. E. (1982). Neural control of the intestinal migrating myoelectric complex. A pharmacological analysis. *Can J Physiol Pharmacol*, 60(6), 794-804.
- Emison, E. S., McCallion, A. S., Kashuk, C. S., Bush, R. T., Grice, E., Lin, S., Chakravarti, A. (2005). A common sex-dependent mutation in a RET enhancer underlies Hirschsprung disease risk. *Nature*, 434(7035), 857-863. doi: 10.1038/nature03467
- Enomoto, H., Araki, T., Jackman, A., Heuckeroth, R. O., Snider, W. D., Johnson, E. M., Jr. et Milbrandt, J. (1998). GFR α 1-deficient mice have deficits in the enteric nervous system and kidneys. *Neuron*, 21(2), 317-324.
- Epperson, A., Hatton, W. J., Callaghan, B., Doherty, P., Walker, R. L., Sanders, K. M., Horowitz, B. (2000). Molecular markers expressed in cultured and freshly isolated interstitial cells of Cajal. *Am J Physiol Cell Physiol*, 279(2), C529-539. doi: 10.1152/ajpcell.2000.279.2.C529
- Fink, S. (1959). The intraluminal pressures in the intact human intestine. *Gastroenterology*, 36(5), 661-671.
- Fletcher, E. L., Clark, M. J. et Furness, J. B. (2002). Neuronal and glial localization of GABA transporter immunoreactivity in the myenteric plexus. *Cell Tissue Res*, 308(3), 339-346. doi: 10.1007/s00441-002-0566-3
- Foong, J. P. (2016). Postnatal Development of the Mouse Enteric Nervous System. *Adv Exp Med Biol*, 891, 135-143. doi: 10.1007/978-3-319-27592-5_13

- Friedmacher, F. et Puri, P. (2013). Classification and diagnostic criteria of variants of Hirschsprung's disease. *Pediatr Surg Int*, 29(9), 855-872. doi: 10.1007/s00383-013-3351-3
- Frykman, P. K., Nordenskjold, A., Kawaguchi, A., Hui, T. T., Granstrom, A. L., Cheng, Z., Group, H. C. R. (2015). Characterization of Bacterial and Fungal Microbiome in Children with Hirschsprung Disease with and without a History of Enterocolitis: A Multicenter Study. *PLoS One*, 10(4), e0124172. doi: 10.1371/journal.pone.0124172
- Frykman, P. K. et Short, S. S. (2012). Hirschsprung-associated enterocolitis: prevention and therapy. *Semin Pediatr Surg*, 21(4), 328-335. doi: 10.1053/j.sempedsurg.2012.07.007
- Fu, M., Sato, Y., Lyons-Warren, A., Zhang, B., Kane, M. A., Napoli, J. L. et Heuckeroth, R. O. (2010). Vitamin A facilitates enteric nervous system precursor migration by reducing Pten accumulation. *Development*, 137(4), 631-640. doi: 10.1242/dev.040550
- Furness, J. B. (2000). Types of neurons in the enteric nervous system. *J Auton Nerv Syst*, 81(1-3), 87-96.
- Furness, J. B. (2012). The enteric nervous system and neurogastroenterology. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 9(5), 286-294. doi: 10.1038/nrgastro.2012.32
- Furness, J. B. (2015). Enteric Nervous System: Structure, Relationships and Functions. *Reference Module in Biomedical Sciences*. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.04584-0>
- 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
- Garcia-Barcelo, M. M., Tang, C. S., Ngan, E. S., Lui, V. C., Chen, Y., So, M. T., Tam, P. K. (2009). Genome-wide association study identifies NRG1 as a susceptibility locus for Hirschsprung's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(8), 2694-2699. doi: 10.1073/pnas.0809630105

- Gariepy, C. E. (2004). Developmental disorders of the enteric nervous system: genetic and molecular bases. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 39(1), 5-11.
- gEnomoto, H., Araki, T., Jackman, A., Heuckeroth, R. O., Snider, W. D., Johnson, E. M., Jr. et Milbrandt, J. (1998). GFR alpha1-deficient mice have deficits in the enteric nervous system and kidneys. *Neuron*, 21(2), 317-324.
- Gianino, S., Grider, J. R., Cresswell, J., Enomoto, H. et Heuckeroth, R. O. (2003). GDNF availability determines enteric neuron number by controlling precursor proliferation. *Development*, 130(10), 2187-2198.
- 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
- Gosain, A. et Brinkman, A. S. (2015). Hirschsprung's associated enterocolitis. *Curr Opin Pediatr*, 27(3), 364-369. doi: 10.1097/MOP.0000000000000210
- Grasa, L., Abecia, L., Forcen, R., Castro, M., de Jalon, J. A., Latorre, E., Murillo, M. D. (2015). Antibiotic-Induced Depletion of Murine Microbiota Induces Mild Inflammation and Changes in Toll-Like Receptor Patterns and Intestinal Motility. *Microb Ecol*, 70(3), 835-848. doi: 10.1007/s00248-015-0613-8
- Green, S. A., Simoes-Costa, M. et Bronner, M. E. (2015). Evolution of vertebrates as viewed from the crest. *Nature*, 520(7548), 474-482. doi: 10.1038/nature14436
- Grider, J. R., Kuemmerle, J. F. et Jin, J. G. (1996). 5-HT released by mucosal stimuli initiates peristalsis by activating 5-HT₄/5-HT_{1p} receptors on sensory CGRP neurons. *Am J Physiol*, 270(5 Pt 1), G778-782. doi: 10.1152/ajpgi.1996.270.5.G778
- Griseri, P., Lantieri, F., Puppo, F., Bachetti, T., Di Duca, M., Ravazzolo, R. et Ceccherini, I. (2007). A common variant located in the 3'UTR of the RET gene is associated with protection from Hirschsprung disease. *Hum Mutat*, 28(2), 168-176. doi: 10.1002/humu.20397

- Grubisic, V. et Gulbransen, B. D. (2017). Enteric glia: the most alimentary of all glia. *J Physiol*, 595(2), 557-570. doi: 10.1113/JP271021
- Gui, H., Schriemer, D., Cheng, W. W., Chauhan, R. K., Antinolo, G., Berrios, C., Hofstra, R. M. (2017). Whole exome sequencing coupled with unbiased functional analysis reveals new Hirschsprung disease genes. *Genome Biol*, 18(1), 48. doi: 10.1186/s13059-017-1174-6
- Guinane, C. M. et Cotter, P. D. (2013). Role of the gut microbiota in health and chronic gastrointestinal disease: understanding a hidden metabolic organ. *Therap Adv Gastroenterol*, 6(4), 295-308. doi: 10.1177/1756283X13482996
- Gulbransen, B. D. (2014). Enteric Nervous System: Glial Cells and Interstitial Cells of Cajal. *Reference Module in Biomedical Sciences*. doi: org/10.1016/B978-0-12-801238-3.04583-9
- 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
- Hansen, M. B. (2003). The enteric nervous system I: organisation and classification. *Pharmacol Toxicol*, 92(3), 105-113.
- 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
- Hatzipetros, T., Bogdanik, L. P., Tassinari, V. R., Kidd, J. D., Moreno, A. J., Davis, C., Perrin, S. (2014). C57BL/6J congenic Prp-TDP43A315T mice develop progressive neurodegeneration in the myenteric plexus of the colon without exhibiting key features of ALS. *Brain Res*, 1584, 59-72. doi: 10.1016/j.brainres.2013.10.013
- Heanue, T. A. et Pachnis, V. (2007). Enteric nervous system development and Hirschsprung's disease: advances in genetic and stem cell studies. *Nat Rev Neurosci*, 8(6), 466-479. doi: 10.1038/nrn2137

- Hearn, C. J., Murphy, M. et Newgreen, D. (1998). GDNF and ET-3 differentially modulate the numbers of avian enteric neural crest cells and enteric neurons in vitro. *Dev Biol*, 197(1), 93-105. doi: 10.1006/dbio.1998.8876
- Heath, J. K. (2010). Transcriptional networks and signaling pathways that govern vertebrate intestinal development. *Curr Top Dev Biol*, 90, 159-192. doi: 10.1016/S0070-2153(10)90004-5
- Heuckeroth, R. O. (2018). Hirschsprung disease - integrating basic science and clinical medicine to improve outcomes. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 15(3), 152-167. doi: 10.1038/nrgastro.2017.149
- Heuckeroth, R. O. et Schafer, K. H. (2016). Gene-environment interactions and the enteric nervous system: Neural plasticity and Hirschsprung disease prevention. *Dev Biol*, 417(2), 188-197. doi: 10.1016/j.ydbio.2016.03.017
- Hirst, G. D. et Edwards, F. R. (2001). Generation of slow waves in the antral region of guinea-pig stomach--a stochastic process. *J Physiol*, 535(Pt 1), 165-180.
- Hofstra, R. M., Valdenaire, O., Arch, E., Osinga, J., Kroes, H., Loffler, B. M., Buys, C. H. (1999). A loss-of-function mutation in the endothelin-converting enzyme 1 (ECE-1) associated with Hirschsprung disease, cardiac defects, and autonomic dysfunction. *Am J Hum Genet*, 64(1), 304-308. doi: 10.1086/302184
- Hooper, L. V., Littman, D. R. et Macpherson, A. J. (2012). Interactions between the microbiota and the immune system. *Science*, 336(6086), 1268-1273. doi: 10.1126/science.1223490
- Hosoda, K., Hammer, R. E., Richardson, J. A., Baynash, A. G., Cheung, J. C., Giaid, A. et Yanagisawa, M. (1994). Targeted and natural (piebald-lethal) mutations of endothelin-B receptor gene produce megacolon associated with spotted coat color in mice. *Cell*, 79(7), 1267-1276.
- Huang, X. et Saint-Jeannet, J. P. (2004). Induction of the neural crest and the opportunities of life on the edge. *Dev Biol*, 275(1), 1-11. doi: 10.1016/j.ydbio.2004.07.033

- Huizinga, J. D., Berezin, I., Sircar, K., Hewlett, B., Donnelly, G., Bercik, P., Jacobson, K. (2001). Development of interstitial cells of Cajal in a full-term infant without an enteric nervous system. *Gastroenterology*, 120(2), 561-567.
- Huizinga, J. D., Zarate, N. et Farrugia, G. (2009). Physiology, injury, and recovery of interstitial cells of Cajal: basic and clinical science. *Gastroenterology*, 137(5), 1548-1556. doi: 10.1053/j.gastro.2009.09.023
- Ivanchuk, S. M., Myers, S. M., Eng, C. et Mulligan, L. M. (1996, Dec). De novo mutation of GDNF, ligand for the RET/GDNFR-alpha receptor complex, in Hirschsprung disease. *Hum Mol Genet*, 5(12), 2023-2026.
- Jannot, A. S., Pelet, A., Henrion-Caude, A., Chaoui, A., Masse-Morel, M., Arnold, S., Lyonnet, S. (2013). Chromosome 21 scan in Down syndrome reveals DSCAM as a predisposing locus in Hirschsprung disease. *PLoS One*, 8(5), e62519. doi: 10.1371/journal.pone.0062519
- Jarvi, K., Laitakari, E. M., Koivusalo, A., Rintala, R. J. et Pakarinen, M. P. (2010). Bowel function and gastrointestinal quality of life among adults operated for Hirschsprung disease during childhood: a population-based study. *Ann Surg*, 252(6), 977-981. doi: 10.1097/SLA.0b013e3182018542
- Jessen, K. R. et Mirsky, R. (1983). Astrocyte-like glia in the peripheral nervous system: an immunohistochemical study of enteric glia. *J Neurosci*, 3(11), 2206-2218.
- Jiang, Q., Ho, Y. Y., Hao, L., Nichols Berrios, C. et Chakravarti, A. (2011). Copy number variants in candidate genes are genetic modifiers of Hirschsprung disease. *PLoS One*, 6(6), e21219. doi: 10.1371/journal.pone.0021219
- Johnson, C. D., Barlow-Anacker, A. J., Pierre, J. F., Touw, K., Erickson, C. S., Furness, J. B., Gosain, A. (2018). Deletion of choline acetyltransferase in enteric neurons results in postnatal intestinal dysmotility and dysbiosis. *FASEB J*, fj201701474RR. doi: 10.1096/fj.201701474RR
- Kabouridis, P. S., Lasrado, R., McCallum, S., Chng, S. H., Snippet, H. J., Clevers, H., Pachnis, V. (2015). Microbiota controls the homeostasis of glial cells in the gut lamina propria. *Neuron*, 85(2), 289-295. doi: 10.1016/j.neuron.2014.12.037

- Kapur, R. P. (2000). Colonization of the murine hindgut by sacral crest-derived neural precursors: experimental support for an evolutionarily conserved model. *Dev Biol*, 227(1), 146-155. doi: 10.1006/dbio.2000.9886
- Kapur, R. P., Yost, C. et Palmiter, R. D. (1992). A transgenic model for studying development of the enteric nervous system in normal and aganglionic mice. *Development*, 116(1), 167-175.
- Kellow, J. E., Borody, T. J., Phillips, S. F., Tucker, R. L. et Haddad, A. C. (1986). Human interdigestive motility: variations in patterns from esophagus to colon. *Gastroenterology*, 91(2), 386-395.
- Kimball, E. S., Palmer, J. M., D'Andrea, M. R., Hornby, P. J. et Wade, P. R. (2005). Acute colitis induction by oil of mustard results in later development of an IBS-like accelerated upper GI transit in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 288(6), G1266-1273. doi: 10.1152/ajpgi.00444.2004
- Kluppel, M., Huizinga, J. D., Malysz, J. et Bernstein, A. (1998). Developmental origin and Kit-dependent development of the interstitial cells of cajal in the mammalian small intestine. *Dev Dyn*, 211(1), 60-71. doi: 10.1002/(SICI)1097-0177(199801)211:1<60::AID-AJA6>3.0.CO;2-5
- Kluppel, M., Nagle, D. L., Bucan, M. et Bernstein, A. (1997). Long-range genomic rearrangements upstream of Kit dysregulate the developmental pattern of Kit expression in W57 and Wbanded mice and interfere with distinct steps in melanocyte development. *Development*, 124(1), 65-77.
- Komuro, T. (2006). Structure and organization of interstitial cells of Cajal in the gastrointestinal tract. *J Physiol*, 576(Pt 3), 653-658. doi: 10.1113/jphysiol.2006.116624
- Korpela, K., Salonen, A., Virta, L. J., Kekkonen, R. A., Forslund, K., Bork, P. et de Vos, W. M. (2016). Intestinal microbiome is related to lifetime antibiotic use in Finnish pre-school children. *Nat Commun*, 7, 10410. doi: 10.1038/ncomms10410

- Kusafuka, T., Wang, Y. et Puri, P. (1996). Novel mutations of the endothelin-B receptor gene in isolated patients with Hirschsprung's disease. *Hum Mol Genet*, 5(3), 347-349.
- Laforest-Lapointe, I., Messier, C. et Kembel, S. W. (2016). Tree phyllosphere bacterial communities: exploring the magnitude of intra- and inter-individual variation among host species. *PeerJ*, 4, e2367. doi: 10.7717/peerj.2367
- Laforest-Lapointe, I., Paquette, A., Messier, C. et Kembel, S. W. (2017). Leaf bacterial diversity mediates plant diversity and ecosystem function relationships. *Nature*, 546(7656), 145-147. doi: 10.1038/nature22399
- 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
- Lake, J. I., Tusheva, O. A., Graham, B. L. et Heuckeroth, R. O. (2013). Hirschsprung-like disease is exacerbated by reduced de novo GMP synthesis. *J Clin Invest*, 123(11), 4875-4887. doi: 10.1172/JCI69781
- Lang, D., Chen, F., Milewski, R., Li, J., Lu, M. M. et Epstein, J. A. (2000). Pax3 is required for enteric ganglia formation and functions with Sox10 to modulate expression of c-ret. *J Clin Invest*, 106(8), 963-971. doi: 10.1172/JCI10828
- Larsson, L. T., Okmian, L. et Kristoffersson, U. (1989). No correlation between hyperthermia during pregnancy and Hirschsprung disease in the offspring. *Am J Med Genet*, 32(2), 260-261. doi: 10.1002/ajmg.1320320226
- Lavoie, E. G., Gulbransen, B. D., Martin-Satue, M., Aliagas, E., Sharkey, K. A. et Sevigny, J. (2011). Ectonucleotidases in the digestive system: focus on NTPDase3 localization. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 300(4), G608-620. doi: 10.1152/ajpgi.00207.2010
- Le Douarin, N. M. et Teillet, M. A. (1973). The migration of neural crest cells to the wall of the digestive tract in avian embryo. *J Embryol Exp Morphol*, 30(1), 31-48.

- Lecerf, L., Kavo, A., Ruiz-Ferrer, M., Baral, V., Watanabe, Y., Chaoui, A., Bondurand, N. (2014). An impairment of long distance SOX10 regulatory elements underlies isolated Hirschsprung disease. *Hum Mutat*, 35(3), 303-307. doi: 10.1002/humu.22499
- Lee, S. M., Wyse, A., Leshner, A., Everett, M. L., Lou, L., Holzknecht, Z. E., Parker, W. (2010). Adaptation in a mouse colony monoassociated with *Escherichia coli* K-12 for more than 1,000 days. *Appl Environ Microbiol*, 76(14), 4655-4663. doi: 10.1128/AEM.00358-10
- Leon, T. Y., Ngan, E. S., Poon, H. C., So, M. T., Lui, V. C., Tam, P. K. et Garcia-Barcelo, M. M. (2009). Transcriptional regulation of RET by Nkx2-1, Phox2b, Sox10, and Pax3. *J Pediatr Surg*, 44(10), 1904-1912. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2008.11.055
- Li, Z., Chalazonitis, A., Huang, Y. Y., Mann, J. J., Margolis, K. G., Yang, Q. M., Gershon, M. D. (2011). Essential roles of enteric neuronal serotonin in gastrointestinal motility and the development/survival of enteric dopaminergic neurons. *J Neurosci*, 31(24), 8998-9009. doi: 10.1523/JNEUROSCI.6684-10.2011
- Liu, M. T., Kuan, Y. H., Wang, J., Hen, R. et Gershon, M. D. (2009). 5-HT4 receptor-mediated neuroprotection and neurogenesis in the enteric nervous system of adult mice. *J Neurosci*, 29(31), 9683-9699. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1145-09.2009
- Lomax, A. E. et Furness, J. B. (2000). Neurochemical classification of enteric neurons in the guinea-pig distal colon. *Cell Tissue Res*, 302(1), 59-72.
- Lyster, D. J., Bywater, R. A. et Taylor, G. S. (1995). Neurogenic control of myoelectric complexes in the mouse isolated colon. *Gastroenterology*, 108(5), 1371-1378.
- Maden, M. (2007). Retinoic acid in the development, regeneration and maintenance of the nervous system. *Nat Rev Neurosci*, 8(10), 755-765. doi: 10.1038/nrn2212
- Maka, M., Stolt, C. C. et Wegner, M. (2005). Identification of Sox8 as a modifier gene in a mouse model of Hirschsprung disease reveals underlying molecular defect. *Dev Biol*, 277(1), 155-169. doi: 10.1016/j.ydbio.2004.09.014

- Maranduba, C. M., De Castro, S. B., de Souza, G. T., Rossato, C., da Guia, F. C., Valente, M. A., Silva Fde, S. (2015). Intestinal microbiota as modulators of the immune system and neuroimmune system: impact on the host health and homeostasis. *J Immunol Res*, 2015, 931574. doi: 10.1155/2015/931574
- Markle, J. G., Frank, D. N., Mortin-Toth, S., Robertson, C. E., Feazel, L. M., Rolfe-Kampczyk, U., Danska, J. S. (2013). Sex differences in the gut microbiome drive hormone-dependent regulation of autoimmunity. *Science*, 339(6123), 1084-1088. doi: 10.1126/science.1233521
- Martik, M. L. et Bronner, M. E. (2017). Regulatory Logic Underlying Diversification of the Neural Crest. *Trends Genet*, 33(10), 715-727. doi: 10.1016/j.tig.2017.07.015
- Mashimo, H., Kjellin, A. et Goyal, R. K. (2000). Gastric stasis in neuronal nitric oxide synthase-deficient knockout mice. *Gastroenterology*, 119(3), 766-773.
- McCallion, A. S., Stames, E., Conlon, R. A. et Chakravarti, A. (2003). Phenotype variation in two-locus mouse models of Hirschsprung disease: tissue-specific interaction between Ret and Ednrb. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(4), 1826-1831. doi: 10.1073/pnas.0337540100
- McDonald, D., Clemente, J. C., Kuczynski, J., Rideout, J. R., Stombaugh, J., Wendel, D., Caporaso, J. G. (2012). The Biological Observation Matrix (BIOM) format or: how I learned to stop worrying and love the ome-ome. *Gigascience*, 1(1), 7. doi: 10.1186/2047-217X-1-7
- Meulemans, D. et Bronner-Fraser, M. (2004). Gene-regulatory interactions in neural crest evolution and development. *Dev Cell*, 7(3), 291-299. doi: 10.1016/j.devcel.2004.08.007
- Moore, S. W. et Zaahl, M. G. (2012). Intronic RET gene variants in Down syndrome-associated Hirschsprung disease in an African population. *J Pediatr Surg*, 47(2), 299-302. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2011.11.018
- Musser, M. A., Correa, H. et Southard-Smith, E. M. (2015). Enteric neuron imbalance and proximal dysmotility in ganglionated intestine of the Hirschsprung mouse

- model. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 1(1), 87-101. doi: 10.1016/j.jcmgh.2014.08.002
- Musser, M. A. et Michelle Southard-Smith, E. (2013). Balancing on the crest - Evidence for disruption of the enteric ganglia via inappropriate lineage segregation and consequences for gastrointestinal function. *Dev Biol*, 382(1), 356-364. doi: 10.1016/j.ydbio.2013.01.024
- Nagahama, M., Semba, R., Tsuzuki, M. et Aoki, E. (2001). L-arginine immunoreactive enteric glial cells in the enteric nervous system of rat ileum. *Biol Signals Recept*, 10(5), 336-340. doi: 10.1159/000046901
- Nagashimada, M., Ohta, H., Li, C., Nakao, K., Uesaka, T., Brunet, J. F., Enomoto, H. (2012). Autonomic neurocristopathy-associated mutations in PHOX2B dysregulate Sox10 expression. *J Clin Invest*, 122(9), 3145-3158. doi: 10.1172/JCI63401
- Nagy, N. et Goldstein, A. M. (2006). Endothelin-3 regulates neural crest cell proliferation and differentiation in the hindgut enteric nervous system. *Dev Biol*, 293(1), 203-217. doi: 10.1016/j.ydbio.2006.01.032
- Nagy, N. et Goldstein, A. M. (2017). Enteric nervous system development: A crest cell's journey from neural tube to colon. *Semin Cell Dev Biol*, 66, 94-106. doi: 10.1016/j.semcdb.2017.01.006
- Nasser, Y., Fernandez, E., Keenan, C. M., Ho, W., Oland, L. D., Tibbles, L. A., Sharkey, K. A. (2006). Role of enteric glia in intestinal physiology: effects of the gliotoxin fluorocitrate on motor and secretory function. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 291(5), G912-927. doi: 10.1152/ajpgi.00067.2006
- Natarajan, D., Marcos-Gutierrez, C., Pachnis, V. et de Graaff, E. (2002). Requirement of signalling by receptor tyrosine kinase RET for the directed migration of enteric nervous system progenitor cells during mammalian embryogenesis. *Development*, 129(22), 5151-5160.
- 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
- Neuvonen, M. I., Korpela, K., Kyrklund, K., Rintala, R. J. et Pakarinen, M. P. (2018). Intestinal Microbiota in Hirschsprung Disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. doi: 10.1097/MPG.0000000000001999
- Neuvonen, M. I., Kyrklund, K., Rintala, R. J. et Pakarinen, M. P. (2017). Bowel Function and Quality of Life After Transanal Endorectal Pull-through for Hirschsprung Disease: Controlled Outcomes up to Adulthood. *Ann Surg*, 265(3), 622-629. doi: 10.1097/SLA.0000000000001695
- Newgreen, D. et Young, H. M. (2002). Enteric nervous system: development and developmental disturbances--part 1. *Pediatr Dev Pathol*, 5(3), 224-247. doi: 10.1007/s10024001-0142-y
- Niederreither, K., Vermot, J., Le Roux, I., Schuhbaur, B., Chambon, P. et Dolle, P. (2003). The regional pattern of retinoic acid synthesis by RALDH2 is essential for the development of posterior pharyngeal arches and the enteric nervous system. *Development*, 130(11), 2525-2534.
- Nishiyama, C., Uesaka, T., Manabe, T., Yonekura, Y., Nagasawa, T., Newgreen, D. F., Enomoto, H. (2012, Sep). Trans-mesenteric neural crest cells are the principal source of the colonic enteric nervous system. *Nat Neurosci*, 15(9), 1211-1218. doi: 10.1038/nn.3184
- Obermayr, F., Hotta, R., Enomoto, H. et Young, H. M. (2013). Development and developmental disorders of the enteric nervous system. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 10(1), 43-57. doi: 10.1038/nrgastro.2012.234
- Ochoa-Cortes, F., Turco, F., Linan-Rico, A., Soghomonyan, S., Whitaker, E., Wehner, S., Christofi, F. L. (2016). Enteric Glial Cells: A New Frontier in Neurogastroenterology and Clinical Target for Inflammatory Bowel Diseases. *Inflamm Bowel Dis*, 22(2), 433-449. doi: 10.1097/MIB.0000000000000667
- Okamoto, N., Wada, Y. et Goto, M. (1997). Hydrocephalus and Hirschsprung's disease in a patient with a mutation of L1CAM. *J Med Genet*, 34(8), 670-671.

- Parisi, M. A., Kapur, R. P., Neilson, I., Hofstra, R. M., Holloway, L. W., Michaelis, R. C. et Leppig, K. A. (2002). Hydrocephalus and intestinal aganglionosis: is L1CAM a modifier gene in Hirschsprung disease? *Am J Med Genet*, 108(1), 51-56.
- Pattyn, A., Morin, X., Cremer, H., Goridis, C. et Brunet, J. F. (1999). The homeobox gene *Phox2b* is essential for the development of autonomic neural crest derivatives. *Nature*, 399(6734), 366-370. doi: 10.1038/20700
- 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
- Pierre, J. F., Barlow-Anacker, A. J., Erickson, C. S., Heneghan, A. F., Levenson, G. E., Dowd, S. E., Gosain, A. (2014). Intestinal dysbiosis and bacterial enteroinvasion in a murine model of Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg*, 49(8), 1242-1251. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2014.01.060
- Pilon, N. (2016). Pigmentation-based insertional mutagenesis is a simple and potent screening approach for identifying neurocristopathy-associated genes in mice. *Rare Diseases*, 4(1), e1156287.
- Pingault, V., Bondurand, N., Kuhlbrodt, K., Goerich, D. E., Prehu, M. O., Puliti, A., Goossens, M. (1998). *SOX10* mutations in patients with Waardenburg-Hirschsprung disease. *Nat Genet*, 18(2), 171-173. doi: 10.1038/ng0298-171
- Qin, J., Li, R. et Raes, J. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, 464(7285), 59-65. doi: 10.1038/nature08821
- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K. S., Manichanh, C., Wang, J. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, 464(7285), 59-65. doi: 10.1038/nature08821
- Qu, Z. D., Thacker, M., Castelucci, P., Bagyanszki, M., Epstein, M. L. et Furness, J. B. (2008). Immunohistochemical analysis of neuron types in the mouse small intestine. *Cell Tissue Res*, 334(2), 147-161. doi: 10.1007/s00441-008-0684-7

- Rao, M. et Gershon, M. D. (2016). The bowel and beyond: the enteric nervous system in neurological disorders. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 13(9), 517-528. doi: 10.1038/nrgastro.2016.107
- 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*, 63(11), 2040-2057. doi: 10.1002/glia.22876
- Reikvam, D. H., Erofeev, A., Sandvik, A., Grcic, V., Jahnsen, F. L., Gaustad, P., Johansen, F. E. (2011). Depletion of murine intestinal microbiota: effects on gut mucosa and epithelial gene expression. *PLoS One*, 6(3), e17996. doi: 10.1371/journal.pone.0017996
- Rintala, R. J. et Pakarinen, M. P. (2012). Long-term outcomes of Hirschsprung's disease. *Semin Pediatr Surg*, 21(4), 336-343. doi: 10.1053/j.sempedsurg.2012.07.008
- Rivera, L. R., Poole, D. P., Thacker, M. et Furness, J. B. (2011). The involvement of nitric oxide synthase neurons in enteric neuropathies. *Neurogastroenterol Motil*, 23(11), 980-988. doi: 10.1111/j.1365-2982.2011.01780.x
- Ro, S., Hwang, S. J., Muto, M., Jewett, W. K. et Spencer, N. J. (2006). Anatomic modifications in the enteric nervous system of piebald mice and physiological consequences to colonic motor activity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 290(4), G710-718. doi: 10.1152/ajpgi.00420.2005
- Roberts, R. R., Bornstein, J. C., Bergner, A. J. et Young, H. M. (2008). Disturbances of colonic motility in mouse models of Hirschsprung's disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 294(4), G996-G1008. doi: 10.1152/ajpgi.00558.2007
- Roix, J. J., Hagge-Greenberg, A., Bissonnette, D. M., Rodick, S., Russell, L. B. et O'Brien, T. P. (2001). Molecular and functional mapping of the piebald deletion complex on mouse chromosome 14. *Genetics*, 157(2), 803-815.

- Rolig, A. S., Mittge, E. K., Ganz, J., Troll, J. V., Melancon, E., Wiles, T. J., Guillemin, K. (2017). The enteric nervous system promotes intestinal health by constraining microbiota composition. *PLoS Biol*, 15(2), e2000689. doi: 10.1371/journal.pbio.2000689
- Romanski, K. W. (2017). Importance of the enteric nervous system in the control of the migrating motility complex. *Physiol Int*, 104(2), 97-129. doi: 10.1556/2060.104.2017.2.4
- Ruhl, A., Hoppe, S., Frey, I., Daniel, H. et Schemann, M. (2005). Functional expression of the peptide transporter PEPT2 in the mammalian enteric nervous system. *J Comp Neurol*, 490(1), 1-11. doi: 10.1002/cne.20617
- Ruiz-Ferrer, M., Torroglosa, A., Luzon-Toro, B., Fernandez, R. M., Antinolo, G., Mulligan, L. M. et Borrego, S. (2011). Novel mutations at RET ligand genes preventing receptor activation are associated to Hirschsprung's disease. *J Mol Med (Berl)*, 89(5), 471-480. doi: 10.1007/s00109-010-0714-2
- Saldana-Caboverde, A., Perera, E. M., Watkins-Chow, D. E., Hansen, N. F., Vemulapalli, M., Mullikin, J. C., Kos, L. (2015). The transcription factors Ets1 and Sox10 interact during murine melanocyte development. *Dev Biol*, 407(2), 300-312. doi: 10.1016/j.ydbio.2015.04.012
- Salomon, R., Attie, T., Pelet, A., Bidaud, C., Eng, C., Amiel, J., Lyonnet, S. (1996). Germline mutations of the RET ligand GDNF are not sufficient to cause Hirschsprung disease. *Nat Genet*, 14(3), 345-347. doi: 10.1038/ng1196-345
- Sancandi, M., Ceccherini, I., Costa, M., Fava, M., Chen, B., Wu, Y., Tam, P. K. (2000). Incidence of RET mutations in patients with Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg*, 35(1), 139-142; discussion 142-133.
- Sanders, K. M. et Ward, S. M. (1992). Nitric oxide as a mediator of nonadrenergic noncholinergic neurotransmission. *Am J Physiol*, 262(3 Pt 1), G379-392. doi: 10.1152/ajpgi.1992.262.3.G379
- Sandgren, K., Larsson, L. T. et Ekblad, E. (2002). Widespread changes in neurotransmitter expression and number of enteric neurons and interstitial cells

of Cajal in lethal spotted mice: an explanation for persisting dysmotility after operation for Hirschsprung's disease? *Dig Dis Sci*, 47(5), 1049-1064.

- Sarna, S., Stoddard, C., Belbeck, L. et McWade, D. (1981). Intrinsic nervous control of migrating myoelectric complexes. *Am J Physiol*, 241(1), G16-23. doi: 10.1152/ajpgi.1981.241.1.G16
- Sasongko, T. H., Sadewa, A. H., Gunadi, Lee, M. J., Koterazawa, K. et Nishio, H. (2007). Nonsense mutations of the ZFHX1B gene in two Japanese girls with Mowat-Wilson syndrome. *Kobe J Med Sci*, 53(4), 157-162.
- Sasselli, V., Pachnis, V. et Burns, A. J. (2012). The enteric nervous system. *Dev Biol*, 366(1), 64-73. doi: 10.1016/j.ydbio.2012.01.012
- Schill, E. M., Lake, J. I., Tusheva, O. A., Nagy, N., Bery, S. K., Foster, L., Heuckeroth, R. O. (2016). Ibuprofen slows migration and inhibits bowel colonization by enteric nervous system precursors in zebrafish, chick and mouse. *Dev Biol*, 409(2), 473-488. doi: 10.1016/j.ydbio.2015.09.023
- Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, J. R., Hartmann, M., Hollister, E. B., Weber, C. F. (2009). Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol*, 75(23), 7537-7541. doi: 10.1128/AEM.01541-09
- Serbedzija, G. N., Burgan, S., Fraser, S. E. et Bronner-Fraser, M. (1991). Vital dye labelling demonstrates a sacral neural crest contribution to the enteric nervous system of chick and mouse embryos. *Development*, 111(4), 857-866.
- Sharkey, K. A. (2015). Emerging roles for enteric glia in gastrointestinal disorders. *J Clin Invest*, 125(3), 918-925. doi: 10.1172/JCI76303
- Shen, L., Pichel, J. G., Mayeli, T., Sariola, H., Lu, B. et Westphal, H. (2002). Gdnf haploinsufficiency causes Hirschsprung-like intestinal obstruction and early-onset lethality in mice. *Am J Hum Genet*, 70(2), 435-447. doi: 10.1086/338712

- Simkin, J. E., Zhang, D., Rollo, B. N. et Newgreen, D. F. (2013). Retinoic acid upregulates ret and induces chain migration and population expansion in vagal neural crest cells to colonise the embryonic gut. *PLoS One*, 8(5), e64077. doi: 10.1371/journal.pone.0064077
- Simoës-Costa, M. et Bronner, M. E. (2015). Establishing neural crest identity: a gene regulatory recipe. *Development*, 142(2), 242-257. doi: 10.1242/dev.105445
- Smith, T. K., Park, K. J. et Hennig, G. W. (2014). Colonic migrating motor complexes, high amplitude propagating contractions, neural reflexes and the importance of neuronal and mucosal serotonin. *J Neurogastroenterol Motil*, 20(4), 423-446. doi: 10.5056/jnm14092
- Soret, R., Mennetrey, M., Bergeron, K. F., Dariel, A., Neunlist, M., Grunder, F., Ente-Hirsch Study, G. (2015). A collagen VI-dependent pathogenic mechanism for Hirschsprung's disease. *J Clin Invest*, 125(12), 4483-4496. doi: 10.1172/JCI83178
- Southard-Smith, E. M., Kos, L. et Pavan, W. J. (1998). Sox10 mutation disrupts neural crest development in Dom Hirschsprung mouse model. *Nat Genet*, 18(1), 60-64. doi: 10.1038/ng0198-60
- Spencer, N. J., Kyloh, M., Wattoo, D. A., Thomas, A., Sia, T. C., Brookes, S. J. et Nicholas, S. J. (2012). Characterization of motor patterns in isolated human colon: are there differences in patients with slow-transit constipation? *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 302(1), G34-43. doi: 10.1152/ajpgi.00319.2011
- Sribudiani, Y., Metzger, M., Osinga, J., Rey, A., Burns, A. J., Thapar, N. et Hofstra, R. M. (2011). Variants in RET associated with Hirschsprung's disease affect binding of transcription factors and gene expression. *Gastroenterology*, 140(2), 572-582 e572. doi: 10.1053/j.gastro.2010.10.044
- Stanchina, L., Baral, V., Robert, F., Pingault, V., Lemort, N., Pachnis, V., Bondurand, N. (2006). Interactions between Sox10, Edn3 and Ednrb during enteric nervous system and melanocyte development. *Dev Biol*, 295(1), 232-249. doi: 10.1016/j.ydbio.2006.03.031

- Stanchina, L., Van de Putte, T., Goossens, M., Huylebroeck, D. et Bondurand, N. (2010). Genetic interaction between Sox10 and Zfhx1b during enteric nervous system development. *Dev Biol*, 341(2), 416-428. doi: 10.1016/j.ydbio.2010.02.036
- statistical, R. C. T. R. A. I. a. e. f. et computing. R Foundation for Statistical Computing, V., Austria. Récupéré de URL <http://www.R-project.org/>.
- Steinkamp, M., Schulte, N., Spaniol, U., Pfluger, C., Hartmann, C., Kirsch, J. et von Boyen, G. B. (2012). Brain derived neurotrophic factor inhibits apoptosis in enteric glia during gut inflammation. *Med Sci Monit*, 18(4), BR117-122.
- Struijs, M. C., Diamond, I. R., Pencharz, P. B., Chang, K. T., Viero, S., Langer, J. C. et Wales, P. W. (2008). Absence of the interstitial cells of Cajal in a child with chronic pseudoobstruction. *J Pediatr Surg*, 43(12), e25-29. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2008.09.017
- Szurszewski, J. H. (1969). A migrating electric complex of canine small intestine. *Am J Physiol*, 217(6), 1757-1763. doi: 10.1152/ajplegacy.1969.217.6.1757
- Takahashi, T. (2012). Mechanism of interdigestive migrating motor complex. *J Neurogastroenterol Motil*, 18(3), 246-257. doi: 10.5056/jnm.2012.18.3.246
- Tang, C. S., Li, P., Lai, F. P., Fu, A. X., Lau, S. T., So, M. T., Ngan, E. S. (2018). Identification of Genes Associated With Hirschsprung Disease, Based on Whole-Genome Sequence Analysis, and Potential Effects on Enteric Nervous System Development. *Gastroenterology*, 155(6), 1908-1922 e1905. doi: 10.1053/j.gastro.2018.09.012
- Taraviras, S., Marcos-Gutierrez, C. V., Durbec, P., Jani, H., Grigoriou, M., Sukumaran, M., Pachnis, V. (1999). Signalling by the RET receptor tyrosine kinase and its role in the development of the mammalian enteric nervous system. *Development*, 126(12), 2785-2797.
- Torfs, C. P. et Christianson, R. E. (1999). Maternal risk factors and major associated defects in infants with Down syndrome. *Epidemiology*, 10(3), 264-270.

- Torihashi, S., Ward, S. M. et Sanders, K. M. (1997). Development of c-Kit-positive cells and the onset of electrical rhythmicity in murine small intestine. *Gastroenterology*, 112(1), 144-155.
- Touraine, R. L., Attie-Bitach, T., Manceau, E., Korsch, E., Sarda, P., Pingault, V., Lyonnet, S. (2000). Neurological phenotype in Waardenburg syndrome type 4 correlates with novel SOX10 truncating mutations and expression in developing brain. *Am J Hum Genet*, 66(5), 1496-1503. doi: 10.1086/302895
- Toure, A. M., Charrier, B. et Pilon, N. (2016). Male-specific colon motility dysfunction in the TashT mouse line. *Neurogastroenterol Motil*, 28(10), 1494-1507. doi: 10.1111/nmo.12847
- Trainor, P. A. (2005). Specification of neural crest cell formation and migration in mouse embryos. *Semin Cell Dev Biol*, 16(6), 683-693. doi: 10.1016/j.semcdb.2005.06.007
- Trang, H., Dehan, M., Beaufile, F., Zaccaria, I., Amiel, J., Gaultier, C. et French, C. W. G. (2005). The French Congenital Central Hypoventilation Syndrome Registry: general data, phenotype, and genotype. *Chest*, 127(1), 72-79. doi: 10.1378/chest.127.1.72
- Trendelenburg, P. (2006). Physiological and pharmacological investigations of small intestinal peristalsis. Translation of the article "Physiologische und pharmakologische Versuche über die Dunndarmperistaltik", *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* 81, 55-129, 1917. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 373(2), 101-133.
- Trochet, D., O'Brien, L. M., Gozal, D., Trang, H., Nordenskjold, A., Laudier, B., Amiel, J. (2005). PHOX2B genotype allows for prediction of tumor risk in congenital central hypoventilation syndrome. *Am J Hum Genet*, 76(3), 421-426. doi: 10.1086/428366
- Uesaka, T. et Enomoto, H. (2010). Neural precursor death is central to the pathogenesis of intestinal aganglionosis in Ret hypomorphic mice. *J Neurosci*, 30(15), 5211-5218. doi: 10.1523/JNEUROSCI.6244-09.2010

- Uesaka, T., Nagashimada, M. et Enomoto, H. (2013). GDNF signaling levels control migration and neuronal differentiation of enteric ganglion precursors. *J Neurosci*, 33(41), 16372-16382. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2079-13.2013
- 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
- Vales, S., Touvron, M. et Van Landeghem, L. (2018). Enteric glia: Diversity or plasticity? *Brain Res*. doi: 10.1016/j.brainres.2018.02.001
- Van de Putte, T., Maruhashi, M., Francis, A., Nelles, L., Kondoh, H., Huylebroeck, D. et Higashi, Y. (2003). Mice lacking ZFX1B, the gene that codes for Smad-interacting protein-1, reveal a role for multiple neural crest cell defects in the etiology of Hirschsprung disease-mental retardation syndrome. *Am J Hum Genet*, 72(2), 465-470. doi: 10.1086/346092
- Vanner, S. et Macnaughton, W. K. (2004). Submucosal secretomotor and vasodilator reflexes. *Neurogastroenterol Motil*, 16 Suppl 1, 39-43. doi: 10.1111/j.1743-3150.2004.00473.x
- Veiga-Fernandes, H. et Pachnis, V. (2017). Neuroimmune regulation during intestinal development and homeostasis. *Nat Immunol*, 18(2), 116-122. doi: 10.1038/ni.3634
- von Boyen, G. B., Steinkamp, M., Geerling, I., Reinshagen, M., Schafer, K. H., Adler, G. et Kirsch, J. (2006). Proinflammatory cytokines induce neurotrophic factor expression in enteric glia: a key to the regulation of epithelial apoptosis in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*, 12(5), 346-354. doi: 10.1097/01.MIB.0000219350.72483.44
- von Boyen, G. B., Steinkamp, M., Reinshagen, M., Schafer, K. H., Adler, G. et Kirsch, J. (2006). Nerve growth factor secretion in cultured enteric glia cells is modulated by proinflammatory cytokines. *J Neuroendocrinol*, 18(11), 820-825. doi: 10.1111/j.1365-2826.2006.01478.x

- Wakamatsu, N., Yamada, Y., Yamada, K., Ono, T., Nomura, N., Taniguchi, H., Nagaya, M. (2001). Mutations in SIP1, encoding Smad interacting protein-1, cause a form of Hirschsprung disease. *Nat Genet*, 27(4), 369-370. doi: 10.1038/86860
- Wallace, A. S. et Anderson, R. B. (2011). Genetic interactions and modifier genes in Hirschsprung's disease. *World J Gastroenterol*, 17(45), 4937-4944. doi: 10.3748/wjg.v17.i45.4937
- Wallace, A. S., Schmidt, C., Schachner, M., Wegner, M. et Anderson, R. B. (2010). L1cam acts as a modifier gene during enteric nervous system development. *Neurobiol Dis*, 40(3), 622-633. doi: 10.1016/j.nbd.2010.08.006
- Wallace, A. S., Tan, M. X., Schachner, M. et Anderson, R. B. (2011). L1cam acts as a modifier gene for members of the endothelin signalling pathway during enteric nervous system development. *Neurogastroenterol Motil*, 23(11), e510-522. doi: 10.1111/j.1365-2982.2011.01692.x
- Wang, H., Hughes, I., Planer, W., Parsadanian, A., Grider, J. R., Vohra, B. P., Heuckeroth, R. O. (2010). The timing and location of glial cell line-derived neurotrophic factor expression determine enteric nervous system structure and function. *J Neurosci*, 30(4), 1523-1538. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3861-09.2010
- Wang, X., Chan, A. K., Sham, M. H., Burns, A. J. et Chan, W. Y. (2011). Analysis of the sacral neural crest cell contribution to the hindgut enteric nervous system in the mouse embryo. *Gastroenterology*, 141(3), 992-1002 e1001-1006. doi: 10.1053/j.gastro.2011.06.002
- Ward, N. L., Pieretti, A., Dowd, S. E., Cox, S. B. et Goldstein, A. M. (2012). Intestinal aganglionosis is associated with early and sustained disruption of the colonic microbiome. *Neurogastroenterol Motil*, 24(9), 874-e400. doi: 10.1111/j.1365-2982.2012.01937.x
- Ward, S. M., Burns, A. J., Torihashi, S., Harney, S. C. et Sanders, K. M. (1995). Impaired development of interstitial cells and intestinal electrical rhythmicity in steel mutants. *Am J Physiol*, 269(6 Pt 1), C1577-1585. doi: 10.1152/ajpcell.1995.269.6.C1577

- Ward, S. M., Ordog, T., Bayguinov, J. R., Horowitz, B., Epperson, A., Shen, L., Sanders, K. M. (1999). Development of interstitial cells of Cajal and pacemaking in mice lacking enteric nerves. *Gastroenterology*, 117(3), 584-594.
- Ward, S. M., Sanders, K. M. et Hirst, G. D. (2004). Role of interstitial cells of Cajal in neural control of gastrointestinal smooth muscles. *Neurogastroenterol Motil*, 16 Suppl 1, 112-117. doi: 10.1111/j.1743-3150.2004.00485.x
- Watanabe, Y., Broders-Bondon, F., Baral, V., Paul-Gilloteaux, P., Pingault, V., Dufour, S. et Bondurand, N. (2013). Sox10 and Itgb1 interaction in enteric neural crest cell migration. *Dev Biol*, 379(1), 92-106. doi: 10.1016/j.ydbio.2013.04.013
- Wingate, D. L. (1981). Backwards and forwards with the migrating complex. *Dig Dis Sci*, 26(7), 641-666.
- Wright-Jin, E. C., Grider, J. R., Duester, G. et Heuckeroth, R. O. (2013). Retinaldehyde dehydrogenase enzymes regulate colon enteric nervous system structure and function. *Dev Biol*, 381(1), 28-37. doi: 10.1016/j.ydbio.2013.06.021
- Yan, H., Bergner, A. J., Enomoto, H., Milbrandt, J., Newgreen, D. F. et Young, H. M. (2004). Neural cells in the esophagus respond to glial cell line-derived neurotrophic factor and neurturin, and are RET-dependent. *Dev Biol*, 272(1), 118-133. doi: 10.1016/j.ydbio.2004.04.025
- Yanagisawa, H., Yanagisawa, M., Kapur, R. P., Richardson, J. A., Williams, S. C., Clouthier, D. E., Hammer, R. E. (1998). Dual genetic pathways of endothelin-mediated intercellular signaling revealed by targeted disruption of endothelin converting enzyme-1 gene. *Development*, 125(5), 825-836.
- Yanchar, N. L. et Soucy, P. (1999). Long-term outcome after Hirschsprung's disease: patients' perspectives. *J Pediatr Surg*, 34(7), 1152-1160.
- Yntema, C. L. et Hammond, W. S. (1954). The origin of intrinsic ganglia of trunk viscera from vagal neural crest in the chick embryo. *J Comp Neurol*, 101(2), 515-541.

- Young, H. M., Bergner, A. J., Anderson, R. B., Enomoto, H., Milbrandt, J., Newgreen, D. F. et Whittington, P. M. (2004). Dynamics of neural crest-derived cell migration in the embryonic mouse gut. *Dev Biol*, 270(2), 455-473. doi: 10.1016/j.ydbio.2004.03.015
- 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
- Young, H. M., Bergner, A. J., Simpson, M. J., McKeown, S. J., Hao, M. M., Anderson, C. R. et Enomoto, H. (2014). Colonizing while migrating: how do individual enteric neural crest cells behave? *BMC Biol*, 12, 23. doi: 10.1186/1741-7007-12-23
- Young, H. M., Ciampoli, D., Hsuan, J. et Canty, A. J. (1999). Expression of Ret-, p75(NTR)-, Phox2a-, Phox2b-, and tyrosine hydroxylase-immunoreactivity by undifferentiated neural crest-derived cells and different classes of enteric neurons in the embryonic mouse gut. *Dev Dyn*, 216(2), 137-152. doi: 10.1002/(SICI)1097-0177(199910)216:2<137::AID-DVDY5>3.0.CO;2-6
- Young, H. M., Hearn, C. J., Ciampoli, D., Southwell, B. R., Brunet, J. F. et Newgreen, D. F. (1998). A single rostrocaudal colonization of the rodent intestine by enteric neuron precursors is revealed by the expression of Phox2b, Ret, and p75 and by explants grown under the kidney capsule or in organ culture. *Dev Biol*, 202(1), 67-84. doi: 10.1006/dbio.1998.8987
- Young, H. M., Hearn, C. J., Farlie, P. G., Canty, A. J., Thomas, P. Q. et Newgreen, D. F. (2001). GDNF is a chemoattractant for enteric neural cells. *Dev Biol*, 229(2), 503-516. doi: 10.1006/dbio.2000.0100
- Young, H. M. et Newgreen, D. (2001). Enteric neural crest-derived cells: origin, identification, migration, and differentiation. *Anat Rec*, 262(1), 1-15.
- Young, H. M., Turner, K. N. et Bergner, A. J. (2005). The location and phenotype of proliferating neural-crest-derived cells in the developing mouse gut. *Cell Tissue Res*, 320(1), 1-9. doi: 10.1007/s00441-004-1057-5

- Zaitoun, I., Erickson, C. S., Barlow, A. J., Klein, T. R., Heneghan, A. F., Pierre, J. F., Gosain, A. (2013). Altered neuronal density and neurotransmitter expression in the ganglionated region of *Ednrb* null mice: implications for Hirschsprung's disease. *Neurogastroenterol Motil*, 25(3), e233-244. doi: 10.1111/nmo.12083
- Zhang, Z., Li, Q., Diao, M., Liu, N., Cheng, W., Xiao, P., Jiang, Q. (2017). Sporadic Hirschsprung Disease: Mutational Spectrum and Novel Candidate Genes Revealed by Next-generation Sequencing. *Sci Rep*, 7(1), 14796. doi: 10.1038/s41598-017-14835-6
- Zhu, L., Lee, H. O., Jordan, C. S., Cantrell, V. A., Southard-Smith, E. M. et Shin, M. K. (2004). Spatiotemporal regulation of endothelin receptor-B by SOX10 in neural crest-derived enteric neuron precursors. *Nat Genet*, 36(7), 732-737. doi: 10.1038/ng1371
- Zweier, C., Peippo, M. M., Hoyer, J., Sousa, S., Bottani, A., Clayton-Smith, J., Rauch, A. (2007). Haploinsufficiency of TCF4 causes syndromal mental retardation with intermittent hyperventilation (Pitt-Hopkins syndrome). *Am J Hum Genet*, 80(5), 994-1001. doi: 10.1086/515583