

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

RÔLE CLÉ DE NR2F1 DANS LA RÉGULATION DU DESTIN CELLULAIRE DES CELLULES DE LA CRÊTE
NEURALE

THÈSE

PRÉSENTÉE

COMME EXIGENCE PARTIELLE

AU DOCTORAT EN BIOCHIMIE

PAR

BAPTISTE CHARRIER

MAI 2025

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.12-2023). 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

Je remercie tout d'abord mon directeur de recherche, le Pr. Nicolas Pilon, de m'avoir guidé vers cette voie que je n'aurais jamais imaginé emprunter il y a quelques années. Merci de m'avoir accordé ta confiance, d'avoir été si patient et d'avoir su éveiller en moi l'envie de me surpasser, même face à mes doutes constants et à mes moments d'égarement. Je te suis reconnaissant de m'avoir confié la responsabilité de ce projet, alors que je n'aurais jamais pensé en être capable. Tu as su nourrir ma curiosité et m'accompagner tout au long de ce cheminement, tout en étant un mentor et un modèle exemplaire.

Je remercie également les membres de mon jury, la Pre Malika Oubaha, le Pr Benoit Barbeau, et le Pr. Jean-Phillipe Brosseau pour avoir accepté d'évaluer mon travail. Merci aux Pr Saïd Kourich et à la Pre Claire Bénard, qui avaient à l'époque évalué mon projet de thèse. Leurs réflexions, qui à ce moment-là semblaient simples, ont résonné en moi bien plus tard et prennent aujourd'hui tout leur sens.

Un merci tout particulier à tous les membres de mon laboratoire, des plus anciens aux plus récents. Aux plus anciens, notamment Tatiana Cardinal, Rodolphe Soret, et Oulianna Souchkova, je vous suis reconnaissant pour votre gentillesse, votre disponibilité et de m'avoir accueilli chaleureusement au sein de la « petite famille » du laboratoire à l'époque où je n'étais que le petit stagiaire de Sir Aboubacrine Touré. Merci d'ailleurs à Abou car sans lui je n'aurais peut-être jamais découvert le milieu de la recherche. Merci au Dr. Grégoire Bonnammour, non seulement pour son travail sur le modèle Spot (avec Karl Bergeron, bien entendu), qui m'a fourni une base solide pour poursuivre ce projet, mais surtout pour ses blagues, son expertise en microscopie et cytométrie à la plateforme du CERMO-FC, ainsi que ses encouragements dans les moments difficiles.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance et mon soutien à mes collègues doctorants : la Dre Sephora Sallis, Élisabeth Leduc, Marie Lefèvre, Alassane Gary, Nejia Lassoued, Sanaa Tork, Mohammad

Omrani, et Sandrine Girard pour leur soutien, les rires, les pleurs et les moments partagés tout au long de cette aventure. Merci également à Sherin Nawaito et Benoit Grondin (et ses cellules).

DÉDICACE

À mes parents, pour tout ce qu'ils m'ont transmis.

À mon père, pour m'avoir inculqué son esprit scientifique, et à ma mère, pour m'avoir offert son âme d'artiste. Ensemble, vous m'avez permis de grandir dans un cocon d'amour, me donnant des ailes, la liberté et la curiosité d'aller explorer le monde par moi-même.

À mes trois grands frères que j'aime tant. Malgré la distance, vous avez toujours été présents, et grâce à vous, je ne me suis jamais senti seul. Votre présence, même à travers les kilomètres, m'a donné la force et le courage de continuer.

À mes amis, avec qui j'ai tissé des liens presque fraternels ici. Vous m'avez offert un soutien indéfectible. Un merci tout particulier à Martine, Steven, Adrien, Léa, Fiona et Luca sur la fin, pour votre amitié et votre soutien dans les moments les plus difficiles.

Merci à tout ceux qui m'ont donné la force de continuer.

AVANT-PROPOS

« ...il faut bien considérer comme le résultat d'un bricolage cosmique ce qui reste à la fois le problème le plus déconcertant et le conte le plus étonnant : la formation d'un être humain ; le processus qui, par la fusion d'un spermatozoïde et d'un ovule, met en route la division de la cellule-oeuf, qui devient deux cellules, puis quatre cellules, puis une petite boule, puis un petit sac. Puis, quelque part, dans ce petit corps en croissance, s'individualisent quelques cellules qui se multiplient jusqu'à former une masse de quelques dizaines de milliards de cellules nerveuses. Et c'est grâce à ces cellules qu'il devient possible d'apprendre à parler, à lire, à écrire et à compter. C'est avec ces cellules qu'il est possible de jouer du piano, de traverser une rue sans se faire écraser, ou d'aller faire une conférence à l'autre bout du monde. Toutes ces capacités sont contenues dans notre petite masse de cellules, toute la grammaire, la syntaxe, la géométrie, la musique. Et nous n'avons pas la moindre idée sur la manière dont tout cela se construit. Pour moi, c'est l'histoire la plus étonnante qu'on puisse raconter sur cette Terre. »

François Jacob. *Le jeu des possibles : essai sur la diversité du vivant*

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	ii
DÉDICACE	iv
AVANT-PROPOS.....	v
LISTE DES FIGURES	ix
LISTE DES TABLEAUX	xii
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES	xiii
RÉSUMÉ	xv
ABSTRACT	xvii
INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1 REVUE DE LITTÉRATURE	2
1.1 Introduction générale aux cellules de la crête neurale (CCN).....	2
1.1.1 Découverte des cellules de la crête neurale	3
1.1.2 Importance des CCN dans l'évolution des vertébrés	4
1.1.3 Développement embryonnaire des CCN	6
1.1.3.1 Induction et spécification	7
1.1.3.2 Délamination et migration	9
1.1.3.3 Différenciation et plasticité des CCN	9
1.2 Les neurocristopathies.....	13
1.2.1 Le syndrome de Waardenburg.....	14
1.2.2 La maladie de Hirschsprung	15
1.3 Les modèles murins dans l'étude des neurocristopathies	18
1.3.1 Les modèles murins : un outil indispensable dans l'étude des neurocristopathies	18
1.3.2 Stratégie de génération de nouveaux modèles murins pour l'étude des neurocristopathies	19
1.4 La lignée de souris <i>Spot</i> : Un modèle murin pour le Syndrome de Waardenburg de Type IV	21
1.5 NR2F1 et son rôle dans le développement embryonnaire	27
1.6 La trajectoire développementale commune des mélanocytes, des précurseurs du système nerveux entérique et des précurseurs des cellules de Schwann	32
1.6.1 Différenciation des mélanocytes	33

1.6.2	Développement du système nerveux entérique	34
1.6.3	Spécification des précurseurs des cellules de Schwann	35
1.7	Hypothèses et objectifs	38
1.7.1	Hypothèses.....	38
1.7.2	Objectifs	39
1.7.2.1	Investiguer le profil d'expression spatio-temporel de NR2F1 pendant le développement des CCN chez la souris.	39
1.7.2.2	Étudier la possibilité d'une interaction entre NR2F1 et SOX10	40
1.7.2.3	Réaliser des analyses transcriptomiques des CCN provenant d'embryons <i>Nr2f1^{Spot/Spot}</i> 40	
1.7.2.4	Examiner la cause de la surexpression de <i>Nr2f1</i> dans les CCN <i>Nr2f1^{Spot/Spot}</i>	41
CHAPITRE 2 MATÉRIELS ET MÉTHODES		42
2.1	Modèles animaux et conformité éthique.....	42
2.2	Préparation des tissus et fixation pour les immunomarquages.....	42
2.2.1	Intestins embryonnaires entiers	42
2.2.2	Intestins embryonnaires dissociés	42
2.2.3	Embryons entiers (E9.5 et E10.5).....	43
2.3	Protocoles d'immunomarquages	43
2.3.1	Intestins embryonnaires entiers	43
2.3.2	Intestins embryonnaires dissociés	44
2.3.3	Embryons entiers (E9.5 et E10.5).....	44
2.4	Essais Luciférase	44
2.5	Bi-FC (Bimolecular Fluorescence Complémentation).....	45
2.6	Extraction d'ARN, transcription inverse et qPCR.....	46
2.7	Tri cellulaire (FACS).....	46
2.8	Séquençage ARN.....	47
2.9	Séquençage ARN en cellules uniques	47
2.10	Édition génomique par CRISPR-Cas9	48
2.10.1	Conception et clonage des guides CRISPR	48
2.10.2	Transfection dans les cellules Neuro2a et génération de cultures monoclonales	48
2.10.3	Génération de la lignée murine <i>Nr2f1^{ΔSil/ΔSil}</i>	48
CHAPITRE 3 RÉSULTATS.....		50
3.1	Patron d'expression de NR2F1 pendant le développement du SNE et du SNP.	50
3.1.1	Expression de NR2F1 dans le SNE en développement (E10.5 à E15.5)	50
3.1.2	Expression de NR2F1 dans les CCN aux stades embryonnaires E9.5 et E10.5	54

3.1.3 Comparaison du patron d'expression de NR2F1 entre les embryons contrôles et <i>Nr2f1</i> ^{Spot/Spot}	55
3.2 Analyse de l'interaction entre NR2F1 et le facteur de transcription SOX10	58
3.2.1 Évaluation de l'interaction transcriptionnelle entre NR2F1 et SOX10 dans la régulation des gènes gliaux par essais de luciférase.	59
3.3.2 Études d'interaction par RT-qPCR	60
3.3.3 Études d'interaction par BiFC	62
3.3 Comparaison du transcriptome de CCN issues d'embryons contrôles et <i>Nr2f1</i> ^{Spot/Spot}	64
3.3.1 Isolation des CCN à partir des embryons entiers	64
3.3.2 Résultats du séquençage d'ARN en vrac	67
3.3.3 Analyse de séquençage d'ARN en cellule unique (scRNA-seq)	76
3.3.3.1 Méthodologie et Identification des Sous-populations Cellulaires	76
3.3.3.2 Caractérisation des sous-populations cellulaires dérivées des CCN	81
3.3.3.3 Comparaison des sous-populations cellulaires dérivées des CCN	82
3.4 Identification des mécanismes sous-jacent à la dérégulation de <i>Nr2f1</i> dans les CCN des embryons <i>Nr2f1</i> ^{Spot/Spot}	86
CHAPITRE 4 DISCUSSION	89
4.1 Introduction de la discussion	89
4.2 Rôle de NR2F1 dans le développement des CCN et dans la différenciation des cellules de Schwann	91
4.3 Impact de la dérégulation de <i>Nr2f1</i> sur le transcriptome des CCN	96
4.4 Mécanismes sous-jacents à la dérégulation de <i>Nr2f1</i> dans le modèle Spot	100
4.5 Impact de la recherche fondamentale sur <i>Nr2f1</i> et sa régulation dans le contexte des maladies humaines	103
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	106
BIBLIOGRAPHIE	108

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1. Contribution des CCN au corps humain.	3
Figure 1.2 Induction, spécification et migration des cellules de la crête neurale chez l'embryon de souris.	7
Figure 1.3 Hétérogénéité des cellules de la crête neurale et leurs biais de différenciation selon leur localisation sur l'axe antéro-postérieur.	11
Figure 1.4 Distribution spatiale et temporelle des cellules de la crête neurale (CCN).	12
Figure 1.5 Stratégie de criblage pour générer des modèles murins de neurocristopathies.	20
Figure 1.6 Phénotypes observés chez les souris <i>Spot</i> , modèle murin de WS4.	22
Figure 1.7 La mutation <i>Spot</i> et ses conséquences sur l'expression de <i>Nr2f1</i> , de son lncRNA <i>A830082K12Rik</i> et des marqueurs gliaux dans les CCN entériques.	24
Figure 1.8 Conséquence de la mutation <i>Spot</i> sur la différenciation des progéniteurs dérivées des CCN.	26
Figure 1.9 Classification des récepteurs nucléaires et structure générale de la famille	27
Figure 1.10 Comparaison de la structure des récepteurs COUP-TF (NR2F1 et NR2F2) et mécanismes d'activation et de répression transcriptionnelle.	29
Figure 1.11 Différenciation des CCN régulée par SOX10 et SOX9	33
Figure 1.12 Conservation de la multipotence des cellules de la crête neurale via les cellules progénitrices des cellules de Schwann (SCP).	37
Figure 3.1 Co-marquage représentatif de SOX10, TUJ et NR2F1 sur des intestins embryonnaires de souris contrôles (WT) à différents stades de développement (E11.5, E12.5 et E15.5). ...	51
Figure 3.2 Schéma représentant l'expression de SOX10, TUJ et PHOX2B par les cellules dérivées des CCN au cours du développement du SNE.	53
Figure 3.3 Co-marquage de SOX10, PHOX2B et NR2F1 d'intestins et de côlons embryonnaires dissociés à E11.5 et E13.5.	54
Figure 3.4 Expression de SOX10, PHOX2B et NR2F1 dans les nerfs crâniens à E10.5.	55
Figure 3.5 Marquage d'intestins embryonnaires entiers à E11.5, E13.5 et E16.5 permettant de comparer l'expression de NR2F1 entre les embryons WT et <i>Nr2f1^{Spot/Spot}</i> dans le SNE.	56

Figure 3.6 Comparaison du patron d'expression de NR2F1 entre des embryons contrôles et WT.	58
Figure 3.7. Essais luciférase dans les cellules Neuro2a pour évaluer l'interaction transcriptionnelle entre SOX10 et NR2F1 sur six éléments cis-régulateurs de gènes gliaux.	60
Figure 3.8 Analyse de l'expression endogène des gènes gliaux par RT-qPCR dans les cellules Neuro2a et P19 en réponse à l'expression de NR2F1, SOX10, ou leur co-expression.	61
Figure 3.9 Interaction entre SOX10 et NR2F1 détectée dans les noyaux de cellules Neuro2a détectée par BiFC.	63
Figure 3.10 Isolation des CCN à partir d'embryons entiers <i>Gata4p-RFP (WT)</i> ou <i>Gata4p-RFP; Nr2f1^{Spot/Spot}</i>	66
Figure 3.11 Volcano plot des gènes différentiellement exprimés (DEG) issus de l'analyse RNA-seq comparant les CCN issues d'embryons WT et <i>Nr2f1^{Spot/Spot}</i>	67
Figure 3.12 Comparaisons de l'expression de plusieurs groupes de gènes significativement dérégulés dans les CCN d'embryons <i>Nr2f1^{Spot/Spot}</i>	68
Figure 3.13 Analyse des gènes différentiellement exprimés à l'aide de l'outil TRRUST (<i>Transcriptional Regulatory Relationships Unraveled by Sentence-based Text mining</i>).	70
Figure 3.14. Analyse GO des gènes significativement dérégulés dans les CCN des embryons <i>Nr2f1^{Spot/Spot}</i>	72
Figure 3.15 Visualisation des gènes différentiellement exprimés (DEG) impliqués dans la différenciation des CCN.....	75
Figure 3.16 Regroupement non supervisé de Louvain et projection UMAP des CCN WT et <i>Nr2f1^{Spot/Spot}</i>	78
Figure 3.17 Projection combinée des CCN WT et <i>Nr2f1^{Spot/Spot}</i> avec regroupement Louvain et comparaison avec les populations cellulaires attribués manuellement.	79
Figure 3.18 Attribution finale des regroupements de cellules à des populations cellulaires dérivées CCN.	80
Figure 3.19 Comparaison des populations cellulaires dérivées des CCN entre les embryons WT et <i>Nr2f1^{Spot/Spot}</i>	85
Figure 3.20 Délétion du répresseur présumé de <i>Nr2f1</i> par CRISPR-Cas9 dans des cellules NeuroA et génération de la lignée murine <i>Nr2f1^{ΔSil}</i>	88

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 3-1 Résultats détaillés de l'analyse des gènes différentiellement exprimés par TRRUST.	70
Tableau 3-2 Résultats détaillés de l'analyse GO des gènes significativement dérégulés dans les CCN des embryons <i>Nr2f1^{Spot/Spot}</i>	72

LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

BBSOA : « Bosch-Boonstra-Schaaf Optic Atrophy Syndrome »

BiFC : « Bimolecular Fluorescence Complementation » « c »

CCN: Cellules de la crête neurale

CRISPR:« Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats »

DEG : « Differentially Expressed Genes », gènes différenciellement exprimés

EMT: Transition épithélio-mésenchymateuse

ESC: Cellules souches embryonnaires

FACS: « Fluorescence-activated cell sorting », tri cellulaire activé par fluorescence

GRN: « Gene Regulatory Network », réseau de régulation génique

GO : « Gene Ontology »

HSCR: « Hirschsprung's Disease », maladie de Hirschsprung)

lncRNA: « Long non-coding RNA », Long ARN non codant

RNA-seq : « (Bulk) RNA sequencing », Séquençage ARN en vrac

NR2F1: « Nuclear Receptor Subfamily 2, Group F, Member 1 »

scRNA-seq : « Single-cell RNA sequencing », séquençage ARN en cellule unique

SNE: Système Nerveux Entérique

SNP: Système Nerveux Périphérique

SOX10: « SRY-Box Transcription Factor 10 »

WS: « Waardenburg Syndrome », syndrome de Waardenburg

WS4: Waardenburg Syndrome Type 4

WT : «Wild Type », souche sauvage

RÉSUMÉ

Les neurocristopathies sont des pathologies résultant de dysfonctionnements des cellules de la crête neurale (CCN), un groupe de cellules multipotentes et migratoires essentielles au développement de nombreux tissus et organes. Parmi ces maladies, le syndrome de Waardenburg et la maladie de Hirschsprung sont liés à des altérations dans la différenciation et la migration des CCN, qui donnent naissance, entre autres, aux mélanocytes, responsables de la pigmentation, et au système nerveux entérique (SNE). Ces pathologies se manifestent par des défauts de pigmentation et des anomalies du SNE, dus à un développement incomplet des CCN. Le modèle murin *Nr2f1^{Spot/Spot}* récapitule plusieurs caractéristiques du syndrome de Waardenburg-Hirschsprung (Waardenburg type 4, WS4), causé par une différenciation anormale des progéniteurs dérivés des CCN, conduisant aux symptômes de WS4. La surexpression de NR2F1 (COUP-TFI) observée dans les CCN des embryons *Nr2f1^{Spot/Spot}* conduits aux défauts de différenciation, suggérant un rôle central du facteur de transcription NR2F1 dans la modulation de la différenciation des CCN. L'objectif de cette thèse était d'approfondir notre compréhension du rôle de NR2F1 dans la régulation du destin cellulaire des CCN en étudiant son dérèglement dans le modèle *Nr2f1^{Spot/Spot}*. Dans ce modèle, NR2F1 est surexprimé spécifiquement dans les CCN, ce qui permet d'explorer les mécanismes par lesquels NR2F1 influence le développement des CCN. Par ailleurs, SOX10, un facteur essentiel dans la régulation du développement des CCN, est codé par un gène dont les mutations sont l'une des principales causes de WS4 chez l'humain, faisant ainsi de ce facteur un point d'intérêt central dans notre étude. En étudiant l'interaction entre NR2F1 et SOX10, nous espérons mieux comprendre comment NR2F1 module la différenciation des CCN en agissant sur l'expression des gènes régulateurs des cellules gliales et des mélanocytes. Dans ce cadre, nous avons caractérisé l'expression de NR2F1 au cours du développement embryonnaire de la souris à l'aide d'immunomarquage. Nos résultats révèlent une coexpression précoce de SOX10 et NR2F1, suggérant un rôle de l'interaction entre ces deux facteurs dans les décisions précoces du destin cellulaire des CCN, influençant ainsi leur différenciation ultérieure. Nous avons ensuite exploré l'interaction fonctionnelle entre NR2F1 et SOX10 dans des cellules Neuro2A à travers des essais luciférase, des analyses par RT-qPCR, ainsi que des expériences de complémentation de fluorescence bimoléculaire (BiFC). Ces approches ont mis en évidence une interaction directe entre NR2F1 et SOX10 dans la régulation de la différenciation gliale. Par ailleurs, des analyses transcriptomiques, comprenant un séquençage ARN en vrac et en cellule unique, ont été réalisées sur des CCN d'embryons *Nr2f1^{Spot/Spot}* pour examiner les conséquences de la dérégulation de *Nr2f1* sur le transcriptome des CCN et sur leur différenciation. Les analyses ont révélé une régulation à la baisse des gènes de la lignée des mélanocytes, une régulation à la hausse d'un large groupe de gènes *Hox*, ainsi qu'une dérégulation de nombreux gènes impliqués dans le neurodéveloppement. Enfin, nos analyses ont révélé que la dérégulation de *Nr2f1* est spécifique à la sous-population de CCN exprimant SOX10 dans les CCN *Nr2f1^{Spot/Spot}*, ce qui suggère l'existence d'un mécanisme de régulation de *Nr2f1* dépendant de SOX10 dans des conditions normales. Concernant, ces mécanismes de régulation, nous avons exploré diverses hypothèses, notamment l'implication d'une interaction entre un élément répresseur conservé et le promoteur de *Nr2f1*, grâce à une approche de délétion via CRISPR-Cas9. Contrairement à nos attentes, ces expériences n'ont pas confirmé notre hypothèse initiale. Cependant, ces résultats

ont ouvert de nouvelles pistes de recherche sur les mécanismes régulateurs de *Nr2f1*. Dans l'ensemble, nos résultats montrent que NR2F1 est un facteur clé dans la régulation de multiples décisions de destin cellulaire des CCN et permettent d'approfondir notre compréhension des mécanismes moléculaires par lesquels NR2F1 contrôle ces trajectoires cellulaires. Par ailleurs, ces résultats ouvrent des perspectives intéressantes sur les mécanismes régulant son expression au cours du développement des CCN.

Mots-clés : NR2F1, cellules de la crête neurale, différenciation cellulaire, SOX10, syndrome de Waardenburg, maladie de Hirschsprung, mélanocytes, système nerveux entérique, cellules de Schwann.

ABSTRACT

Neurocristopathies are disorders resulting from dysfunctions of neural crest cells (NCCs), a multipotent and migratory cell population essential for the development of many tissues and organs. Among these diseases, Waardenburg syndrome and Hirschsprung disease are linked to alterations in the differentiation and migration of NCCs, which give rise, among other things, to melanocytes, responsible for pigmentation, and the enteric nervous system (ENS). These pathologies are characterized by pigmentation defects and abnormalities in the ENS due to incomplete development of NCCs. The *Nr2f1*^{Spot/Spot} mouse model recapitulates several features of Waardenburg-Hirschsprung syndrome (Waardenburg type 4, WS4), caused by abnormal differentiation of NCC-derived progenitors, leading to WS4 symptoms. Overexpression of NR2F1 (COUP-TFI) observed in the NCCs of *Nr2f1*^{Spot/Spot} embryos leads to differentiation defects, suggesting a central role for the transcription factor NR2F1 in modulating NCC differentiation. The objective of this thesis was to further our understanding of the role of NR2F1 in regulating NCC fate by studying its dysregulation in the *Nr2f1*^{Spot/Spot} model. In this model, NR2F1 is specifically overexpressed in NCCs, allowing the exploration of the mechanisms through which NR2F1 influences NCC development. Additionally, SOX10, a key factor in regulating NCC development, is encoded by a gene whose mutations are one of the main causes of WS4 in humans, making this factor a central point of interest in our study. By investigating the interaction between NR2F1 and SOX10, we aimed to better understand how NR2F1 modulates NCC differentiation by acting on the expression of glial and melanocyte regulatory genes. In this context, we characterized NR2F1 expression during mouse embryonic development using immunostaining. Our results reveal early co-expression of SOX10 and NR2F1, suggesting a role for the interaction between these two factors in early NCC fate decisions, thus influencing their subsequent differentiation. We then explored the functional interaction between NR2F1 and SOX10 in Neuro2A cells through luciferase assays, RT-qPCR analyses, and bimolecular fluorescence complementation (BiFC) experiments. These approaches highlighted a direct interaction between NR2F1 and SOX10 in regulating glial differentiation. Furthermore, transcriptomic analyses, including bulk and single-cell RNA sequencing, were performed on NCCs from *Nr2f1*^{Spot/Spot} embryos to examine the consequences of *Nr2f1* dysregulation on the NCC transcriptome and their differentiation. The analyses revealed downregulation of melanocyte lineage genes, upregulation of a broad group of Hox genes, and deregulation of numerous genes involved in neurodevelopment. Finally, our analyses revealed that *Nr2f1* dysregulation is specific to the SOX10-expressing subpopulation of NCCs in *Nr2f1*^{Spot/Spot} embryos, suggesting a SOX10-dependent regulatory mechanism of *Nr2f1* under normal conditions. Regarding these regulatory mechanisms, we explored various hypotheses, including the involvement of an interaction between a conserved repressor element and the *Nr2f1* promoter, using a CRISPR-Cas9 deletion approach. Contrary to our expectations, these experiments did not confirm our initial hypothesis. However, these results opened new avenues for research on the regulatory mechanisms of *Nr2f1*. Overall, our findings demonstrate that NR2F1 is a key factor in regulating multiple NCC fate decisions and deepen our understanding of the molecular mechanisms by which NR2F1 controls these cellular trajectories. Additionally, these results provide interesting insights into the mechanisms regulating its expression during NCC development.

Keywords : NR2F1, SOX10, Neural crest cells, Waardenburg Syndrome, Hirschsprung disease, Melanocytes, Enteric nervous system, Schwann cells

INTRODUCTION

Le développement embryonnaire est un processus d'une complexité remarquable, orchestré par des programmes génétiques et épigénétiques précis qui guident la formation de l'ensemble des tissus et organes du corps. Parmi les acteurs clés de ce processus, les cellules de la crête neurale (CCN) occupent une place unique. Décrites comme une « quatrième couche germinative » en raison de leur remarquable capacité de migration et de différenciation, les CCN donnent naissance à une grande diversité de types cellulaires, incluant les cellules gliales et neuronales du système nerveux périphérique, les mélanocytes, et plusieurs structures du crâne et du visage. Leur plasticité exceptionnelle est essentielle à l'organisation morphologique et fonctionnelle des vertébrés. Toutefois, la complexité de leur programme de développement rend également les CCN particulièrement vulnérables aux erreurs. Lorsque le processus de spécification, de migration ou de différenciation de ces cellules est perturbé, il en résulte un ensemble de pathologies connues sous le nom de neurocristopathies, telles que le syndrome de Waardenburg et la maladie de Hirschsprung. Ces maladies, bien que rares, illustrent de manière frappante l'importance vitale des CCN dans le développement humain. Au cœur de la régulation du destin cellulaire des CCN se trouvent des réseaux de facteurs de transcription complexes, dont le fonctionnement reste encore partiellement compris. Parmi ceux-ci, NR2F1 (également connu sous le nom de COUP-TFI) émerge comme un régulateur potentiel du développement neural et glial, bien que son rôle précis dans les cellules de la crête neurale soit encore peu exploré. La découverte de modèles murins présentant une dérégulation de NR2F1, tels que la lignée *Nr2f1^{Spot/Spot}*, offre une opportunité unique d'étudier les mécanismes moléculaires par lesquels ce facteur influence la spécification et la différenciation des CCN. La présente thèse s'inscrit dans ce contexte et vise à élucider le rôle de NR2F1 dans la modulation des trajectoires de différenciation des CCN. En s'appuyant sur des approches complémentaires — incluant l'immunomarquage, l'analyse transcriptomique en vrac et en cellule unique, ainsi que l'étude des interactions transcriptionnelles — ce travail cherche à comprendre comment une dérégulation de NR2F1 perturbe les décisions de destin cellulaire et contribue aux phénotypes observés dans les modèles de neurocristopathies.

CHAPITRE 1

REVUE DE LITTÉRATURE

1.1 Introduction générale aux cellules de la crête neurale (CCN)

Les cellules de la crête neurale (CCN) sont une population transitoire et multipotente de cellules souches embryonnaires propres aux vertébrés. Ces cellules émergent du tube neural dorsal pendant le développement embryonnaire et migrent à travers l'embryon pour donner naissance à une grande variété de types cellulaires (Figure1.1). Parmi ces types cellulaires, on trouve des neurones et des cellules gliales du système nerveux périphérique, des mélanocytes, des cellules des cartilages et des os du crâne, ainsi que des cellules des glandes endocrines, ce qui démontre leur incroyable plasticité et leur potentiel de différenciation (Le Douarin *et al.*, 2007; Le Douarin et Dupin, 2003). Les CCN jouent un rôle crucial dans le développement et l'évolution de diverses structures corporelles. Leur capacité à se différencier en multiples lignées cellulaires leur confère un rôle central dans la formation des structures crâniofaciales, du système nerveux périphérique, et de plusieurs organes et tissus. Cette polyvalence est une caractéristique déterminante qui a contribué à la complexité et à la diversité des formes chez les vertébrés (Hall, 2008, 2018; Shyamala *et al.*, 2015).

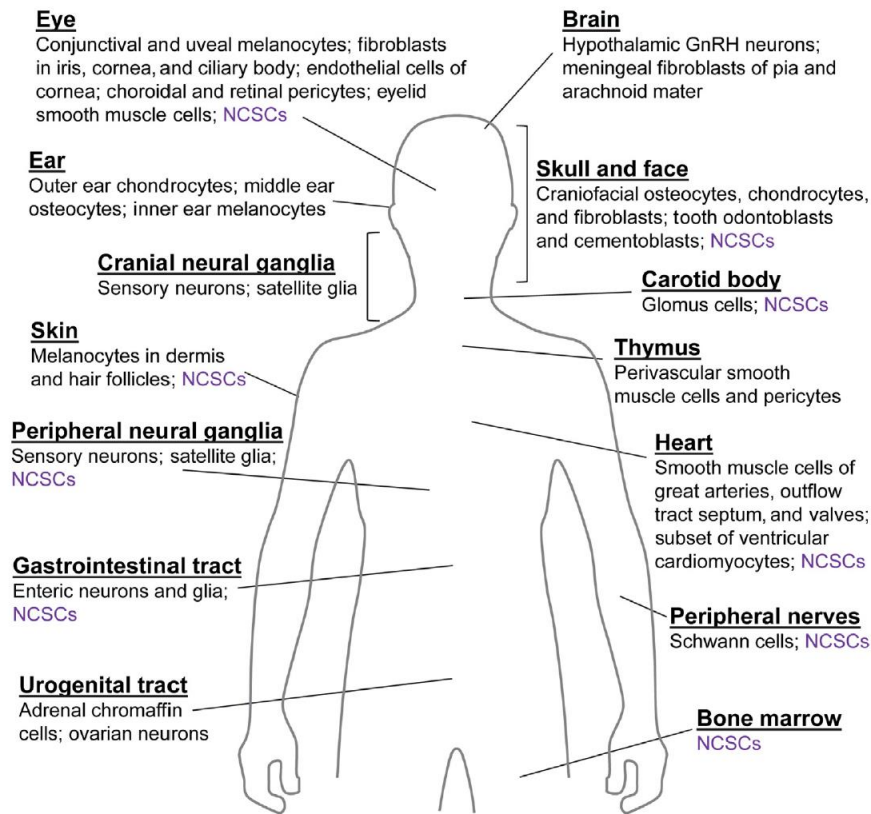


Figure 1.1. Contribution des CCN au corps humain.

Schéma illustrant les contributions des CCN au développement du corps humain. Les CCN donnent naissance à une grande diversité de types cellulaires spécialisés dans tout le corps, y compris des neurones, des cellules gliales, des ostéoblastes, et des cellules musculaires lisses. De plus, dans plusieurs structures dérivées des CCN, de petites populations de cellules souches (NCSCs) persistent après la naissance. Les NCSCs conservent la capacité de se différencier en de nombreux types cellulaires dérivés des CCN lorsqu'elles sont exposées à des signaux moléculaires ou des conditions de culture appropriées. Les différents dérivés des CCN sont répartis dans de nombreuses régions du corps, comme le montre la carte corporelle. Figure extraite de Pilon, 2021.

1.1.1 Découverte des cellules de la crête neurale

La découverte des CCN remonte à la fin du 19ème siècle, lorsque Wilhelm His les a identifiées chez l'embryon de poulet en 1868, les décrivant comme le "*Zwischenstrang*" ou la "corde intermédiaire" (Hall, 2008; Trainor *et al.*, 2003). His a noté que ces cellules migraient rapidement depuis le tube neural pour former diverses structures, une observation qui a été essentielle pour comprendre le comportement migratoire des CCN. Cette découverte initiale a été suivie par des

travaux supplémentaires, notamment ceux d'Arthur Milnes Marshall en 1878, qui a utilisé pour la première fois le terme de "crête neurale" pour désigner cette population cellulaire (Hall, 2008). Marshall a reconnu l'importance des CCN dans la formation des ganglions sensoriels et autonomes, ce qui a élargi notre compréhension de leur rôle dans le développement du système nerveux périphérique (Hall, 2008; Shyamala *et al.*, 2015). Les études de Julia Platt dans les années 1890 ont approfondi cette compréhension en démontrant que les cellules de la crête neurale contribuent également à la formation des cartilages viscéraux de la tête et des cellules formant la dentine des dents. Platt a introduit le terme "mésectoderme" pour décrire ces cellules d'origine ectodermique, défiant la théorie dominante des feuilletts embryonnaires de l'époque et ouvrant la voie à une nouvelle perspective sur le développement embryonnaire (Le Douarin *et al.*, 2007).

1.1.2 Importance des CCN dans l'évolution des vertébrés

Les CCN ont joué un rôle crucial dans l'évolution des vertébrés et la crête neurale est considérée comme une innovation évolutive qui a été essentielle à l'émergence de nouveaux traits chez les vertébrés (Donoghue *et al.*, 2008; Green *et al.*, 2015; Hall, 2018; Simoes-Costa et Bronner, 2015; York et McCauley, 2020). L'importance évolutive des CCN est soulignée par leur rôle dans l'apparition de nouveaux types cellulaires qui ont facilité la transition de l'alimentation par filtration à la prédation active chez les vertébrés ancestraux (Abitua *et al.*, 2012). Les innovations apportées par les CCN ont permis le développement de structures complexes telles que le crâne, les mâchoires, et divers éléments du système nerveux périphérique. Ces structures sont essentielles non seulement pour la protection du cerveau mais aussi pour la mastication et la digestion, des fonctions vitales pour la survie et le succès reproductif des vertébrés (Simoes-Costa et Bronner, 2015). Les CCN sont également responsables de la formation de nombreux types de cellules et de tissus qui n'existent pas chez les non-vertébrés, tels que les mélanocytes, qui sont cruciales pour la pigmentation, et les ganglions des racines dorsales, qui jouent un rôle important dans le système sensoriel (Ivashkin et Adameyko, 2013). Elles sont aussi impliquées dans la formation des arcs branchiaux, qui sont à l'origine de nombreuses structures de la tête et du cou, y compris les os et les cartilages (York et McCauley, 2020).

La multipotence et la capacité migratoire des CCN sont des caractéristiques, partagées avec les cellules souches embryonnaires pluripotentes, indiquant une origine évolutive ancienne de ces caractéristiques. Une étude comparative des réseaux de régulation génétique (GRN) entre les CCN et les cellules souches pluripotentes des blastulas de vertébrés a révélé que des composants régulateurs partagés existent dans les deux types de cellules, ce qui suggère une origine évolutive commune de ces réseaux. Par exemple, des facteurs régulateurs de la crête neurale tels que *snai1*, *zic1*, *id3*, *tfap2a*, et *foxd3* sont co-exprimés avec des gènes de pluripotence de base comme *sox2*, *pou5*, *myc*, et *ventx/nanog* dans les cellules souches de la blastula chez les vertébrés à mâchoires (*Xenopus*) et sans mâchoires (lamproie) (York *et al.*, 2023). Une étude récente a d'ailleurs mis en évidence que des facteurs de pluripotence comme OCT4 (POU5F1) et SOX2 sont « réutilisés » par les CCN pour moduler l'organisation de la chromatine et maintenir la plasticité des CCN, définissant ainsi leur potentiel de développement (Hovland *et al.*, 2022). Ces recherches suggèrent que les CCN ont conservé des caractéristiques provenant des cellules souches embryonnaires pluripotentes, ce qui a permis leur large potentiel de différenciation ainsi que leur capacité à migrer. Cette conservation évolutive souligne l'importance des CCN dans la diversification morphologique et fonctionnelle des vertébrés, en leur permettant de générer une diversité de types cellulaires et de structures complexes qui ont été cruciales pour leur succès évolutif (York *et al.*, 2023).

Les études sur le GRN de la crête neurale ont considérablement enrichi notre compréhension des mécanismes moléculaires qui ont façonné l'évolution des vertébrés. Ce réseau, composé de facteurs de transcription et d'éléments cis-régulateurs, coordonne l'expression des gènes qui dictent le comportement, la migration et la différenciation des CCN. En combinant des informations morphologiques et génétiques provenant de vertébrés et d'autres chordés, des études ont montré que l'ajout du programme de spécification de la crête neurale pourrait avoir permis aux cellules à la frontière de la plaque neurale d'acquérir ces capacités distinctives. Ce programme de spécification comprend plusieurs modules régulateurs qui orchestrent la transition des CCN depuis leur induction à la bordure de la plaque neurale jusqu'à leur différenciation en divers types cellulaires spécialisés (Green *et al.*, 2015). Bien que le noyau du GRN soit conservé, il existe une flexibilité et une adaptabilité qui ont permis l'ajout de nouveaux

modules de différenciation au cours de l'évolution. Par exemple, des adaptations spécifiques au niveau des enhancers de gènes comme *FoxD3* et *Sox10* ont permis de diversifier les dérivés de la crête neurale dans différentes lignées de vertébrés (Green *et al.*, 2015). Les CCN interagissent également de manière extensive avec d'autres tissus embryonnaires, influençant ainsi la morphogenèse et l'organisation de nombreuses structures. Ces interactions sont médiées par le GRN, qui intègre des signaux provenant de divers tissus pour guider la migration et la différenciation des CCN. Ces interactions ont été cruciales pour l'assemblage de structures complexes telles que le squelette crâniofacial et les systèmes sensoriels, contribuant ainsi à l'élaboration du plan corporel des vertébrés (Green *et al.*, 2015). Des changements dans les circuits régulateurs de gènes ont permis la co-option de programmes de différenciation existants, conférant aux CCN la capacité de former une variété de dérivés, y compris le cartilage, les os, les neurones et les cellules pigmentaires (Green *et al.*, 2015; Ivashkin et Adameyko, 2013). Cela montre comment des modifications spécifiques du GRN ont pu conduire à l'émergence de nouvelles caractéristiques anatomiques. Ces études sur l'évolution des CCN montrent comment le GRN de la crête neurale a non seulement contribué à l'évolution des vertébrés en permettant la formation de nouveaux types cellulaires et structures, mais a également offert une flexibilité évolutive par l'ajout de nouveaux modules régulateurs.

En conclusion, les CCN ont été intégrales à l'évolution des vertébrés, jouant un rôle crucial dans l'origine et la diversification de ce groupe d'animaux. Ces cellules multipotentes et migratoires ont contribué au développement d'une large gamme de types cellulaires et de tissus, façonnant les caractéristiques et les structures exclusives aux vertébrés, grâce à l'adaptation des caractéristiques des cellules souches pluripotentes qui leur ont permis de répondre aux exigences évolutives et environnementales complexes.

1.1.3 Développement embryonnaire des CCN

Le développement des CCN est un processus complexe impliquant plusieurs étapes clés : l'induction, la délamination, la migration et la différenciation (Figure 1.2 A).

1.1.3.1 Induction et spécification

L'induction des CCN est une étape critique du développement embryonnaire des vertébrés, impliquant l'activation de facteurs de transcription spécifiques et de plusieurs voies de signalisation. Ce processus se déroule au niveau de la bordure de la plaque neurale, une région où l'ectoderme non neural, la plaque neurale et le mésoderme sous-jacent interagissent pour initier la formation des CCN (Figure 1.2 A (i)). Cette région, correspondant à l'interface entre l'ectoderme non neural et le neuroépithélium et où un ensemble de gènes régulateurs est exprimé pour initier la formation des CCN est critique pour la formation des CCN (Dupin et Sommer, 2012; Shyamala *et al.*, 2015). Plusieurs voies de signalisation sont essentielles pour l'induction des CCN, notamment la voie des protéines morphogénétiques de l'os (BMP), la voie Wnt/ β -caténine et la voie des facteurs de croissance fibroblastique (FGF) (Figure 1.3 A) (Le Douarin *et al.*, 2007; Pilon, Nicolas, 2021; Shyamala *et al.*, 2015). Ces signaux inducteurs façonnent le microenvironnement et influencent les décisions de destin cellulaire des CCN.

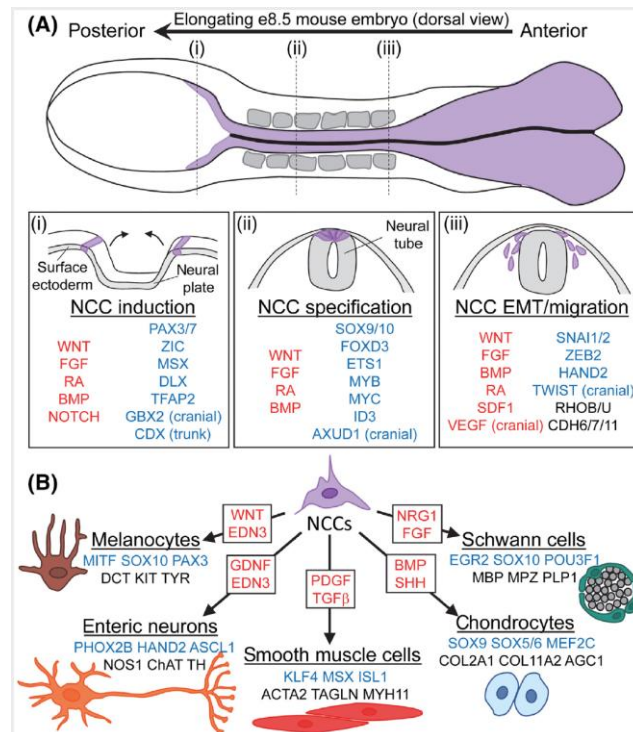


Figure 1.2 Induction, spécification et migration des cellules de la crête neurale chez l'embryon de souris.

(A) Schéma représentant les étapes de développement des CCN dans un embryon de souris à E8.5. i) Induction des CCN à partir de la plaque neurale, régulée par plusieurs voies de signalisation (WNT, FGF, BMP, etc.). ii) Spécification des CCN, marquée par l'expression de gènes tels que SOX9, SOX10, MYC, et ETS1. iii) Transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) et migration des CCN, contrôlées par des facteurs comme SNAI1/2 et TWIST. (B) Différenciation des CCN en diverses lignées cellulaires, incluant les mélanocytes, les neurones entériques, les cellules musculaires lisses, les cellules de Schwann et les chondrocytes, sous l'influence de signaux spécifiques tels que WNT, BMP, et GDNF. Figure extraite de *Pilon, 2021*.

Le processus d'induction peut être divisé en deux phases : dans la première, les FGF jouent un rôle crucial en inhibant les BMP pour permettre l'activation des signaux Wnt. Dans la deuxième phase, l'inhibition des FGF conduit à l'activation des BMP, qui travaillent en synergie avec les Wnt pour induire les CCN (Shyamala *et al.*, 2015). La voie Wnt canonique joue un rôle crucial dans l'induction initiale des CCN, tandis que la voie Wnt non canonique est impliquée dans la migration ultérieure des CCN (De Calisto *et al.*, 2005; Hari *et al.*, 2012). En combinaison avec les signaux FGF et Wnt, l'acide rétinoïque contribue à la postériorisation et à la latéralisation de la plaque neurale, processus essentiel pour l'induction des CCN (Villanueva *et al.*, 2002). Les gènes spécificateurs de la bordure de la plaque neurale (NPB specifiers) incluent *Msx1/2*, *Pax3/7*, *Zic1*, *Dlx3/5*, *Hairy2*, *Id3* et *Tfap2a*. Ces facteurs de transcription sont cruciaux pour définir la région où les CCN seront induites. Par la suite, un second groupe de facteurs de transcription, appelés spécificateurs de la crête neurale (NC specifiers), comme *Snail*, *FoxD3*, *Sox9*, *Sox10*, *Twist*, *cMyc* et *tfap2a*, sont exprimés. Ces spécificateurs de la crête neurale maintiennent les CCN et contrôlent leur comportement, de l'EMT (transition épithélio-mésenchymateuse) à la migration et influence également leur destin de différenciation (Sauka-Spengler et Bronner-Fraser, 2008; Shyamala *et al.*, 2015; Stuhlmiller et Garcia-Castro, 2012). En plus des facteurs de transcription, de nombreuses études ont souligné l'importance des mécanismes épigénétiques, tels que les modifications des histones, la méthylation de l'ADN et le remodelage de la chromatine, dans la coordination des programmes d'expression génique cruciaux pour la formation de la crête neurale (Hari *et al.*, 2012; Hu *et al.*, 2014; Strobl-Mazzulla *et al.*, 2010; Tien *et al.*, 2015; Wang, W. D. *et al.*, 2011). L'interaction entre les facteurs de transcription et les régulateurs épigénétiques est cruciale pour la spécification des CCN. Ces interactions permettent une régulation fine et

dynamique de l'expression génique, garantissant que les CCN acquièrent leur identité spécifique au bon moment et dans le bon contexte spatial.

1.1.3.2 Délamination et migration

Une fois spécifiées, les CCN subissent une transition épithélio-mésenchymateuse (EMT), un processus au cours duquel elles perdent leurs caractéristiques épithéliales et acquièrent des propriétés mésenchymateuses. Ce processus permet aux CCN de se détacher de la partie dorsale du tube neural et de migrer vers différentes régions de l'embryon (Figure 1.2 (iii)) (Mayor et Theveneau, 2013; Thiery et Sleeman, 2006).

1.1.3.3 Différenciation et plasticité des CCN

Une fois leurs destinations finales atteintes, les CCN se différencient en une variété de types cellulaires spécifiques en réponse aux signaux environnementaux locaux (Figure 1.2 B). Ces types cellulaires incluent des neurones et des cellules gliales du système nerveux périphérique, des mélanocytes, des chondrocytes et des ostéocytes du squelette crâniofacial, ainsi que des cellules de la thyroïde et des ganglions sympathiques (Gammill et Bronner-Fraser, 2003; Le Douarin et Dupin, 2003).

La reprogrammation des dérivés de la crête neurale est un processus qui permet aux cellules différenciées de revenir à un état plus immature et pluripotent et illustre la remarquable plasticité des CCN. Par exemple, en présence d'endothéline-3 (EDN3), les mélanocytes cultivés peuvent perdre leurs marqueurs spécifiques et exprimer des gènes caractéristiques des CCN, tels que *Sox10*, *Pax3*, et *FoxD3*, conduisant à leur prolifération et à leur différenciation en cellules de Schwann et en fibroblastes (Dupin, 2011). De même, les cellules de Schwann peuvent se reprogrammer en mélanocytes et en myofibroblastes sous l'influence d'EDN3 (Le Douarin *et al.*, 2004). La différenciation des CCN est cependant un processus complexe, contrôlé à la fois par des programmes génétiques intrinsèques et des signaux environnementaux extrinsèques. À ce jour, la compréhension des mécanismes qui gouvernent cette incroyable plasticité des CCN reste un domaine de recherche très actif, avec des débouchés thérapeutiques importants. En effet, cette plasticité cellulaire offre de nouvelles perspectives pour la régénération tissulaire, le traitement

des maladies liées aux CCN et le développement de thérapies cellulaires innovantes. En parallèle, les régulateurs épigénétiques, tels que les complexes Polycomb et Trithorax sont également impliqués dans la multipotence et la différenciation des CCN en modulant l'accessibilité de la chromatine pour réprimer ou activer l'expression de gènes nécessaires à la différenciation des CCN (Minoux *et al.*, 2017).

La régionalisation des CCN le long de l'axe antéro-postérieur est également un processus très important dans la génération de la diversité de leurs dérivés. Les sous-populations régionales de CCN, telles que les CCN crânielles ou celles du tronc, migrent vers des destinations spécifiques et donnent naissance à des types cellulaires distincts en fonction de la région où elles se trouvent, allant des neurones sensoriels et des cellules gliales aux mélanocytes et aux cellules osseuses (Figure 1.3 et 1.4) (Erickson *et al.*, 2023; Kuo et Erickson, 2010; Pilon, N., 2021; Rocha *et al.*, 2020). En fonction de leur origine le long de cet axe, les différentes sous-populations régionales de CCN migrent vers des destinations distinctes et se différencient en types cellulaires adaptés à leur destination. Par exemple, les CCN crânielles contribuent à la formation des neurones sensoriels et parasympathiques, ainsi qu'à de nombreux types cellulaires ectomésenchymateux qui participent à la formation du squelette crâniofacial, tels que les ostéoblastes et les chondrocytes. En revanche, les CCN du tronc suivent des voies migratoires distinctes qui les conduisent à se différencier en neurones sensoriels des ganglions de la racine dorsale, en neurones sympathiques, ou en mélanocytes (Pilon, N., 2021; Rocha *et al.*, 2020).

Les gènes *Hox*, des régulateurs essentiels du développement embryonnaire, jouent un rôle clé dans la structuration et la régionalisation du plan corporel de presque tous les animaux bilatériens. En contrôlant l'identité positionnelle des segments le long de l'axe antéro-postérieur, ces gènes définissent les caractéristiques régionales des tissus et des organes en développement (Merabet, 2022; Steens et Klein, 2022). Plus spécifiquement, dans les CCN, les gènes *Hox* établissent une identité positionnelle précise qui détermine leur destin et leur capacité à se différencier en types cellulaires appropriés à leur localisation embryonnaire, tels que les neurones, les cellules gliales, ou les mélanocytes (Figure 1.3) (Creuzet *et al.*, 2005). Dans les régions crânielles, les CCN sont *Hox*-négatives et sont capables de former une variété de structures faciales, y compris les os et

cartilages du squelette crâniofacial. En revanche, les CCN dérivées des régions postérieures du rhombencéphale (r4 à r8) expriment des gènes *Hox* et participent principalement à la formation des structures dérivées des arcs branchiaux, comme les cartilages hyoïdes (Creuzet *et al.*, 2005). L'expression des gènes *Hox* est également importante pour déterminer le comportement migratoire des CCN et leur engagement vers des destinées cellulaires spécifiques. Les CCN des segments *Hox*-positifs présentent une capacité restreinte à se différencier en structures du squelette facial, mais peuvent encore former des neurones et des cellules gliales ((Erickson *et al.*, 2023; Kuo et Erickson, 2010)). Ainsi, les gènes *Hox* agissent comme des régulateurs clés en intégrant les informations positionnelles pour guider les CCN vers des voies de migration appropriées et des destins cellulaires spécifiques, assurant une organisation morphologique correcte.

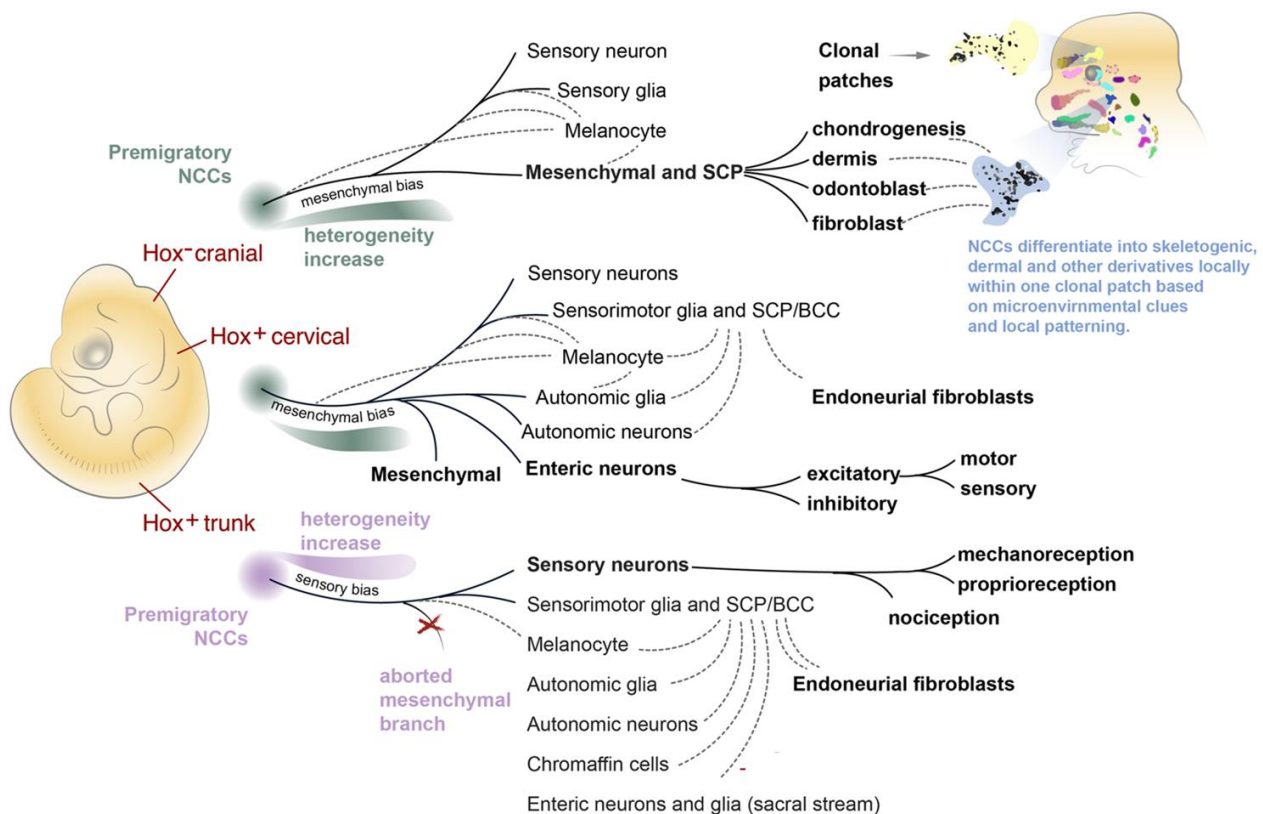


Figure 1.3 Hétérogénéité des cellules de la crête neurale et leurs biais de différenciation selon leur localisation sur l'axe antéro-postérieur.

Figure illustrant la différenciation des CCN selon leur localisation et leur expression des gènes *Hox* (Hox^- crânienne, Hox^+ cervicale et Hox^+ tronc). Les CCN prémigratoires augmentent en hétérogénéité au cours du développement, présentant des biais de différenciation spécifiques : un biais mésenchymateux pour les CCN crâniennes et cervicales, et un biais sensoriel pour les CCN du tronc. Les CCN crâniennes contribuent à des dérivés mésenchymateux comme les chondrocytes, les fibroblastes et les odontoblastes, tandis que les CCN cervicales et du tronc génèrent des neurones sensitifs, des cellules gliales, des mélanocytes, ainsi que des neurones et cellules gliales autonomes. Le schéma montre également que les CCN se différencient localement en structures clonales sous l'influence de signaux micro-environnementaux et d'une signalisation locale spécifique. Figure adaptée de (Erickson *et al.*, 2023).

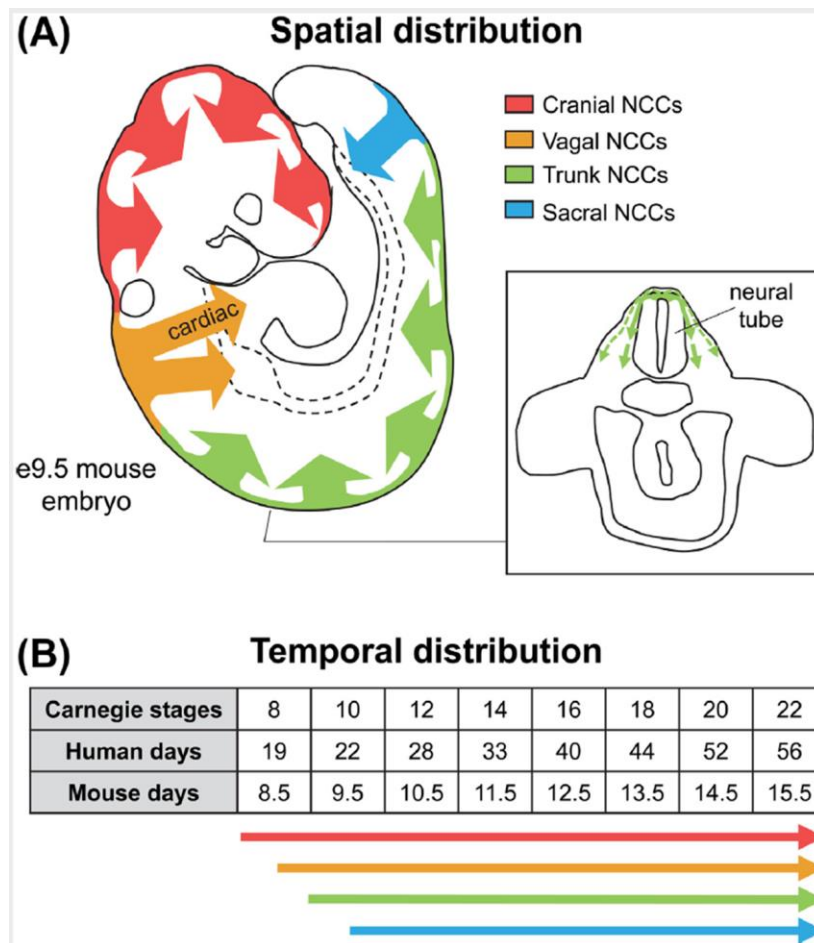


Figure 1.4 Distribution spatiale et temporelle des cellules de la crête neurale (CCN).

(A) Représentation schématique de la distribution spatiale des CCN dans un embryon de souris à e9.5. Les CCN sont réparties en différentes sous-populations : CCN crâniales (rouge), CCN vagues (orange), CCN du tronc (vert), et CCN sacrales (bleu), chacune migrante vers des régions spécifiques de l'embryon pour donner naissance à divers tissus. Une vue transversale montre la région du tube neural, d'où les CCN émergent. (B) Distribution temporelle des CCN au cours du développement chez la souris et chez l'humain, aux stades de Carnegie correspondant. Les correspondances en jours pour le développement embryonnaire humain et murin sont indiquées, et les phases d'apparition des différentes sous-populations de CCN sont représentées par des flèches de couleur correspondant aux groupes de CCN identifiés dans la partie A. Figure adaptée de (Pilon, Nicolas, 2021)

Par ailleurs, le facteur de transcription SOX10, dont les fonctions spécifiques seront discutées en détails plus loin, a été identifié comme un régulateur clé des CCN, notamment en maintenant leur état multipotent et en régulant leur spécification et leur différenciation en plusieurs types de dérivés cellulaires. SOX10 est exprimé dans les CCN dès les premières étapes du développement et coordonne plusieurs voies de signalisation, y compris celles de FGF, WNT et de l'acide rétinoïque, essentielles à leur bon développement (Horikiri *et al.*, 2017; Kim *et al.*, 2003; Pingault *et al.*, 2022; Pozniak *et al.*, 2010; Saldana-Caboverde *et al.*, 2015)

En résumé, les CCN constituent un modèle idéal pour étudier la diversification cellulaire pendant le développement embryonnaire en raison de leur multipotence, de leur capacité migratoire et de la variété des types cellulaires qu'elles peuvent générer. Comprendre les mécanismes de spécification et de différenciation des CCN est essentiel non seulement pour élucider les bases du développement embryonnaire normal mais aussi pour mieux comprendre et traiter les maladies congénitales liées aux perturbations du développement des CCN, appelées neurocristopathies (Kalcheim, 2019; Pilon, N., 2021).

1.2 Les neurocristopathies

Les neurocristopathies sont un groupe de conditions rares et complexes qui résultent de perturbations ou d'anomalies dans le développement, la migration, la prolifération ou la différenciation des CCN (Bolande, 1997). Ainsi, les neurocristopathies peuvent se manifester par une large variété de symptômes et de phénotypes en affectant une multitude d'organes et de tissus (Bolande, 1997; Etchevers *et al.*, 2006; Etchevers *et al.*, 2019; Pilon, N., 2021). Robert

Bolande a introduit le concept de neurocristopathie en 1974, classant ces conditions en quatre catégories : tumeurs, syndromes tumoraux, malformations et autres neurocristopathies (Etchevers *et al.*, 2019). Plus récemment, une nouvelle classification a été proposée, regroupant les neurocristopathies selon le stade de développement des CCN affecté lors de l'apparition de la maladie : (1) induction et spécification des CCN, (2) migration des CCN, et (3) différenciation des CCN (Vega-Lopez *et al.*, 2018). Parmi les exemples notables de neurocristopathies, on trouve la maladie de Hirschsprung, caractérisée par une absence de ganglions nerveux dans une partie du tractus gastro-intestinal, et les syndromes de Treacher Collins et CHARGE, qui affectent le développement crâniofacial (Pilon, N., 2021). Ces pathologies démontrent l'impact profond que les anomalies du développement des CCN peuvent avoir sur les individus, souvent dès la naissance.

Les manifestations cliniques des neurocristopathies peuvent aller d'un symptôme isolé, comme la surdité ou une anomalie de la pigmentation, à des syndromes complexes et multi-systémiques, soulignant l'importance de comprendre les mécanismes de développement sous-jacents r g s par les CCN. Les recherches actuelles dans ce domaine se concentrent sur l'identification des gènes et des voies de signalisation impliqués dans la régulation des CCN, ainsi que sur le développement de stratégies thérapeutiques pour traiter ces maladies rares et complexes (Bolande, 1997; Pilon, 2022; Vega-Lopez *et al.*, 2018). En s'intéressant aux neurocristopathies et en approfondissant nos connaissances sur ces conditions, nous pouvons espérer améliorer la prise en charge et la qualité de vie des personnes qui en sont atteintes.

1.2.1 Le syndrome de Waardenburg

Le syndrome de Waardenburg (WS) est une neurocristopathie rare qui affecte environ 1 nouveau-n  sur 20 000 à 1 sur 50 000. Il se caractérise par des anomalies de la pigmentation de la peau, des cheveux et des yeux. Les patients présentent souvent des taches blanches ou des zones de dépigmentation cutanée, ainsi que des variations dans la couleur des cheveux et des yeux, pouvant aller des yeux bleu vif à des teintes vertes inhabituelles. Le syndrome de Waardenburg se présente sous quatre formes principales, chacune avec des caractéristiques cliniques et des causes génétiques qui leur sont propres :

-Type 1 (WS1) : Il s'agit de la forme la plus commune, souvent associée à des mutations dans le gène *PAX3*. Les individus atteints de WS1 présentent typiquement une dystopie canthorum (augmentation de la distance entre les coins internes des yeux) en plus des anomalies de pigmentation et de la surdité (Pingault *et al.*, 2010).

-Type 2 (WS2) : Similaire à WS1 mais sans dystopie canthorum, WS2 est principalement associé à des mutations dans le gène *MITF*. Les patients présentent des anomalies de pigmentation et une surdité, mais sans les caractéristiques faciales spécifiques observées dans WS1 (Bondurand *et al.*, 2007)

-Type 3 (WS3) : Connu également sous le nom de syndrome de Klein-Waardenburg, WS3 inclut les caractéristiques du WS1 avec en plus des anomalies musculosquelettiques telles que des contractures des membres supérieurs. Comme WS1, il est lié à des mutations dans le gène *PAX3* (Pingault *et al.*, 2010)

-Type 4 (WS4) : Également appelé syndrome de Waardenburg-Shah, ou Waardenburg-Hirschsprung. WS4 combine les caractéristiques de WS2 avec la maladie de Hirschsprung qui est décrite dans la section suivante, une condition où une partie de l'intestin est dépourvu de système nerveux, entraînant une obstruction intestinale sévère. Il s'agit de la forme la plus grave du syndrome de Waardenburg en raison de son association avec la maladie de Hirschsprung. WS4 est causé par des mutations dans les gènes *EDNRB*, *EDN3* et *SOX10*, tous impliqués dans le développement des CCN (Bogdanova-Mihaylova *et al.*, 2017; Pingault *et al.*, 2010; Pingault *et al.*, 2022; Wang, Y. *et al.*, 2023)

1.2.2 La maladie de Hirschsprung

La maladie de Hirschsprung (HSCR) est une neurocristopathie rare et sévère affectant le développement du SNE. Cette condition congénitale, également connue sous le nom de mégacôlon aganglionnaire, est caractérisée par l'absence de ganglions nerveux dans une portion du tractus gastrointestinal, ce qui provoque un grave dysfonctionnement du péristaltisme (Bergeron *et al.*, 2013). En l'absence de ces ganglions, le segment affecté du côlon est incapable

de se contracter normalement, entraînant une constipation chronique, des distensions abdominales, et des obstructions intestinales potentiellement mortelles. La maladie touche environ 1 nouveau-né sur 5 000 et présente un ratio de prévalence de 4:1 entre les garçons et les filles, une prédominance masculine qui commence tout juste à être mieux comprise grâce à l'émergence de modèles murins reproduisant ce biais (Bergeron *et al.*, 2015; Bergeron *et al.*, 2013). La pathogénie de la maladie de Hirschsprung est liée à une défaillance de la colonisation du tube digestif en développement par les cellules progénitrices du SNE, qui dérivent des CCN. Au cours de leur développement les CCN migrent normalement à partir de l'extrémité dorsale du tube neural pour coloniser progressivement l'ensemble du tractus gastro-intestinal et générer la grande variété de cellules neuronales et gliales qui compose le SNE. Cependant, dans le cas de HSCR, ce processus est interrompu, empêchant la formation du réseau ganglionnaire nécessaire pour le contrôle de la motilité intestinale (Bergeron *et al.*, 2013). La migration et la différenciation des CCN nécessaire à la formation du SNE sont influencées par de nombreux facteurs génétiques et moléculaires. Les mutations dans plusieurs gènes, tels que *RET*, *EDNRB*, et *SOX10* chez l'humain, sont connues pour être associées à cette maladie, bien que l'on estime que les mutations identifiées n'expliquent que moins de la moitié des cas cliniquement observés (Bergeron *et al.*, 2013; Cantrell *et al.*, 2004; Ederly *et al.*, 1994; Zhu *et al.*, 2004). Tous les processus liés à la migration, à prolifération, la différenciation et/ou à la survie cellulaire des CCN pendant les stades développementaux au cours desquels le SNE se forme sont susceptible d'être impliqué dans la pathogenèse de cette maladie. Par exemple, une migration insuffisante ou une différenciation prématurée des CCN peuvent conduire à une aganglionose bien que les processus affectés soient différents (Bergeron *et al.*, 2016; Bergeron *et al.*, 2013; Cardinal *et al.*, 2020; Soret, 2015) . Les traitements actuels de la maladie de Hirschsprung impliquent généralement la résection chirurgicale du segment aganglionnaire suivi d'une anastomose entre l'intestin proximal et l'anus. Cependant, cette approche change un défaut léthal en une affection chronique qui peut inclure des complications persistantes telles que la constipation, des infections récurrentes, et des troubles nutritionnels. Par conséquent, des stratégies thérapeutiques innovantes sont actuellement explorées pour mieux traiter cette condition, y compris des thérapies cellulaires ou, plus récemment, une thérapie moins invasive par lavement rectal des nouveau-nés atteints avec

des facteurs induisant la migration et la neurogenèse post-natale des CCN (Bergeron *et al.*, 2013; Soret, 2020).

Chez l'humain les mutations dans le gène *SOX10* constitue une cause pathogénique commune de la maladie de Hirschsprung et de WS4. Comme mentionné précédemment, *SOX10* est essentiel au développement des CCN. Les mutations de *SOX10* identifiées chez les patients atteints de WS4 sont principalement des mutations tronquantes, comme des mutations non-sens et des décalages du cadre de lecture, qui entraînent souvent une perte de la fonction du gène ou une haplo-insuffisance. Ces mutations perturbent la différenciation des mélanocytes, provoquant des anomalies pigmentaires, et entravent le développement du système nerveux entérique par les CCN, menant à la maladie de Hirschsprung (Bondurand *et al.*, 2007; Bondurand *et al.*, 2006; Cantrell *et al.*, 2004). Plus précisément, *SOX10* régule plusieurs gènes clés impliqués dans la spécification et la différenciation des mélanocytes et dans le développement du SNE, tels que *MITF*, *EDNRB*, et *RET*. Des études ont montré que les mutations de *SOX10* causent des formes dominantes de WS4, contrairement aux mutations de *EDNRB* et *EDN3*, qui sont généralement récessives (Pingault *et al.*, 1998). De plus, les mutations de *SOX10* peuvent conduire à des manifestations cliniques variées, allant de la surdité à des anomalies neurologiques affectant le SNP telles que la neuropathie démyélinisante périphérique et la leucodystrophie centrale, connues sous le nom de syndrome PCWH (Peripheral Demyelinating Neuropathy, Central Dysmyelinating Leukodystrophy, Waardenburg syndrome, and Hirschsprung disease) (Bhattarai *et al.*, 2022). Les modèles murins du syndrome de Waardenburg, présentant des mutations de *Sox10* similaires à celles observées chez l'homme, révèlent des défauts de pigmentation et de développement du SNE correspondant au phénotype de WS4, soulignant le rôle central de *SOX10* dans la régulation du destin des cellules de la crête neurale, en particulier des mélanocytes et des progéniteurs du SNE (Bondurand et Sham, 2013; Pingault *et al.*, 1998).

1.3 Les modèles murins dans l'étude des neurocristopathies

1.3.1 Les modèles murins : un outil indispensable dans l'étude des neurocristopathies

Les neurocristopathies ont été étudiées à l'aide de divers modèles animaux, notamment le poisson zèbre, les amphibiens et les poulets, chacun offrant des avantages spécifiques, tels que le développement rapide, la transparence des embryons ou la facilité de manipulation génétique. Cependant, les modèles murins se sont imposés comme un outil indispensable pour la recherche sur les neurocristopathies en raison de leur similitude génétique et physiologique avec l'être humain. Cette proximité facilite l'exploration des mécanismes moléculaires et cellulaires sous-jacents aux pathologies, permettant non seulement de mieux comprendre les phénomènes pathogéniques, mais aussi de développer et tester des stratégies thérapeutiques innovantes (Belanger *et al.*, 2018; Cardinal *et al.*, 2020; Soret, 2020; Soret *et al.*, 2015).

Les modèles murins, notamment les souris *knock-out* et *knock-in*, offrent un moyen puissant d'analyser le rôle de gènes clés dans le développement des CCN et sont un outil indispensable dans les études fonctionnelles. Par exemple, la création de souris mutantes pour le gène *Sox10* a permis de reproduire des caractéristiques du syndrome de Waardenburg-Shah, confirmant le rôle critique de *Sox10* dans la maladie de Hirschsprung et d'autres neurocristopathies comme mentionné précédemment (Pingault *et al.*, 1998; Pingault *et al.*, 1997; Southard-Smith *et al.*, 1999). Les souris partagent avec les êtres humains des structures anatomiques et physiologiques similaires, notamment dans le système nerveux et le système digestif, ce qui les rend particulièrement appropriées pour l'étude des neurocristopathies. Des modèles murins pour la maladie de Hirschsprung ont montré des anomalies histologiques et fonctionnelles similaires à celles observées chez les patients, fournissant ainsi un cadre biologiquement pertinent pour l'étude de ces conditions (Bergeron *et al.*, 2015; Bondurand et Southard-Smith, 2016; Soret, 2015). Ces modèles permettent également des études fonctionnelles approfondies, comme l'analyse des voies de migration des CCN et de leur intégration dans les structures ciblées. Des études *in vivo* utilisant des techniques de marquage cellulaire spécifique et d'imagerie avancée ont permis de suivre les trajectoires migratoires des CCN et de découvrir des mécanismes critiques qui influencent leur développement normal et pathologique (Baggiolini *et al.*, 2015; Druckenbrod et

Epstein, 2005; Mort *et al.*, 2015; Takahashi *et al.*, 2013). En particulier, les modèles murins ont été cruciaux pour démontrer comment les mutations dans *SOX10* affectent les trajectoires développementales des CCN et contribuent à des maladies telles que la maladie de Hirschsprung et le syndrome de Waardenburg (Pingault *et al.*, 2022). Enfin, les souris sont essentielles pour la recherche translationnelle, où les découvertes fondamentales sont appliquées à la compréhension et au traitement des maladies humaines. Des études précliniques sur des modèles murins de neurocristopathies ont conduit à des avancées thérapeutiques, notamment dans le développement de stratégies pour traiter la maladie de Hirschsprung (Soret, 2020). Ces approches prometteuses montrent comment les connaissances acquises grâce aux modèles murins peuvent être transformées en bénéfices cliniques pour les patients (Soret, 2015).

Dans l'ensemble, les modèles murins ont prouvé leur valeur inestimable dans l'étude des neurocristopathies, allant de la compréhension des bases génétiques et moléculaires à l'évaluation de nouvelles thérapies. Leur utilisation continue d'éclairer notre compréhension des mécanismes complexes sous-jacents à ces maladies et facilite le développement de stratégies préventives et thérapeutiques innovantes.

1.3.2 Stratégie de génération de nouveaux modèles murins pour l'étude des neurocristopathies

Une approche novatrice pour générer des modèles murins spécifiques à l'étude des neurocristopathies, fondée sur une mutagenèse insertionnelle aléatoire, a été récemment décrite et s'est révélée efficace pour identifier de nouveaux gènes candidats et mécanismes pathogéniques impliqués dans diverses neurocristopathies (Pilon, 2016). Cette stratégie, qui a notamment permis de développer le modèle murin *Spot* étudié dans cette thèse, exploite le fait que la pigmentation de la souris est contrôlée par les mélanocytes, qui dérivent des CCN. En réintroduisant un transgène fonctionnel de la tyrosinase (Tyr) dans des souris albinos, dépourvues de pigmentation en raison d'une déficience en tyrosinase, une pigmentation normale devrait être observée si le transgène s'intègre dans un locus sans importance pour le développement normal des CCN. En revanche, si l'insertion du transgène perturbe un locus essentiel au développement des CCN, des anomalies de pigmentation, visibles à l'œil nu, apparaissent, car les mélanocytes

dérivés des CCN ne se développent pas correctement (Figure 1.5). Cette approche a permis d'identifier cinq lignées murines présentant une hypopigmentation sur un total d'environ 200 lignées générées, chacune manifestant un phénotype distinct associé aux CCN lorsqu'elles sont homozygotes pour l'insertion du transgène (Pilon, 2016).

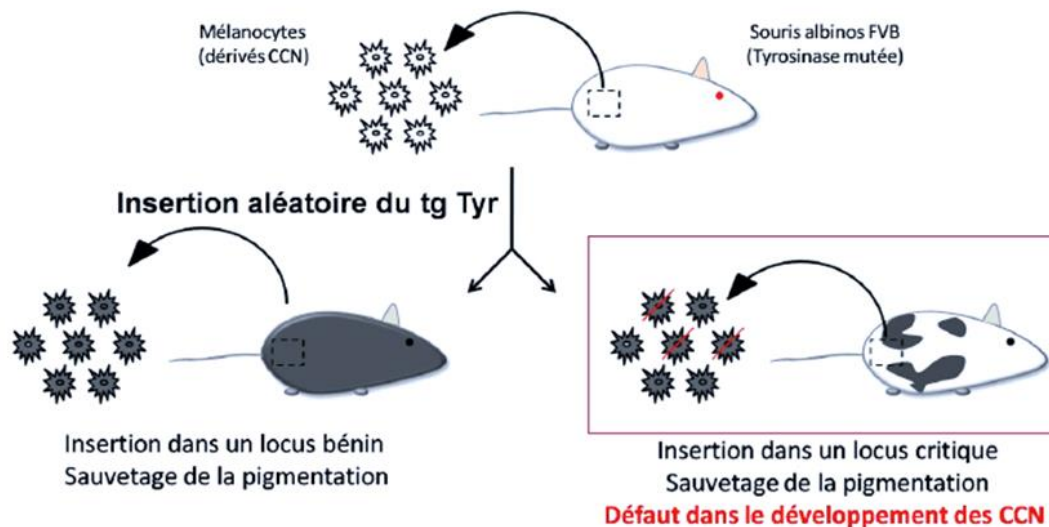


Figure 1.5 Stratégie de criblage pour générer des modèles murins de neurocristopathies.

Les CCN sont à l'origine des mélanocytes, responsables de la pigmentation. En utilisant des souris albinos FVB (mutation de la tyrosinase), le transgène Tyr est inséré aléatoirement pour restaurer la pigmentation. Lorsque l'insertion se fait dans un locus bénin, la pigmentation est sauvée, et le développement des CCN est normal. En revanche, une insertion dans un locus critique restaure la pigmentation tout en perturbant le développement des CCN, générant ainsi un modèle de neurocristopathie. Les défauts de pigmentation observés indiquent directement un problème au niveau des CCN, permettant ainsi un criblage efficace pour identifier les souris présentant des anomalies de développement des CCN.

Parmi ces lignées, trois - *Spot*, *TashT*, et *Holstein* - se sont avérées être de nouveaux modèles pour la maladie de Hirschsprung. Des analyses approfondies ont montré que la lignée *TashT* était liée à une dérégulation d'un gène sur le chromosome Y et a permis de mieux comprendre le biais male chez les personnes atteintes de la maladie de Hirschsprung, tandis que la lignée *Holstein* présentait une perturbation de l'environnement extracellulaire due à des altérations dans le collagène VI et a conduit à l'élaboration d'une nouvelle thérapie pour la maladie de Hirschsprung (Bergeron *et al.*, 2015; Bergeron *et al.*, 2016; Soret, 2015, 2020). Les sites d'insertion du transgène

dans ces lignées ont été cartographiés, révélant des loci non précédemment associés aux neurocristopathies. De manière intéressante, ces trois lignées ont démontré que l'insertion perturbait des séquences régulatrices non-codantes hautement conservées, soulignant l'importance de ces éléments dans le développement normal des CCN. Cette méthode de mutagenèse insertionnelle basée sur l'analyse de la pigmentation a déjà prouvé son efficacité dans l'étude des neurocristopathies en peu de temps, en permettant de générer de nouveaux modèles murins pour des maladies qui restent encore en grande partie mal comprise comme la maladie de Hirschsprung, le syndrome CHARGE et le syndrome de Waardenburg. Grâce à ces modèles, des éléments régulateurs et des régions non codantes jouant un rôle crucial dans la pathogenèse de ces maladies ont été révélés, mais de nouveaux gènes causatifs ont aussi été identifiés (Belanger *et al.*, 2018; Sallis *et al.*, 2023). De plus, l'un de ces modèles a même conduit au développement d'un nouveau traitement pour la maladie de Hirschsprung (Soret, 2020).

En somme, cette approche ouvre la voie à de nouvelles découvertes fondamentales inattendues et offre potentiellement des perspectives prometteuses pour le développement de stratégies thérapeutiques.

1.4 La lignée de souris *Spot* : Un modèle murin pour le Syndrome de Waardenburg de Type IV

Le modèle murin *Spot*, utilisé dans les travaux de recherche de cette thèse, a été obtenu avec l'approche décrite ci-dessus représente un nouvel outil pour l'étude du syndrome de Waardenburg de type 4 (WS4) et de la maladie de Hirschsprung mais plus généralement pour mieux comprendre le développement des CCN. En premier lieu, l'étude de Bergeron *et al* (2016), a permis de caractériser ce modèle en profondeur et de l'associer à WS4 (Bergeron *et al.*, 2016). Les souris *Spot* hétérozygotes pour l'insertion présente un pelage caractérisé par quelques « taches » ou « spot » en anglais mais sont majoritairement dépigmentées, c'est de cette observation que provient le nom original du modèle. Les souris *Spot* homozygotes (*Spot*^{Tg/Tg}) présentent un phénotype caractérisé par une dépigmentation totale de la fourrure, un comportement de rotation circulaire incontrôlé (spinning) dû à un dysfonctionnement vestibulaire dans l'oreille interne, ainsi qu'un mégacôlon aganglionnaire typique de la maladie de Hirschsprung (Figure 1.6). Une analyse phénotypique plus approfondie a révélé une létalité

périnatale chez la majorité des souriceaux *Spot^{Tg/Tg}* (environ 70%) probablement causée par des malformations des nerfs crâniens impliqués dans la succion et la déglutition (Bergeron *et al.*, 2016). Cette étude a aussi mis en évidence une absence de mélanocytes dans les organes sensoriels vestibulaires des souris mutantes, accompagnée d'un effondrement de l'espace endolymphatique. Concernant le phénotype de mégacôlon aganglionnaire, les analyses ont révélés un défaut de colonisation du côlon par les progéniteurs entériques dérivés des CCN, causé par une différenciation prématurée de ces progéniteurs en cellules gliales et caractérisée par une augmentation de l'expression de gènes marqueurs des cellules gliales entériques comme *Fabp7*, *Mpz*, *Plp1* ou *s100b*.

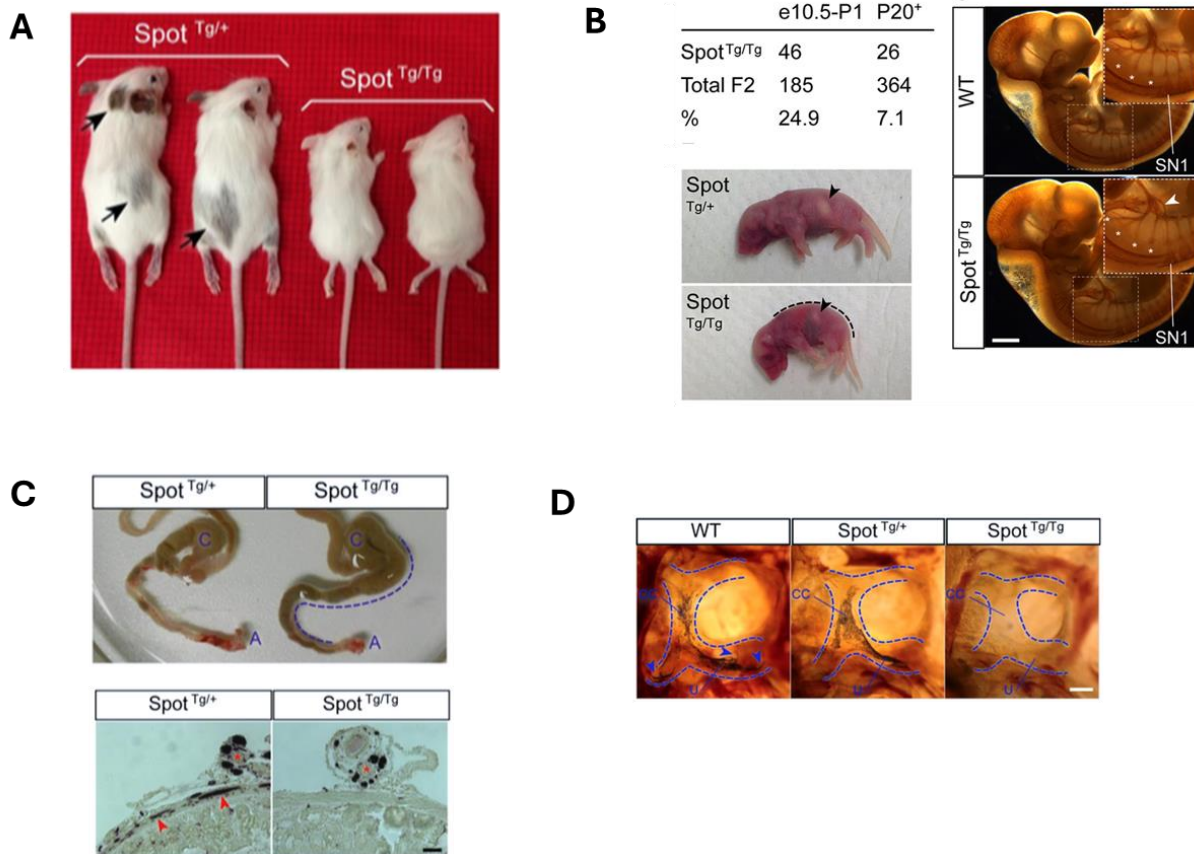


Figure 1.6 Phénotypes observés chez les souris *Spot*, modèle murin de WS4.

(A) Phénotype externe des souris *Spot*. Les souris *Spot^{Tg/+}* présentent des dépigmentations marquées (flèches), tandis que les souris *Spot^{Tg/Tg}* homozygotes pour la mutation montrent une absence totale de pigmentation, suggérant un défaut de différenciation des mélanocytes (B) Mortalité périnatale des souris

Spot^{Tg/Tg} probablement due à des défauts d'innervation périphérique empêchant les nouveau-nés de se nourrir, comme le montre l'absence de milk spot (tâche blanche caractéristique indiquant la prise de lait). (C) Mégacôlon aganglionnaire observé chez les souris *Spot*^{Tg/Tg}, caractéristique de la maladie de Hirschsprung. L'absence de cellules ganglionnaires dans le système nerveux entérique (SNE) entraîne une distension du côlon (C). (D) Absence de mélanocytes dans le vestibule de l'oreille interne chez les souris *Spot*^{Tg/Tg}, comparée aux souris sauvages (WT) et hétérozygotes, suggérant un défaut de pigmentation dans cette région. (Bergeron *et al.*, 2016)

Les études moléculaires ont localisé le site d'insertion du transgène dans une région non codante située entre les gènes *Nr2f1* et *A830082K12Rik* (connu sous le nom de *NR2F1-AS* chez l'humain), codant respectivement pour un facteur de transcription de la famille des récepteurs nucléaire orphelins et son ARN long non codant (lncRNA) antisens divergent (Figure 1.7). Cette insertion perturbe une interaction à longue distance entre le promoteur de ces gènes et un élément cis-régulateur répresseur, ce qui semble être à l'origine de leur surexpression dans les CCN colonisant les intestins embryonnaires (Bergeron *et al.*, 2016). La surexpression de *Nr2f1* dans ces cellules est considérée comme la cause principale de la différenciation prématurée des progéniteurs entérique en cellules gliales entérique, conduisant au mégacôlon aganglionnaire. Compte tenu de cette observation et de la proximité de l'insertion transgénique avec *Nr2f1*, la nomenclature *Spot*^{Tg} a été remplacée par la suite par *Nr2f1*^{Spot}.

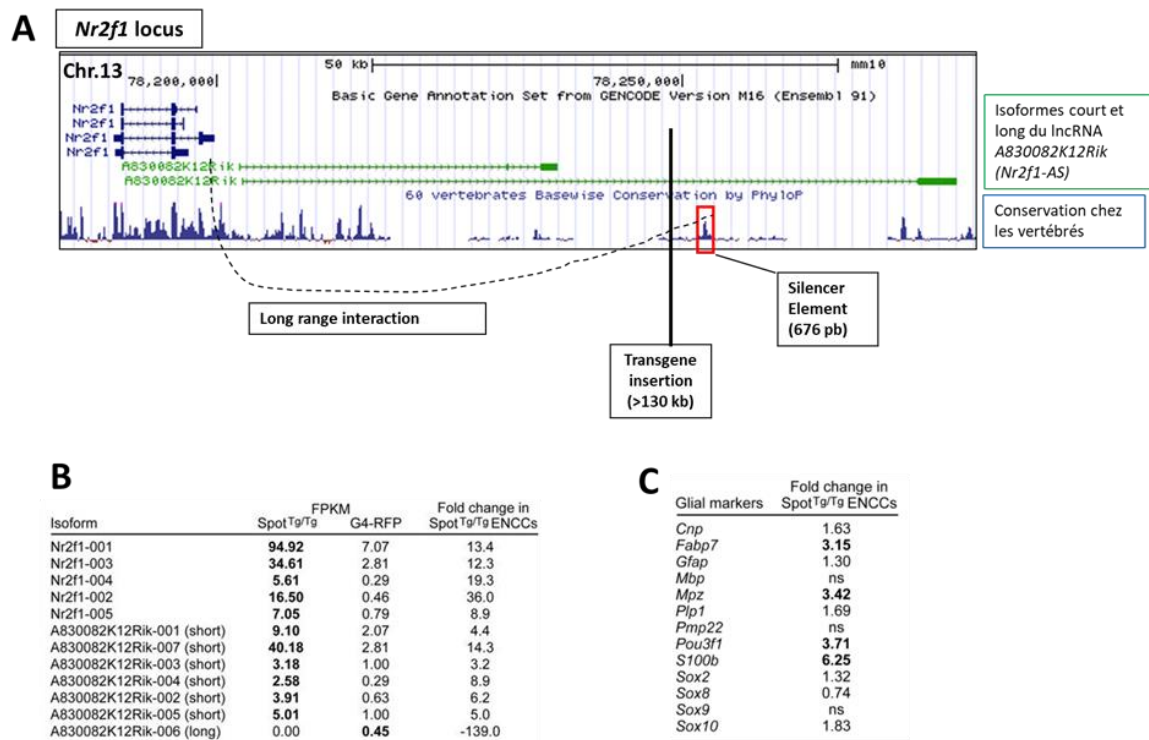


Figure 1.7 La mutation *Spot* et ses conséquences sur l'expression de *Nr2f1*, de son lncRNA *A830082K12Rik* et des marqueurs gliaux dans les CCN entériques.

(A) le locus de *Nr2f1* sur le chromosome 13 est illustré, montrant l'insertion transgénique (>130 kb) dans l'intron de la forme longue du lncRNA *A830082K12Rik*. L'insertion perturbe une interaction à longue distance entre *Nr2f1*, son lncRNA *A830082K12Rik* et un répresseur conservé chez les vertébrés. (B) niveaux d'expression (FPKM) des différents isoformes de *Nr2f1* et du lncRNA dans les CCN entériques des embryons *Spot^{Tg/Tg}* par rapport aux contrôles (*G4-RFP*). (C) Surexpression de plusieurs gènes gliaux dans les CCN entériques des embryons *Spot^{Tg/Tg}*.

Pour ce qui est du développement des mélanocytes, la surexpression de *Nr2f1* force les mélanoblastes, qui normalement migrent de manière dorsolatérale pour devenir des mélanocytes, à adopter un destin de précurseur de cellule de Schwann (SCP). Inversement, elle empêche les SCP qui migrent ventralement de se différencier normalement en mélanoblastes. Cet effet est particulièrement marqué dans le tronc, où les mélanoblastes dérivés des SCP sont réorientés vers un destin glial, tandis que les mélanoblastes dérivés des CCN ne parviennent pas à coloniser les régions cibles telles que le vestibule de l'oreille interne, entraînant des défauts de pigmentation et de dysfonctionnement vestibulaire (Bonnamour *et al.*, 2022). L'impact de la surexpression de *Nr2f1* varie également selon les régions anatomiques. Dans la région de la tête,

par exemple, la surexpression de *Nr2f1* semble ne pas être uniforme, ce qui permet aux mélanocytes dérivés des SCP de coloniser la cochlée tout en empêchant les mélanocytes dérivés directement des CCN d'atteindre le vestibule (Bonnamour *et al.*, 2022). Cela suggère une régulation complexe et différenciée de *Nr2f1* en fonction du contexte régional et de la sous-population de CCN concernée.

Les travaux de Bergeron *et al.* (2016) et de Bonnamour *et al.* (2022) fournissent respectivement une analyse approfondie du développement du SNE et des mélanocytes dans le modèle *Spot* et mettent en évidence l'importance de *Nr2f1* dans la régulation des décisions de destin cellulaire des CCN qui n'était pas encore documenté ailleurs. Le modèle *Spot* apporte une perspective intéressante sur le rôle de *Nr2f1* dans le développement des CCN, illustrant comment sa surexpression entraîne des changements majeurs dans les trajectoires de différenciation cellulaire et les phénotypes pathologiques associés (Figure 1.8). Bien que NR2F1 ait été identifié dès les années 1980, et malgré des recherches intensives sur cette famille de récepteurs depuis plusieurs décennies, son implication dans le développement des CCN est restée largement méconnue jusqu'à récemment (Evans et Mangelsdorf, 2014; Kieback *et al.*, 1993; Yang *et al.*, 2017). Le modèle *Spot* représente donc une excellente opportunité d'étudier la fonction de *Nr2f1* ainsi que les mécanismes qui contrôlent son expression au cours du développement des CCN.

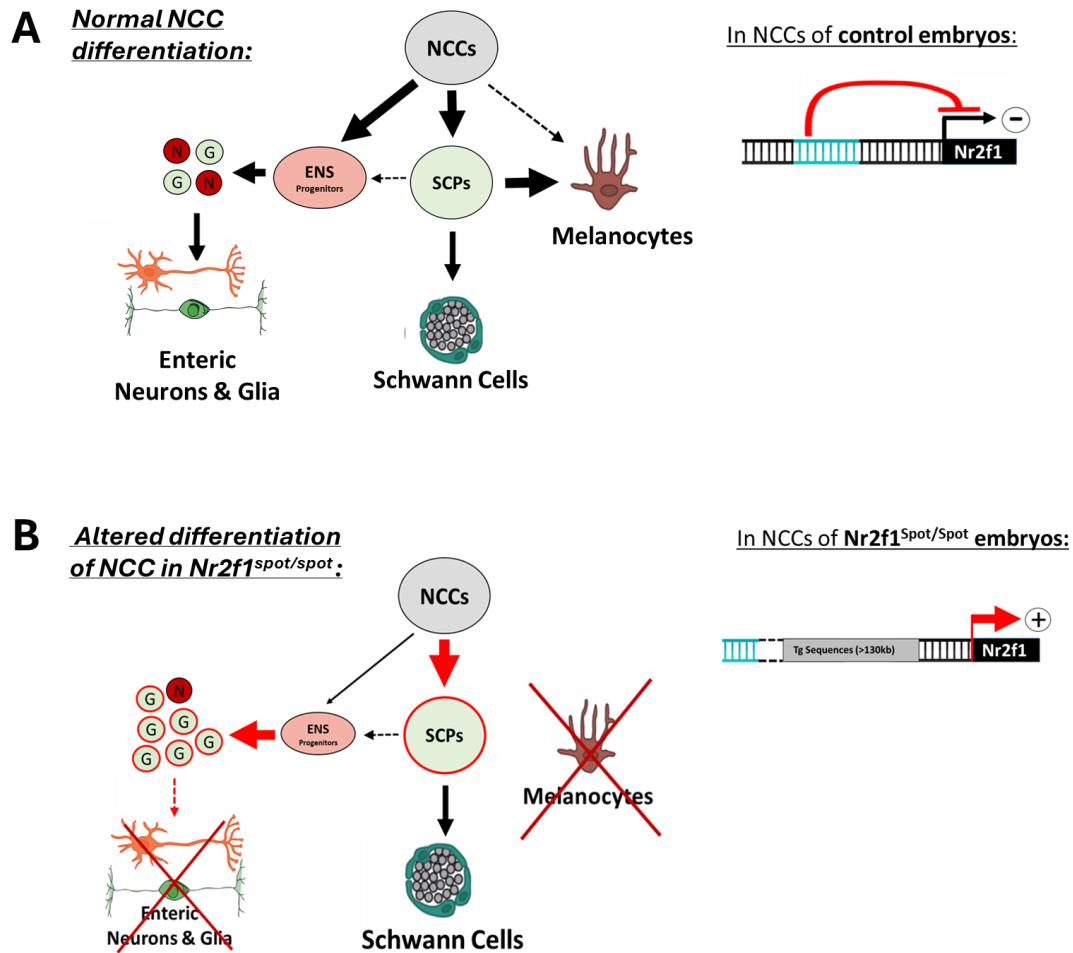


Figure 1.8 Conséquence de la mutation *Spot* sur la différenciation des progéniteurs dérivés des CCN.

(A) Dans des conditions normales, les progéniteurs dérivés des CCN donnent naissance aux neurones et cellules gliales du SNE, aux mélanocytes, et aux cellules de Schwann. (B) Dans le modèle *Nr2f1^{Spot/Spot}*, on observe une absence de mélanocytes et de SNE en faveur d'une différenciation gliale.

1.5 NR2F1 et son rôle dans le développement embryonnaire

NR2F1, également appelé COUP-TFI (Chicken Ovalbumin Upstream Promoter-Transcription Factor I), fait partie de la superfamille des récepteurs nucléaires, une classe de facteurs de transcription qui régulent l'expression de nombreux gènes en réponse à des signaux hormonaux ou métaboliques. Cette superfamille est composée de plusieurs récepteurs, regroupés selon leurs domaines fonctionnels et leurs mécanismes de régulation. NR2F1 appartient à la sous-famille des récepteurs orphelins, c'est-à-dire des récepteurs pour lesquels aucun ligand spécifique n'a été identifié (Evans et Mangelsdorf, 2014; Weikum et al., 2018). Comme les autres récepteurs nucléaires, NR2F1 possède une architecture modulaire composée de plusieurs domaines fonctionnels distincts. Parmi eux, on distingue : Le domaine de liaison à l'ADN (DBD), hautement conservé au sein de la famille des récepteurs nucléaires, qui permet à NR2F1 de se fixer sur des éléments de réponse spécifiques présents dans les promoteurs et les enhanceurs de gènes cibles (Figure 1.9).

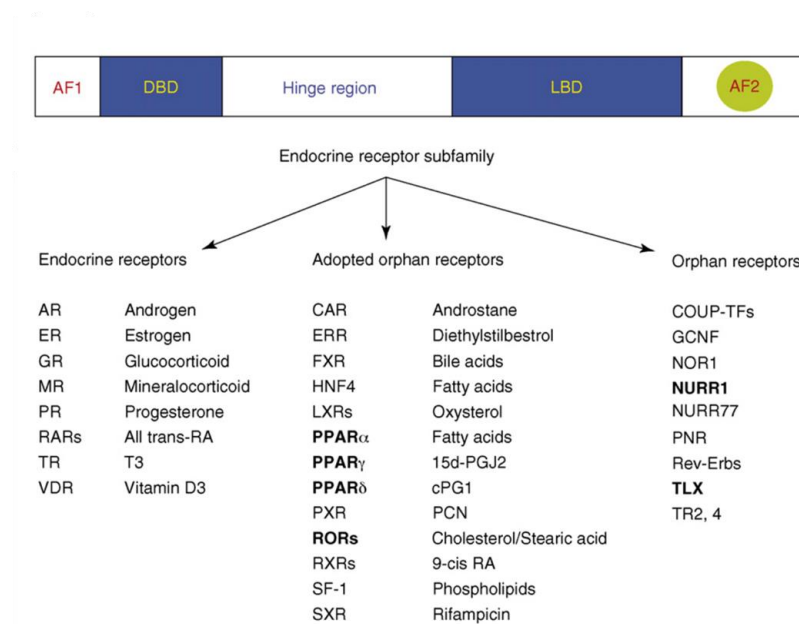


Figure 1.9 Classification des récepteurs nucléaires et structure générale de la famille

Cette figure illustre la classification des récepteurs nucléaires en trois sous-familles : les récepteurs endocriniens, les récepteurs orphelins adoptés et les récepteurs orphelins dont NR2F1 (COUP-TF1) fait partie. Elle montre également la structure générale de ces récepteurs, incluant les domaines AF1 (Activation Function 1), DBD (DNA Binding Domain), LBD (Ligand Binding Domain), et AF2 (Activation

Function 2). Les récepteurs de chaque sous-famille sont listés avec leurs ligands connus ou supposés. Parmi les récepteurs orphelins, les COUP-TFs (dont NR2F1), n'ont pas de ligands identifiés.

Le domaine de liaison au ligand (LBD), qui bien qu'orphelin dans le cas de NR2F1, joue un rôle crucial dans l'interaction avec divers co-régulateurs transcriptionnels. Ce domaine est structuré de façon à permettre une modulation allostérique, c'est-à-dire une modification de la conformation de NR2F1 en réponse à des signaux cellulaires, permettant ainsi l'activation ou la répression de la transcription génique (Weikum et al., 2018). L'un des mécanismes clés de l'action de NR2F1 repose sur sa capacité à former des hétérodimères avec le récepteur rétinoïde X (RXR). Cette interaction augmente la diversité fonctionnelle de NR2F1 en facilitant la régulation de plusieurs processus biologiques, notamment la différenciation cellulaire et le développement embryonnaire (Evans et Mangelsdorf, 2014). En se liant à des éléments de réponse spécifiques sur l'ADN, les complexes NR2F1/RXR peuvent activer ou réprimer l'expression de nombreux gènes cibles impliqués dans des processus comme la neurogenèse et la formation des organes sensoriels. La conformation dynamique de NR2F1, et plus particulièrement de son domaine AF-2 (Activation Function-2), permet une interaction flexible avec des co-activateurs ou des co-répresseurs en fonction des signaux développementaux ou environnementaux. Cette flexibilité structurelle est essentielle pour moduler finement l'expression génique selon le contexte cellulaire. NR2F1 peut ainsi activer ou réprimer la transcription de ses gènes cibles en fonction de l'accessibilité de la chromatine et de la disponibilité des co-régulateurs (Figure 1.10) (Weikum et al., 2018).

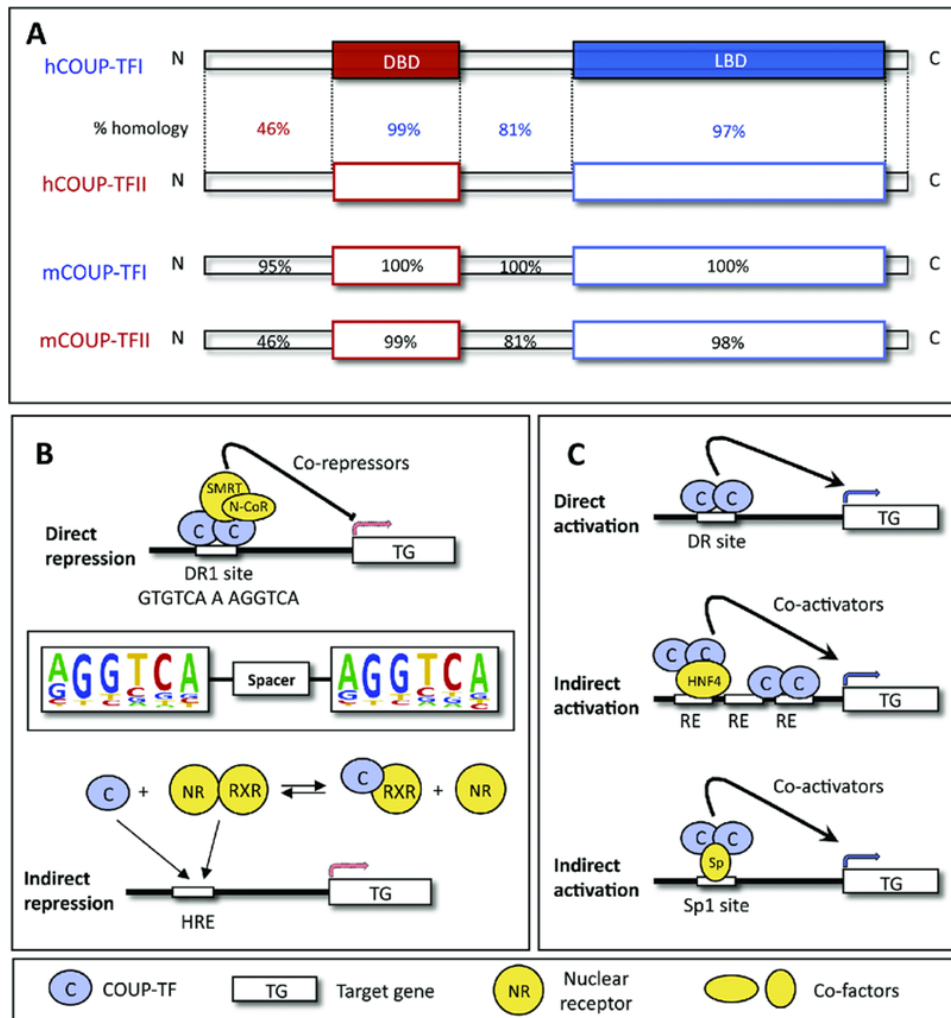


Figure 1.10 Comparaison de la structure des récepteurs COUP-TF (NR2F1 et NR2F2) et mécanismes d'activation et de répression transcriptionnelle.

(A) Représentation schématique de la structure des récepteurs COUP-TF humains et murins (hCOUP-TF et mCOUP-TF) comparant les niveaux d'homologie dans les domaines de liaison à l'ADN (DBD) et de liaison aux ligands (LBD). Les pourcentages d'homologie sont indiqués entre les différents récepteurs pour chaque domaine. (B) Mécanismes de répression transcriptionnelle directe et indirecte impliquant les récepteurs COUP-TF. En répression directe, les co-répresseurs tels que SMRT et N-CoR se lient au complexe COUP-TF au site DR1 de l'ADN. La répression indirecte peut être médiée via des interactions avec d'autres récepteurs nucléaires (NR) et le récepteur RXR. (C) Mécanismes d'activation transcriptionnelle directe et indirecte par COUP-TF. En activation directe, le complexe COUP-TF se lie aux co-activateurs au site DR de l'ADN. L'activation indirecte peut également se produire via l'interaction avec d'autres facteurs de transcription (HNF4 ou Sp1) et des co-activateurs au niveau des éléments de réponse (RE). Schema adapté de (Bertacchi *et al.*, 2018).

Découvert dans les années 1980 comme un régulateur potentiel de la transcription des gènes hormonaux, NR2F1 a depuis été identifié comme un acteur clé dans le développement embryonnaire notamment dans le développement du système nerveux central, ainsi que dans la morphogenèse et la formation des organes sensoriels (Bertacchi *et al.*, 2018; Sajinovic et Baier, 2023; Tocco *et al.*, 2021). Initialement caractérisé dans les cellules de poulet pour sa capacité à se lier à l'ADN et à réguler le promoteur de l'ovalbumine, NR2F1 a par la suite été reconnu pour son interaction avec de nombreux éléments de réponse génétique, ce qui lui confère un rôle polyvalent dans la régulation de l'expression génique. Durant les premières phases du développement embryonnaire, NR2F1 est exprimé de manière ubiquitaire, avant que sa transcription ne devienne progressivement restreinte à des tissus spécifiques où il exerce des fonctions activatrices et répressives. En se liant aux promoteurs et aux enhancers de ses gènes cibles, NR2F1 module des processus cellulaires essentiels tels que la prolifération, la différenciation et la migration cellulaire (Park *et al.*, 2003; Sajinovic et Baier, 2023). NR2F1 joue un rôle essentiel dans le développement du système nerveux central, en particulier dans la neurogenèse corticale. Il régule la prolifération des cellules progénitrices neurales et leur différenciation en neurones corticaux, contrôlant ainsi l'organisation des couches neuronales du cortex cérébral (Faedo *et al.*, 2008) (Bertacchi *et al.*, 2020). Des études chez des modèles murins ont montré que l'absence ou la mutation de *Nr2f1* entraîne des anomalies sévères du cortex cérébral, incluant une désorganisation des couches neuronales associée à des déficits cognitifs et sensoriels graves (Yang *et al.*, 2017). En outre, NR2F1 est impliqué dans le développement des systèmes sensoriels, notamment la formation de la rétine et de l'oreille interne. Il régule la prolifération et la différenciation des progéniteurs sensoriels en cellules spécialisées telles que les cellules photoréceptrices et les cellules ciliées auditives. Les études sur des souris déficientes en *Nr2f1* ont révélé des défauts dans la morphogenèse de ces organes, entraînant des anomalies de vision et d'audition (Tang *et al.*, 2006).

Chez la souris, l'inactivation combinée de *Nr2f1* et *Nr2f2* entraîne des défauts majeurs dans ces processus, menant à une non-viabilité embryonnaire, ce qui souligne leur importance cruciale dans la régulation du développement embryonnaire (Yang *et al.*, 2017). Chez l'homme, des mutations spécifiques de *NR2F1* sont associées au syndrome d'atrophie optique de Bosch-

Boonstra-Schaaf (BBOAS), une maladie génétique rare caractérisée par une déficience intellectuelle, une atrophie optique, des troubles du développement et, dans certains cas, des caractéristiques dysmorphiques faciales légères (Bosch *et al.*, 2014). Les mutations de *NR2F1* sont associées à une grande variabilité phénotypique chez l'homme, avec des manifestations cliniques qui vont au-delà du syndrome de BBOAS. Certaines mutations de *NR2F1* peuvent également entraîner d'autres troubles neurodéveloppementaux. En effet, des variants de *NR2F1* ont été identifiées chez des patients présentant des caractéristiques autistiques, des troubles de la motricité, des difficultés d'apprentissage, et des troubles épileptiques sans atrophie optique apparente (Zhang, K. *et al.*, 2020). De manière intéressante, des symptômes de l'autisme ont récemment été associés au syndrome de Waardenburg (George *et al.*, 2023). Cette diversité phénotypique suggère que les mutations de *NR2F1* peuvent altérer la régulation de nombreux gènes cibles critiques pour le développement du système nerveux. Dans l'ensemble, *NR2F1* apparaît comme un régulateur transcriptionnel polyvalent et central dans de nombreux processus embryonnaires.

Les premières études suggérant l'implication de *NR2F1* dans le développement des CCN et de leurs dérivés sont relativement récentes et ont débuté par l'observation que *NR2F1* et/ou *NR2F2* co-occupent de nombreux enhancers spécifiques aux CCN. Une étude sur un modèle *in vitro* de différenciation des CCN à partir de cellules souches embryonnaires humaines a révélé que la suppression de *NR2F1* perturbe l'expression de gènes clés des CCN, affectant ainsi leur potentiel de différenciation et le développement crâniofacial (Rada-Iglesias *et al.*, 2012). Par la suite, des recherches sur le rôle de *SOX10* dans le développement des cellules gliales myélinisantes (oligodendrocytes dans le SNC et Schwann dans le SNP) ont mis en lumière le rôle potentiel de *NR2F1/2* spécifiquement dans la différenciation et la fonction des cellules de Schwann, qui dérivent des CCN, en découvrant que de nombreux motifs pour *NR2F1/2* sont présents autour des sites liés par *SOX10* spécifiquement dans les cellules de Schwann (Lopez-Anido *et al.*, 2015). Cette étude suggère que *NR2F1* est impliqué dans la régulation de gènes clés impliqués dans la myélinisation des nerfs périphériques par *SOX10*. L'inhibition de l'expression de *Nr2f1* dans les cellules de Schwann primaires entraîne une diminution significative de l'expression de ces gènes,

soulignant son rôle essentiel dans la régulation transcriptionnelle des gènes de la myéline ciblés par SOX10.

Plus récemment, une étude a confirmé que *Nr2f1* et ses homologues, dont *Nr2f2*, sont des régulateurs clés de la transition des CCN vers un état ectomésenchymateux, crucial pour la formation des cellules squelettiques crâniofaciales comme les chondrocytes et les ostéoblastes (Okeke *et al.*, 2022). Chez le poisson-zèbre, des mutations des gènes *nr2f2* et *nr2f5* entraînent un retard dans l'activation des gènes de l'ectomésenchyme (tels que *dlx2a*, *prrx1a*, *sox9a*) et perturbent la transition normale des CCN migratoires vers des précurseurs squelettiques (Okeke *et al.*, 2022). De plus, des patients porteurs de variants hétérozygotes de *NR2F1* présentent des anomalies crâniofaciales légères, ainsi que des phénotypes visuels et cognitifs graves, suggérant une implication de *NR2F1* dans la régulation du développement des CCN chez l'humain (Okeke *et al.*, 2022; Rada-Iglesias *et al.*, 2012). Une étude récente a également montré que NR2F1 semble impliqué dans le développement des CCN par la modulation de l'épigénome pendant la transition de multipotence à différenciation. Cette étude montre que l'accessibilité des motifs de liaison à NR2F1 présente une grande variabilité au cours de la différenciation des CCN à partir d'ESC, suggérant un rôle dans l'établissement de l'identité des CCN et dans leur différenciation (Hovland *et al.*, 2022).

Globalement, les connaissances actuelles indiquent que NR2F1 semble être un régulateur clé dans la plasticité développementale des CCN en modulant l'état de la chromatine et en participant à la régulation transcriptionnelle qui sous-tend la multipotence des CCN et des cellules de Schwann qui en dérivent.

1.6 La trajectoire développementale commune des mélanocytes, des précurseurs du système nerveux entérique et des précurseurs des cellules de Schwann

Les mélanocytes, les cellules de Schwann et les précurseurs du SNE partagent une trajectoire développementale commune qui débute avec les CCN et dans laquelle le facteur de transcription SOX10 joue de multiples rôles. Dans les premières étapes du développement embryonnaire, SOX10 est exprimé dans les CCN et y joue un rôle crucial dans la régulation de leur migration et

de leur multipotence (Kelsh, 2006; Kim *et al.*, 2003; Mollaaghababa et Pavan, 2003). L'absence de SOX10 compromet la migration des CCN vers les sites où elles se différencient en divers types cellulaires, perturbant ainsi le développement normal des dérivés des CCN, notamment les mélanocytes, les cellules gliales et les neurones du SNE.

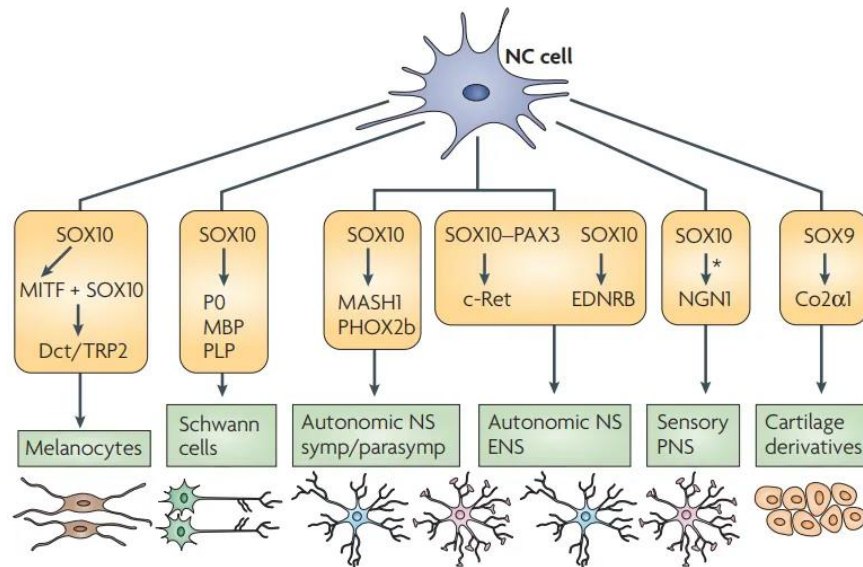


Figure 1.11 Différenciation des CCN régulée par SOX10 et SOX9

SOX10 en combinaison avec MITF induit la différenciation en mélanocytes, en régulant l'expression des gènes Dct/TRP2. SOX10 régule également la différenciation des cellules de Schwann via l'expression des gènes P0, MBP et PLP. Dans le système nerveux autonome, SOX10 active MASH1 et PHOX2b, favorisant la formation des cellules du système nerveux sympathique et parasympathique. SOX10, associé à PAX3, régule la différenciation des cellules du système nerveux entérique (ENS) via les gènes c-Ret et EDNRB. De plus, SOX10 contrôle l'expression de NGN1, facilitant la différenciation des cellules du système nerveux périphérique sensoriel (PNS). Enfin, Sox9 est essentiel pour la formation des dérivés cartilagineux. Ainsi, SOX10 et SOX9 orchestrent un large éventail de différenciations cellulaires à partir des CCN, jouant des rôles critiques dans le développement embryonnaire. Schéma extrait de (Sauka-Spengler et Bronner-Fraser, 2008)

1.6.1 Différenciation des mélanocytes

Les mélanocytes sont des cellules spécialisées présentes dans la couche basale de l'épiderme, où elles produisent et distribuent la mélanine, pigment responsable de la couleur de la peau, des cheveux et des yeux. Ils sont issus de la sous-population de CCN qui migre vers la peau et les

follicules pileux. Ces cellules commencent à exprimer des gènes spécifiques comme *MITF*, qui régule la transcription de nombreux gènes nécessaires à la production de mélanine. *MITF* est souvent décrit comme le "maître régulateur" de la différenciation des mélanocytes (Potterf *et al.*, 2000). L'expression de *MITF* est directement régulée par SOX10, soulignant l'interconnexion de ces deux facteurs. MITF contrôle l'expression de nombreux gènes impliqués dans la production de mélanine, tels que les gènes codant pour les enzymes tyrosinase, TRP-1 et TRP-2, essentielles à la biosynthèse de la mélanine. De plus, MITF régule des gènes impliqués dans la survie cellulaire, protégeant ainsi les mélanocytes contre l'apoptose. Les interactions entre SOX10 et MITF sont cruciales pour la progression des mélanocytes à travers divers stades de leur développement. SOX10 initie et maintient l'expression de MITF, tandis que MITF active les gènes spécifiques nécessaires à la fonction des mélanocytes (Potterf *et al.*, 2000). Cette coopération entre SOX10 et MITF assure une différenciation efficace et précise des mélanocytes à partir des CCN (Harris *et al.*, 2013; Hou *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2000; Miyadai *et al.*, 2023; Stanchina *et al.*, 2006). Les anomalies dans l'expression ou la fonction de l'un ou l'autre de ces facteurs peuvent conduire à des troubles de la pigmentation ou à des pathologies telles que le syndrome de Waardenburg.

En conclusion, le développement des mélanocytes est un processus finement régulé où SOX10 et MITF jouent des rôles centraux et interconnectés. SOX10 assure la survie et l'engagement des précurseurs des mélanocytes en régulant MITF, tandis que MITF dirige la différenciation terminale en contrôlant les gènes spécifiques de la mélanogenèse et de la survie cellulaire.

1.6.2 Développement du système nerveux entérique

Le SNE appartient au système nerveux autonome, responsable de la régulation de la motilité, de la sécrétion, et de l'absorption dans le tractus gastro-intestinal. Les neurones et les cellules gliales qui composent le SNE dérivent d'une sous-population de CCN qui migre le long du tube digestif en développement. Au cours de cette migration, ces cellules subissent des processus complexes de différenciation pour former les réseaux neuronaux et gliaux du SNE (Bergeron *et al.*, 2013).

SOX10 joue également un rôle central dans le développement du SNE, en particulier dans les cellules gliales entériques. SOX10 est exprimé dans les précurseurs et les cellules gliales du SNE

dès les premières étapes de leur migration depuis la crête neurale et est maintenue dans les cellules gliales dérivées des CCN. En effet, SOX10 régule directement l'expression de gènes essentiels à la survie et à la prolifération des progéniteurs, tels que *Ret* et *Ednrb*, qui facilitent la migration des précurseurs tout au long de l'intestin (Watanabe *et al.*, 2017). Au-delà de son rôle dans la migration et la survie des progéniteurs entériques, SOX10 est également essentiel pour la différenciation des cellules gliales du SNE. Il régule l'expression de gènes spécifiques nécessaires à l'engagement glial des progéniteurs. SOX10 contrôle notamment l'expression de gènes tels que *S100b*, *Mpz*, *Fabp7* et *Plp1*, impliqués dans la maturation et la fonctionnalité des cellules gliales du SNE et du SNP (Jacob *et al.*, 2014). Cette double fonction de SOX10 — à la fois dans le maintien de la multipotence des progéniteurs et dans la promotion de leur différenciation gliale — est cruciale pour le développement équilibré du SNE et du SNP. Lorsque la fonction de SOX10 est affectée, les progéniteurs entériques ne parviennent pas à migrer correctement et à maintenir leur multipotence, entraînant une défaillance dans la formation du SNE (Pingault *et al.*, 2022). En conclusion, SOX10 est un facteur multifonctionnel essentiel au développement du SNE, jouant un rôle central dans la migration, le maintien de la multipotence et la différenciation gliale des progéniteurs entériques dérivés des CCN.

1.6.3 Spécification des précurseurs des cellules de Schwann

Tout comme les mélanocytes et les progéniteurs entériques, les cellules de Schwann se forment également à partir de précurseurs dérivés de la crête neurale qui migrent le long des nerfs périphériques en développement (Jessen et Mirsky, 2019; Kameneva *et al.*, 2021; Monk *et al.*, 2015).

SOX10 est également un facteur essentiel pour le développement des cellules de Schwann (Bhattarai *et al.*, 2022). Dans les SCP, SOX10 régule l'expression de gènes spécifiques nécessaires à la spécification des cellules gliales et à la myélinisation, comme ceux codant pour les protéines de la myéline MPZ et MBP (Jacob *et al.*, 2014; Lopez-Anido *et al.*, 2015). L'absence de SOX10 conduit à des défauts sévères dans la formation des cellules de Schwann et des anomalies dans la myélinisation des nerfs périphériques (Pingault *et al.*, 2022; Schreiner *et al.*, 2007). Une étape importante dans le développement des cellules de Schwann est leur transition de la phase

immature à la phase myélinisante. Cette transition est marquée par des changements dans l'expression génique et des modifications morphologiques qui permettent aux cellules de Schwann de s'enrouler autour des axones et de former la gaine de myéline. Des facteurs extrinsèques, comme les signaux provenant des axones, ainsi que des facteurs intrinsèques, régulés par des gènes comme EGR2 (KROX20) orchestrent cette maturation en coopération avec SOX10 (Jones *et al.*, 2007). En cas de lésion nerveuse, les cellules de Schwann jouent également un rôle crucial dans la régénération nerveuse. Elles se dédifférencient et prolifèrent en réponse à la lésion, créant un environnement favorable à la repousse axonale. Elles produisent des facteurs trophiques et des molécules de la matrice extracellulaire qui facilitent la régénération des axones endommagés et la restauration de la fonction nerveuse tout en servant de source de progéniteurs pour être reprogrammées en neurones (Balakrishnan *et al.*, 2020; Fujiwara *et al.*, 2014). Ainsi, le développement des cellules de Schwann à partir des CCN et leur spécification est un processus finement régulé au cours du développement mais également après la naissance et il dépend de multiples signaux extrinsèques et de régulations transcriptionnelles dans lesquelles SOX10 joue un rôle central.

D'autre part, bien que les SCPs soient ainsi nommées car ce sont les progéniteurs directs des cellules de Schwann, ces cellules conservent un potentiel de différenciation élevé, similaire à celui des CCN. Furlan *et al.* (2018) suggèrent que les SCP peuvent être considérées comme des CCN « déguisées », en raison de leur multipotence et de leur capacité à se différencier en de multiples types cellulaires, y compris des neurones autonomes, des cellules neuroendocrines et des mélanocytes. Ces SCP se déplacent le long des fibres nerveuses et utilisent ces nerfs comme des routes pour migrer dans tout l'embryon, atteignant presque toutes les régions du corps. Dans des contextes spécifiques, les SCP peuvent se détacher des nerfs et se différencier en divers types cellulaires (Figure 1.12). Les SCP peuvent être considérés comme un état avancé de CCN qui maintiennent une capacité de différenciation active tout au long du développement, et même après la naissance (Furlan et Adameyko, 2018; Furlan *et al.*, 2017). Par exemple, les SCPs sont capables de générer des neurones entériques dans le système nerveux entérique (SNE) au cours de la neurogenèse postnatale, démontrant leur potentiel de multipotence prolongée (Espinosa-Medina *et al.*, 2017; Espinosa-Medina *et al.*, 2014). Cette capacité de générer une diversité de

types cellulaires à partir d'un précurseur commun souligne la nature flexible et multipotente des SCP.

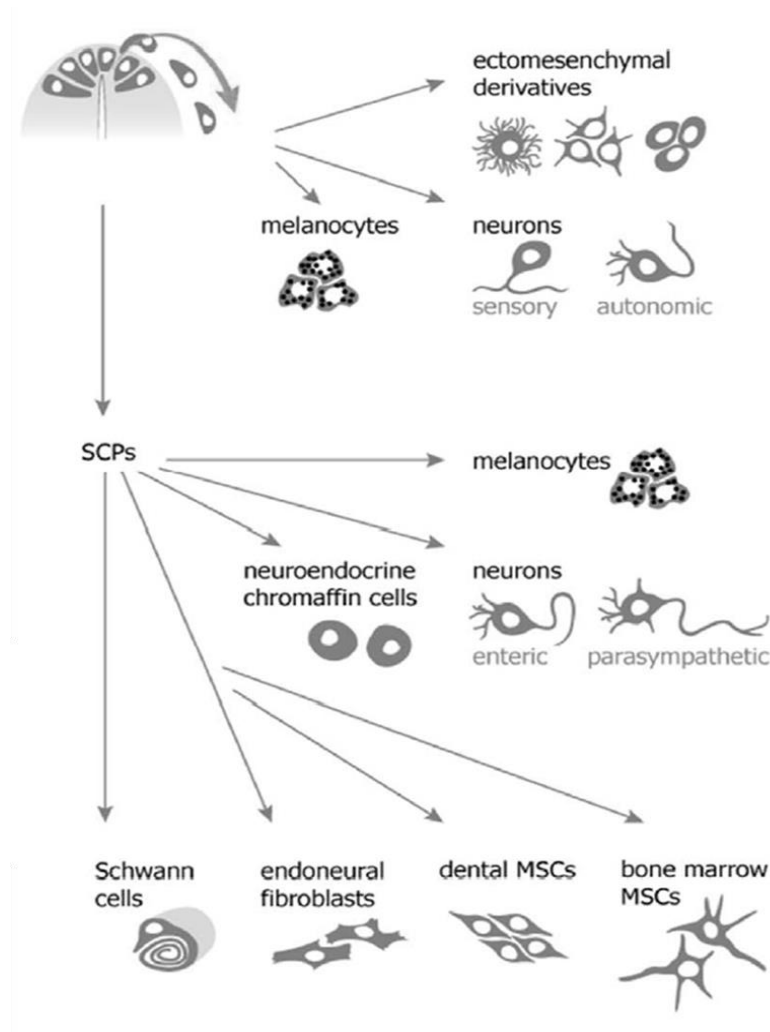


Figure 1.12 Conservation de la multipotente des cellules de la crête neurale via les cellules progénitrices des cellules de Schwann (SCP).

Cette illustration met en évidence la capacité des cellules progénitrices des cellules de Schwann (SCP) à conserver la multipotente des cellules de la crête neurale (CCN). Les CCN migrent et se différencient en divers types cellulaires, y compris les dérivés ectomésenchymateux, les mélanocytes, et les neurones sensoriels et autonomiques. De même, les SCP, dérivées des CCN, conservent une capacité multipotente et se différencient en plusieurs lignées, telles que les cellules de Schwann, les fibroblastes endoneuraux, les cellules neuroendocrines chromaffines, les cellules mésenchymateuses dentaires et celles de la moelle osseuse, ainsi que les neurones entériques et parasympathiques. Ce schéma illustre la persistance de cette multipotente dans les SCP et leur rôle clé dans la contribution aux divers tissus périphériques et mésenchymateux. Figure adapté de (Furlan et Adameyko, 2018)

En conclusion, les SCP représentent une extension de l'état multipotent des CCN, adaptant leur différenciation aux besoins spécifiques au cours du développement et même après la naissance. Cette flexibilité permet aux SCP de contribuer notamment à la génération de mélanocytes et de progéniteurs entériques au cours du développement et de conserver une plasticité développementale au-delà des stades embryonnaires.

1.7 Hypothèses et objectifs

1.7.1 Hypothèses

Le modèle murin *Spot* reproduit plusieurs des manifestations cliniques du syndrome de Waardenburg de type 4 (WS4), notamment la dépigmentation, le dysfonctionnement de l'oreille interne et le mégacôlon aganglionnaire. Ce syndrome est le plus souvent associé à des mutations dans le gène *SOX10*. Cependant, dans le modèle *Spot*, la surexpression de NR2F1 — un gène qui n'a pas été historiquement impliqué dans le développement des structures affectées par le phénotype *Spot* — est observée dans des progéniteurs entériques et des cellules de Schwann (Bergeron *et al.*, 2016; Bonnamour *et al.*, 2022). De manière surprenantes, les gènes gliaux surexprimés dans ces progéniteurs entériques (tels que *Mpz*, *Plp1*, *Fabp7*, et *S100b*) sont tous des cibles directes de *SOX10* qui ne semble pas être lui-même directement dérégulé dans les progéniteurs entériques chez *Spot* (Bergeron *et al.*, 2016; Jacob *et al.*, 2014). En revanche, l'observation d'une proximité entre les sites de liaison de *SOX10* et les motifs de liaison de NR2F1 dans les cellules de Schwann suggère une co-régulation potentielle des gènes gliaux dans le système nerveux périphérique (SNP), où NR2F1 pourrait moduler l'activité transcriptionnelle de *SOX10*, favorisant ainsi la différenciation gliale (Lopez-Anido *et al.*, 2015).

En tenant compte de ces observations, nous formulons l'hypothèse que dans les CCN, NR2F1 pourrait agir comme un facteur pro-glial en modulant l'activité de *SOX10* et en favorisant sa fonction dans la différenciation gliale des progéniteurs dérivés des CCN. Ainsi, chez les souris *Spot*, la surexpression de *Nr2f1* induirait une différenciation gliale prématurée ou aberrante des

progéniteurs dérivés des CCN en modifiant l'activité de SOX10 et en déclenchant une cascade transcriptionnelle pro-gliale.

D'autre part l'insertion transgénique chez *Spot* a été localisée sur le chromosome 13, au sein du dernier intron d'un ARN long non codant, *A830082K12Rik* (ou *nr2f1-as*), antisens du gène *Nr2f1*. Des analyses approfondies ont révélé la présence d'un élément non codant fortement conservée chez les vertébrés de 676pb, et qui démontre une forte activité répressive transcriptionnelle dans des essais cellulaires *in vitro*. Des expériences de capture de conformation de la chromatine (3C) menées sur des progéniteurs entérique dérivé des CCN ont mis en évidence que la paire de gènes *Nr2f1-A830082K12Rik* interagit normalement avec cet élément en condition normales. En revanche chez *Spot* cette interaction est perdue à cause de l'insertion du transgène (Bergeron *et al.*, 2016). Nous avons formulé l'hypothèse que, dans le modèle *Spot*, l'insertion transgénique perturbe l'interaction entre le promoteur de *Nr2f1* et cet élément répresseur conservé chez les vertébrés, ce qui entraînerait une surexpression de *Nr2f1* dans les CCN et causerait les anomalies caractéristiques du syndrome de Waardenburg de type 4 observées.

1.7.2 Objectifs

Cette thèse a pour objectif principal d'explorer le rôle de NR2F1 dans la régulation des décisions de destin cellulaire des CCN, ses mécanismes d'action, ainsi que les mécanismes responsables de la régulation de son expression dans ces cellules. En utilisant le modèle murin *Nr2f1^{Spot/Spot}*, qui présente une surexpression spécifique de NR2F1 dans les CCN, cette recherche vise à élucider comment ce facteur contribue au développement des CCN dans des conditions de régulation modifiée. Ce modèle constitue un outil unique pour mieux comprendre les processus moléculaires influencés par NR2F1 au cours du développement des CCN.

1.7.2.1 Investiguer le profil d'expression spatio-temporel de NR2F1 pendant le développement des CCN chez la souris.

Le premier objectif de cette thèse était d'analyser le profil d'expression de NR2F1 dans les CCN au cours du développement embryonnaire chez la souris. Nous avons cherché à déterminer les stades et les types cellulaires spécifiques dans lesquels NR2F1 est exprimé, en nous concentrant

particulièrement sur son rôle potentiel dans le système nerveux entérique (SNE) et le système nerveux périphérique (SNP). Pour ce faire, nous avons étudié l'expression de NR2F1 à différents stades embryonnaires clés (E9.5 à E15.5) à l'aide de techniques d'immunomarquage et de préparation tissulaire, afin de mieux comprendre son implication dans la migration et la différenciation des CCN.

1.7.2.2 Étudier la possibilité d'une interaction entre NR2F1 et SOX10

Le deuxième objectif de cette recherche était d'explorer l'hypothèse selon laquelle NR2F1 pourrait interagir fonctionnellement avec le facteur de transcription SOX10 pour moduler la différenciation des CCN, en particulier vers la lignée gliale. Cette hypothèse reposait sur des observations antérieures suggérant une proximité physique et une potentielle interaction transcriptionnelle entre ces deux facteurs dans les CCN et leurs dérivés. Afin d'évaluer cette interaction, des essais de luciférase ont été effectués pour examiner comment NR2F1 et SOX10 interagissent dans la régulation des éléments cis-régulateurs spécifiques des gènes gliaux. De plus, des analyses par RT-qPCR et des expériences de complémentation de fluorescence bimoléculaire (BiFC) ont été réalisées pour caractériser la nature et la spécificité de l'interaction entre NR2F1 et SOX10. En combinant ces approches, nous avons cherché à déterminer si et comment NR2F1 peut moduler l'activité de SOX10 et participer ainsi à la régulation de l'expression des gènes gliaux au sein des CCN.

1.7.2.3 Réaliser des analyses transcriptomiques des CCN provenant d'embryons *Nr2f1*^{Spot/Spot}

Le troisième objectif était de réaliser une analyse détaillée du transcriptome des CCN issues d'embryons de souris *Nr2f1*^{Spot/Spot} afin de comprendre les conséquences de la surexpression de *Nr2f1* sur l'expression des gènes au niveau global. Pour cela, des analyses de séquençage d'ARN en vrac et en cellule unique (scRNA-seq) ont été menées afin de capturer les altérations transcriptionnelles induites par la surexpression de *Nr2f1* dans les CCN en début de migration. Ces approches ont permis d'identifier les voies de signalisation et les réseaux de gènes affectés, ainsi que de déterminer comment la surexpression de *Nr2f1* influence les trajectoires de différenciation des CCN. En comparant les données obtenues chez les embryons mutants et les

embryons contrôles, cette étude a apporté une compréhension plus fine des mécanismes par lesquels NR2F1 module le destin des CCN et a contribué à clarifier le rôle global de ce facteur dans le développement des CCN.

1.7.2.4 Examiner la cause de la surexpression de *Nr2f1* dans les CCN *Nr2f1^{Spot/Spot}*

Le quatrième objectif était d'élucider les mécanismes sous-jacents à la surexpression de *Nr2f1* dans les CCN des embryons *Nr2f1^{Spot/Spot}*. Cette étude s'est concentrée sur l'hypothèse selon laquelle l'insertion transgénique dans le modèle *Spot* perturberait une interaction régulatrice critique entre le promoteur de *Nr2f1* et un élément répresseur particulièrement conservé chez les vertébrés. La technologie CRISPR-Cas9 a été utilisée pour supprimer cet élément régulateur afin de déterminer son rôle potentiel dans la régulation de *Nr2f1*.

CHAPITRE 2

MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1 Modèles animaux et conformité éthique

Toutes les procédures expérimentales impliquant des souris ont été approuvées par le comité d'éthique institutionnel de l'Université du Québec à Montréal conformément aux lignes directrices de recherche biomédicale du Conseil canadien de protection des animaux. Les lignées murines transgéniques utilisées dans cette étude, notamment les modèles murins *Nr2f1^{Spot/Spot}* (fond génétique FVB/N) et *Gata4p-RFP* (fond génétique FVB/N), ont été générées comme décrit précédemment (Bergeron et al., 2016; Pilon et al., 2008). Afin d'obtenir une lignée combinant ces caractéristiques, l'allèle *Nr2f1^{Spot}* a été introduit dans le fond génétique *Gata4-RFP* par croisement, conduisant ainsi à la création de la lignée *Nr2f1^{Spot/+}; Gata4-RFP^{tg/tg}*. Les souris ont été euthanasiées dans une chambre dédiée à cet effet par remplissage progressif de dioxyde de carbone (CO₂) après une anesthésie à l'isoflurane. Les embryons ont été tous datés en considérant midi du jour de détection du bouchon vaginal comme le jour embryonnaire E0,5 et ont été générés par accouplement naturel. Les embryons contrôles et homozygotes ont tous été obtenus à partir de croisement *Nr2f1^{Spot/+}; Gata4-RFP^{tg/tg}* X *Nr2f1^{Spot/+}; Gata4-RFP^{tg/tg}*.

2.2 Préparation des tissus et fixation pour les immunomarquages

2.2.1 Intestins embryonnaires entiers

Les intestins embryonnaires ont été prélevés à différents stades de développement (E10.5, E.11.5, E12.5, E15.5). Les échantillons ont été fixés dans du paraformaldéhyde (PFA) à 4 % pendant 10 minutes sur glace, puis rincés trois fois avec du tampon phosphate salin (PBS 1X). Après fixation, les tissus ont été transférés dans du PBS 1X et stockés à 4°C jusqu'à la réalisation des immunomarquages.

2.2.2 Intestins embryonnaires dissociés

Les intestins ont été dissociés en utilisant une solution de collagénase-dispase et DNase à 37°C pendant environ 10 minutes, suivie d'une nouvelle incubation de 10 minutes. Les cellules

dissociées ont ensuite été centrifugées à 200 g pendant 3 minutes et 30 secondes. La solution de dissociation a été retirée, et les cellules ont été resuspendues dans du PBS 1X stérile. Les cellules ont ensuite été transférées dans des chambres de culture en puits (Ibidi, 8-well chamber slide), préalablement recouvertes de gélatine (250 µg/mL) et incubées à 37°C pendant au moins 4 à 6 heures pour permettre l'adhésion des cellules. Après adhésion, les cellules ont été fixées avec du PFA 4 % pendant 10 minutes sur glace, puis rincées trois fois avec du PBS 1X.

2.2.3 Embryons entiers (E9.5 et E10.5)

Les embryons entiers ont été collectés aux stades E9.5 et E10.5 et immédiatement fixés dans du paraformaldéhyde (PFA) à 4 % pendant une nuit à 4°C. Après fixation, les embryons ont été déshydratés en passant successivement dans des bains de méthanol (25 %, 50 %, 75 %, puis 100 %), puis stockés dans du méthanol à 100 % à -20°C jusqu'à utilisation. Une étape de réhydratation a été effectuée avant les marquages, avec des lavages séquentiels dans du méthanol à 75 %, 50 %, 25 %, suivis de lavages dans du PBST (PBS avec 0,1 % de Tween-20).

2.3 Protocoles d'immunomarquages

2.3.1 Intestins embryonnaires entiers

Les échantillons d'intestins embryonnaires ont été bloqués pendant 1 heure à température ambiante dans une solution de blocage contenant du sérum de veau fœtal (FBS) à 10 % et du Triton X-100 à 1 % dans du PBS 1X. Après le blocage, les échantillons ont été incubés avec les anticorps primaires pendant une nuit à 4°C. Les échantillons ont ensuite été lavés trois fois dans du PBS 1X avant d'être incubés avec des anticorps secondaires conjugués à des fluorochromes (AlexaFluor 488, 594 ou 647, dilution 1:500) pendant 1 heure à température ambiante, à l'abri de la lumière. Après incubation, les échantillons ont été rincés plusieurs fois avec du PBS 1X et contre-colorés avec du DAPI (1 µg/mL) pendant 15 minutes. Les images ont été acquises à l'aide d'un microscope confocal Nikon A1.

2.3.2 Intestins embryonnaires dissociés

Après fixation, les cellules d'intestins embryonnaires dissociés ont été bloquées pendant 1 heure à température ambiante dans une solution de blocage identique à celle utilisée pour les intestins entiers. Les cellules ont ensuite été incubées avec les anticorps primaires pendant une nuit à 4°C, suivies de lavages en PBS 1X et d'une incubation avec les anticorps secondaires (AlexaFluor 488, 594 ou 647) pendant 1 heure à température ambiante. Les cellules ont été contre-colorées au DAPI avant observation au microscope confocal.

2.3.3 Embryons entiers (E9.5 et E10.5)

Les embryons entiers, fixés et réhydratés ont été bloqués pendant 24 heures dans une solution de blocage composée de FBS à 10 %, DMSO à 20 % et Triton X-100 à 1 %, à 4°C. Les anticorps primaires ont été incubés pendant 3 à 6 jours dans cette même solution à 4°C. Après plusieurs lavages avec du PBST, les embryons ont été incubés avec les anticorps secondaires pendant une nuit à température ambiante dans l'obscurité. Après un dernier lavage, les embryons ont été incubés avec du DAPI pendant 15 minutes et stockés dans du PBST à 4°C avant le montage. Compte tenu de l'épaisseur et de la fragilité des embryons entiers, un montage spécifique a été réalisé entre lamelle et lamelle, en utilisant plusieurs anneaux adhésifs comme espaceurs. Cette méthode a permis de maintenir les embryons à plat contre les lamelles, sans l'écraser, afin de pouvoir l'observer des deux faces sous microscope confocal, tout en conservant l'intégrité des structures embryonnaires.

2.4 Essais Luciférase

Les essais de luciférase ont été réalisés dans des cellules Neuro2a (ATCC, CCL-131) afin d'évaluer l'interaction transcriptionnelle entre Sox10 et Nr2f1 sur six éléments cis-régulateurs de gènes gliaux ciblés par SOX10 : le promoteur proximal de *fabp7*, l'enhancer U3/MCS4 de *Sox10*, le promoteur proximal de *Plp1*, le promoteur proximal de *S100β*, le promoteur de *Mpz*, et un amplificateur de 1,4 kb dans l'intron 1 de *Mpz*. Les cellules Neuro2a ont été cultivées dans du EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium) supplémenté avec 10 % de sérum bovin fœtal (FBS) à 37°C dans une atmosphère à 5 % de CO₂. Les cellules ont étéensemencées dans des plaques à

24 puits à une densité de $1,5 \times 10^5$ cellules par puits et transfectées le lendemain à l'aide du réactif GeneJuice (Novagen), conformément aux instructions du fabricant. Les transfections ont été réalisées en utilisant 250 ng par puits d'un plasmide rapporteur luciférase contenant le promoteur proximal de *Plp1* (1,2 kb), de *S100 β* (1,2 kb), de *Fabp7*, de *Mpz* ou l'enhancer U3/MCS4 de *Sox10* ou *Mpz* (1,4 kb). Des vecteurs d'expression pour SOX10 (pCMV-Sox10) et NR2F1 (pCMV-Nr2f1) ont également été co-transfectés à des concentrations croissantes (25, 50, 100 ng). Après 24 à 48 heures de transfection, les cellules ont été lavées avec du PBS 1X et lysées à température ambiante pendant 20 minutes sous agitation, dans un tampon de lyse contenant 10 % de NP40, 1 mM de DTT, et 1 mM de Tris-HCl pH 8. Les lysats cellulaires ont été recueillis et centrifugés à 12 000 g pendant 5 minutes pour éliminer les débris cellulaires. L'activité luciférase a été mesurée dans le noir en utilisant une solution de réaction composée de 25 mM de Glycylglycine, 15 mM de MgSO₄, 15 mM de KPO₄, 4 mM d'EGTA, 2 mM d'ATP, et 2 mM de DTT, ainsi que de la luciférine à 0,3 mg/mL. Chaque échantillon a été incubé pendant 5 secondes avec la solution d'essai dans un luminomètre avant la mesure de la luminescence. Les résultats de la luminescence ont été exprimés en fonction de l'activité basale du rapporteur en absence de vecteurs d'expression. Les expériences ont été réalisées en triplicata, et les résultats sont présentés sous forme de moyenne $\pm$ SD ($n \geq 3$). Les comparaisons statistiques ont été effectuées à l'aide d'un test ANOVA, avec un seuil de significativité fixé à $P \leq 0,05$.

2.5 Bi-FC (Bimolecular Fluorescence Complémentation)

Les interactions entre NR2F1 et SOX10 ont été étudiées par BiFC dans des cellules Neuro2a (ATCC, CCL-131). Les cellules ont été transfectées à l'aide de GeneJuice (Millipore #70967-4) selon les recommandations du fabricant. Pour chaque puits de plaques à 6 puits, un total de 1 μ g de plasmide d'ADN codant pour les protéines NR2F1 et SOX10 fusionnées à N-Venus ou C-Venus a été utilisé. 24 heures après la transfection, l'efficacité de l'interaction entre NR2F1 et SOX10 a été évaluée en mesurant l'intensité de fluorescence Venus (YFP) dans les cellules transfectées à l'aide d'un cytomètre en flux BD Accuri C6 (BD Biosciences). Les échantillons ont été analysés pour obtenir entre 30 000 et 100 000 événements cellulaires détectés par échantillon. Les cellules non transfectées ont servi de contrôle pour l'autofluorescence, qui a été soustraite lors de l'analyse

des résultats. 48 heures après la transfection, la distribution subcellulaire du signal BiFC a été visualisée dans des cellules vivantes à l'aide d'un microscope confocal Nikon A1. Les cellules ont été incubées pendant 5 minutes avec 5 µg/mL de Hoechst 33342 pour marquer les noyaux. Des essais de compétition ont été réalisés en ajoutant des quantités croissantes du vecteur d'expression de SOX10 sans fragment de Venus.

2.6 Extraction d'ARN, transcription inverse et qPCR

L'ARN total a été extrait à partir des cellules Neuro2a ou de CCN isolées par FACS à partir d'embryons à E10.5, en utilisant le kit RNeasy Plus Mini (Qiagen, #74134), selon les instructions du fabricant. Pour l'ARN issus de cellules en culture la concentration de l'ARN ont été vérifiées par spectrophotométrie (NanoDrop, Thermo Fisher Scientific). 500 ng à 2 µg d'ARN ont été rétrotranscrits en ADNc à l'aide de l'enzyme SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen, #18064014) selon le protocole du fabricant. Les échantillons d'ADNc ont été conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation. Les réactions de qPCR ont été réalisées à l'aide du kit SensiFAST SYBR Green Mix (Bioline, #BIO-98005) sur un thermocycleur LightCycler® 480 (Roche). Chaque réaction contenait 2 µL d'ADNc, 1 µL de chaque amorce (500 nM), 10 µL de SYBR Green mix, et 5 µL d'eau sans RNase, pour un volume total de 20 µL. Les conditions thermiques étaient les suivantes : 95°C pendant 2 minutes, suivis de 40 cycles à 95°C pendant 5 secondes, 60°C pendant 10 secondes, et 72°C pendant 20 secondes. L'expression relative des gènes a été normalisée avec le gène de référence *Psmb2*, et l'analyse des données a été effectuée en utilisant la méthode $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Les expériences ont été réalisées en triplicata.

2.7 Tri cellulaire (FACS)

Les CCN ont été obtenues à partir d'embryons *Gata4-RFP* E10.5 (WT) qui ont servis de contrôles et *Nr2f1^{Spot/Spot}; Gata4-RFP (Spot-RFP)* E10.5, dissociés dans de l'EMEM contenant 1,3 mg/ml de Dispase II (Life Technologies #17105-041), 0,4 mg/ml de collagénase (Sigma #C2674) et 0,1 mg/ml de DNase I (Sigma #DN25), pendant 30 minutes à 37°C avec agitation douce. La suspension cellulaire obtenue a été filtrée à travers un filtre de 70 µm (Fisherbrand) et soumise à un tri cellulaire activé par fluorescence (FACS) à l'aide d'un trieur de cellules BD FACSJazz pour récupérer

spécifiquement les CCN positive à la fluorescence RFP. Les cellules ont été maintenues sur glace pendant toutes les étapes.

2.8 Séquençage ARN

L'extraction d'ARN à partir des CCN issus d'embryons à E10.5 récupérées par tri cellulaire (FACS) ont été réalisées à l'aide du kit de purification RNeasy Plus (Qiagen) conformément au protocole du fabricant. Les bibliothèques d'ARN appauvries en ARN ribosomique ont été générées et séquencées (100 pb, lectures en paires, 50 millions de lectures) au Centre d'Innovation Génome Québec.

2.9 Séquençage ARN en cellules uniques

Pour l'analyse scRNA-seq, nous avons utilisé quatre embryons E10.5 de chaque génotype, *Nr2f1*^{Spot/Spot}; *Gata4-RFP* et *Gata4-RFP* (WT). Les embryons ont été disséqués et dissociés en suspensions de cellules uniques comme décrit précédemment. Les cellules RFP+ ont été isolées par tri cellulaire (FACS) afin de sélectionner les cellules dérivées de la crête neurale exprimant la RFP. Après le tri, les cellules isolées ont été introduites dans le système 10X Genomics Chromium, permettant la capture et l'encapsulation de cellules uniques dans des gouttelettes pour la génération de bibliothèques d'ARN unicellulaire. Nous avons capturé un total de 6 398 cellules des embryons WT et 5 995 cellules des embryons *Nr2f1*^{Spot/Spot}. La préparation des bibliothèques et le séquençage ont été réalisés en suivant les instructions du fabricant.

Les données générées ont été traitées et analysées à l'aide de l'instance communautaire Cellenics® (<https://scp.biomage.net/>), hébergée par Biomage (<https://biomage.net/>). Une première phase de contrôle de qualité rigoureux a permis d'exclure les cellules présentant des nombres de gènes anormalement élevés ou faibles, indicatifs de doublets ou de cellules mourantes. Après ce filtrage, un total de 1 090 cellules pour les échantillons témoins et 1 027 cellules pour les échantillons *Nr2f1*^{Spot/Spot} ont été retenues pour l'analyse. L'analyse de réduction de dimension a été effectuée à l'aide de la méthode UMAP (Uniform Manifold Approximation and Projection). Le regroupement des cellules a été réalisé via une approche de regroupement non supervisé de Louvain, permettant de définir 10 groupes cellulaires distincts dans chaque jeu de

données. Les populations cellulaires non pertinentes, telles que les cellules sanguines, ou présentant des signes de mort cellulaire ont été éliminées de l'analyse. Les groupes ont ensuite été annotés en fonction de leur signatures transcriptomique et des informations disponible dans la littérature scientifique afin d'identifier différentes populations cellulaires dérivés des CCN.

2.10 Édition génomique par CRISPR-Cas9

2.10.1 Conception et clonage des guides CRISPR

Des ARN guides CRISPR ont été conçus pour cibler la région d'intérêt à proximité du gène *Nr2f1*. Les brins guides ont été commandés sous forme de deux brins complémentaires et clonés dans un plasmide préexistant dans notre laboratoire exprimant l'enzyme Cas9 (plasmide px330-u6-chimeric_bb-cbh-hspCas9, Addgene, #42230). Le clonage des guides a été facilité par la présence d'un site de restriction BbsI en amont du site cible dans le plasmide.

2.10.2 Transfection dans les cellules Neuro2a et génération de cultures monoclonales

Les plasmides contenant les guides CRISPR-Cas9 ont été transfectés dans des cellules Neuro2a (N2a) en utilisant GeneJuice (Millipore #70967-4) conformément au protocole du fabricant. Un plasmide d'expression de la GFP a été co-transfecté pour permettre la sélection des cellules transfectées. Après 24 à 48 heures, les cellules GFP+ ont été triées par FACS, puis déposées individuellement dans des puits pour générer des cultures monoclonales. Ces clones ont été cultivés, et l'efficacité ainsi que la spécificité des coupures induites par CRISPR ont été vérifiées par PCR suivie de séquençage Sanger dans les clones Neuro2a^{*ΔSil*} sélectionnés à l'aide de paires d'amorces flanquant la région ciblée par les guides.

2.10.3 Génération de la lignée murine *Nr2f1*^{*ΔSil/ΔSil*}

Une fois les guides validés in vitro, une lignée murine *Nr2f1*^{*ΔSil*} a été générée par le service de micro-injection du CERMO-FC. Les guides CRISPR ont été micro-injectés dans le pronucleus d'embryons de souris FVB, qui ont ensuite été implantés dans des femelles pseudo-gestantes. Les sourceaux obtenus ont été génotypés par PCR avec des amorces spécifiques flanquant la région ciblée afin de confirmer la délétion induite par CRISPR-Cas9. Les amorces spécifiques flanquant la

région ciblée ont été conçues pour amplifier un fragment de 1550 pb couvrant le site de coupure attendu. Les produits PCR ont été purifiés à l'aide du kit QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) et soumis à un séquençage Sanger pour vérifier l'introduction correcte des mutations.

CHAPITRE 3

RÉSULTATS

3.1 Patron d'expression de NR2F1 pendant le développement du SNE et du SNP.

Les études menées précédemment sur le modèle *Spot* au sein de notre laboratoire ont montré que le facteur de transcription NR2F1 semble favoriser le destin glial de certaines cellules progénitrices dérivés de la crête neurale, incluant les progéniteurs du SNE, les précurseurs des mélanocytes et les précurseurs des cellules de Schwann dans le SNP dès stade embryonnaire E12.5 (Bergeron *et al.*, 2016; Bonnamour *et al.*, 2022). Nous avons donc voulu examiner le patron d'expression spatiotemporel de NR2F1 durant les stades précédant E12.5, au cours des premières étapes du développement du SNE et du SNP chez la souris, afin de déterminer à quel moment débute l'expression de NR2F1 dans les CCN. Nous avons également comparé les embryons contrôles et *Nr2f1^{Spot/Spot}* afin de mieux comprendre à quel moment NR2F1 pourrait influencer les trajectoires développementales et les décisions de destin cellulaire des CCN dans le modèle *Spot*.

3.1.1 Expression de NR2F1 dans le SNE en développement (E10.5 à E15.5)

Nous avons commencé par étudier l'expression de NR2F1 par immunofluorescence sur des préparations en montages entiers d'intestins embryonnaires de souris, couvrant les stades développementaux E10.5 à E15.5 (Figure 3.1). Les marqueurs utilisés incluent SOX10 pour identifier les CCN et les cellules gliales, ainsi que β -III-tubuline (Tuj) pour identifier les neurones et visualiser le réseau de ganglions formés par le SNE.

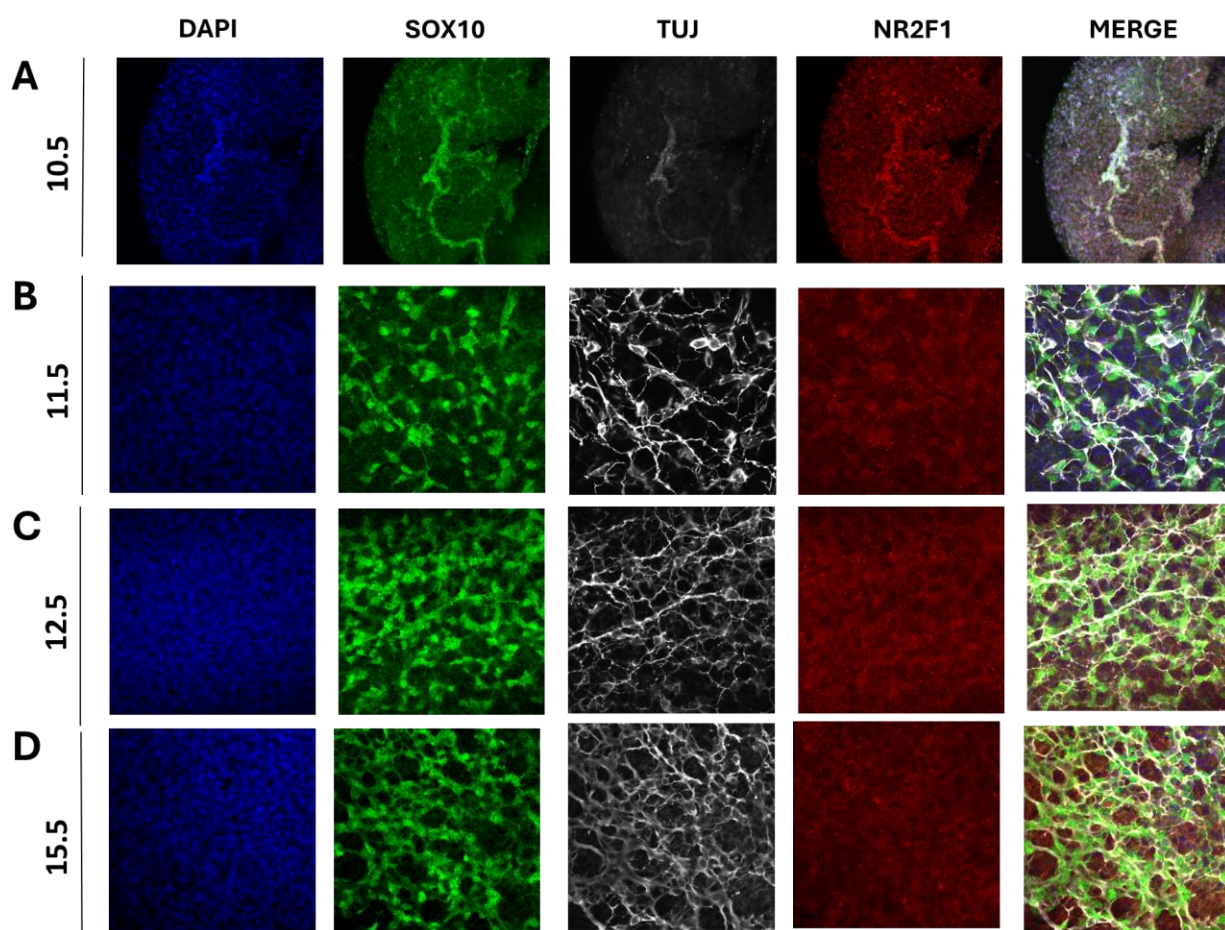


Figure 3.1 Co-marquage représentatif de SOX10, TUJ et NR2F1 sur des intestins embryonnaires de souris contrôles (WT) à différents stades de développement (E11.5, E12.5 et E15.5).

Les intestins embryonnaires de souris WT ont été marqués par immunofluorescence pour SOX10 (vert), marqueur des cellules de la crête neurale, TUJ (blanc), un marqueur des neurones, et NR2F1 (rouge). DAPI (bleu) a été utilisé pour visualiser les noyaux.

Nos analyses montrent une expression de NR2F1 relativement faible dans le SNE avec une tendance générale à la baisse au fur et à mesure de son développement. Cependant, l'expression de NR2F1 a été détectée dès le début de la formation du SNE à E10.5 (Figure 3.1 A). À E11.5, l'expression de NR2F1, bien que relativement faible, semble correspondre grossièrement au patron d'expression de SOX10 (Figure 3.1 B). À ce stade, les CCN SOX10⁺ sont en phase active de migration et de colonisation du tube digestif en développement. Les images ne permettent

toutefois pas de conclure si l'expression de NR2F1 est restreinte aux cellules SOX10⁺. À E12.5, nous observons une réduction relative de l'expression de NR2F1 dans le SNE, bien que visible, celle-ci semble plus diffuse. Le patron d'expression de NR2F1 continue de ressembler à celui de SOX10, suggérant une colocalisation continue (Figure 3.1 C). Enfin, à E15.5, qui correspond à la fin de la colonisation du tube digestif par les CCN, nous avons remarqué que l'expression de NR2F1 est significativement réduite (Figure 3.1 D). À ce stade, la majorité des CCN entériques ont achevé leur migration et ont commencé à se différencier en cellules gliales et neurones. Ces observations mettent en évidence une diminution progressive de l'expression de NR2F1 dans le SNE au cours du développement embryonnaire, corrélée à la migration et à la différenciation des CCN. Étant donné l'ambiguïté entourant les types cellulaires spécifiques exprimant NR2F1 dans le SNE en développement à partir des images de d'intestins embryonnaires entiers, nous avons poursuivi l'investigation de l'expression de NR2F1 dans le SNE de E11.5 à E15.5 en utilisant des intestins et des côlons embryonnaires dissociés en cellules uniques en utilisant le co-marquage de SOX10 et PHOX2B. Cette combinaison de marqueurs permet de distinguer les progéniteurs du système nerveux entérique (SNE) (SOX10⁺/PHOX2B⁺), les neurones entériques (PHOX2B⁺) et les cellules gliales entériques (SOX10⁺) (Figure 3.2 et Figure 3.3). De plus, PHOX2B est un marqueur nucléaire contrairement à la β -III-tubuline, ce marqueur est donc plus adapté pour le marquage de cellules individuelles.

Dans les échantillons d'intestins et de côlons dissociés, nous nous attendions à observer une expression de NR2F1 spécifique à un type cellulaire (progéniteurs, cellules gliales ou neurones). Cependant, NR2F1 n'a pas montré de profil d'expression permettant de distinguer clairement ces différents types cellulaires. Que ce soit au stade E11.5 (Figure 3.4 A) ou E13.5 (Figure 3.4 B) et quelle que soit la région du tube digestif examinée (intestin ou colon), l'expression de NR2F1 est restée faible et ubiquitaire dans toutes les cellules. Cependant à E11.5, l'expression de NR2F1 semblée plus prononcée dans les progéniteurs SOX10⁺/PHOX2B⁺ (Figure 3.3). Cette expression ubiquitaire et non spécifique dans les différentes cellules du SNE ne permet pas de tirer des conclusions précises sur le rôle de NR2F1 dans la différenciation des CCN pendant le développement du SNE. Toutefois, l'observation de l'expression de NR2F1 dans le SNE dès E10.5 suggère que celle-ci pourrait débutée avant même la migration des CCN dans le tube digestif

(Figure 3.1). Afin de mieux comprendre ce phénomène, nous avons étudié le patron d'expression de NR2F1 dans des embryons entiers à E9.5 et E10.5, pour visualiser son expression dans les CCN aux stades précédant leur migration dans le tube digestif (Figure 3.4).

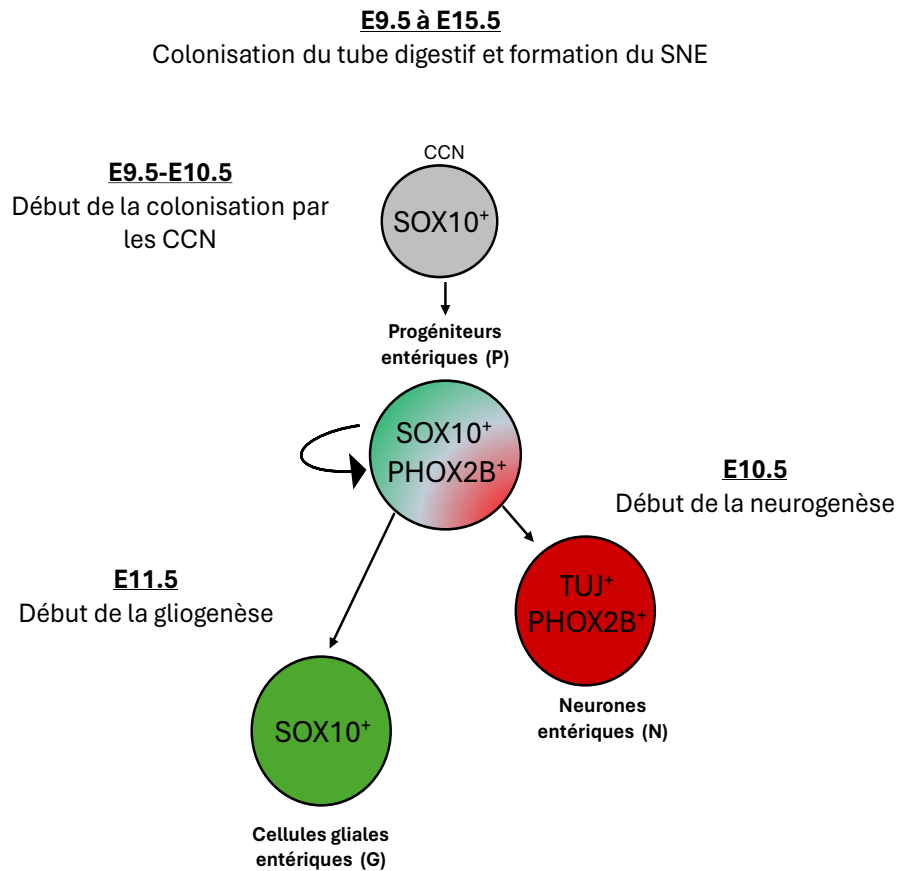


Figure 3.2 Schéma représentant l'expression de SOX10, TUJ et PHOX2B par les cellules dérivées des CCN au cours du développement du SNE.

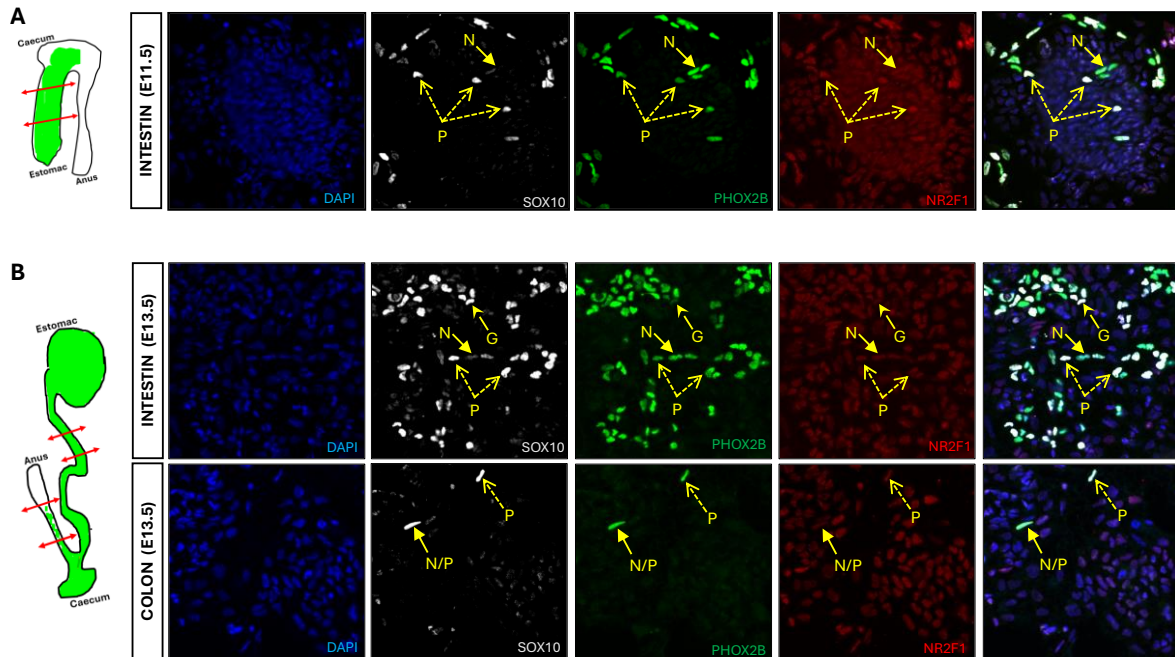


Figure 3.3 Co-marquage de SOX10, PHOX2B et NR2F1 d'intestins et de côlons embryonnaires dissociés à E11.5 et E13.5.

Sur la gauche, les diagrammes illustrent la localisation des sections d'intestin embryonnaire analysées à (A) E11.5 et (B) E13.5. Les marquages immunofluorescents montrent SOX10 (blanc), PHOX2B (vert), NR2F1 (rouge) et DAPI (bleu). Des neurones (N), gliales (G), et progéniteurs (P) sont pointées par des flèches.

3.1.2 Expression de NR2F1 dans les CCN aux stades embryonnaires E9.5 et E10.5

En nous concentrant sur la région crâniale adjacente à la vésicule otique, nous avons tracé les CCN migratoires positives pour SOX10 le long des trajets des nerfs crâniens V, VII/VIII, et IX à E9.5 et E10.5. Dans cette région, l'expression de NR2F1 a été observée dans les cellules SOX10+ (en vert), mais absente chez les progéniteurs neuronaux autonomes marqués par PHOX2B (en rouge), suggérant une co-expression exclusive de NR2F1 et SOX10 pendant la migration des CCN le long des nerfs (Figure 3.4). La Figure 3.4 B, permet une observation plus détaillée des cellules individuelles, confirmant que NR2F1 est coexprimé dans les CCN migratoires SOX10+ et que cette expression est perdue lorsque les cellules s'engagent dans la lignée neuronale autonome marquée par PHOX2B. La différence d'expression de NR2F1 entre les cellules SOX10+ par rapport aux cellules PHOX2B+ suggère un mécanisme de désactivation de NR2F1 lors de la transition des CCN vers la lignée neuronale autonome. Ainsi, la co-expression de NR2F1 et SOX10 durant les

premières étapes de migration et de spécification des CCN pourrait indiquer une co-régulation essentielle pour orienter les décisions de destinée cellulaire ultérieures.

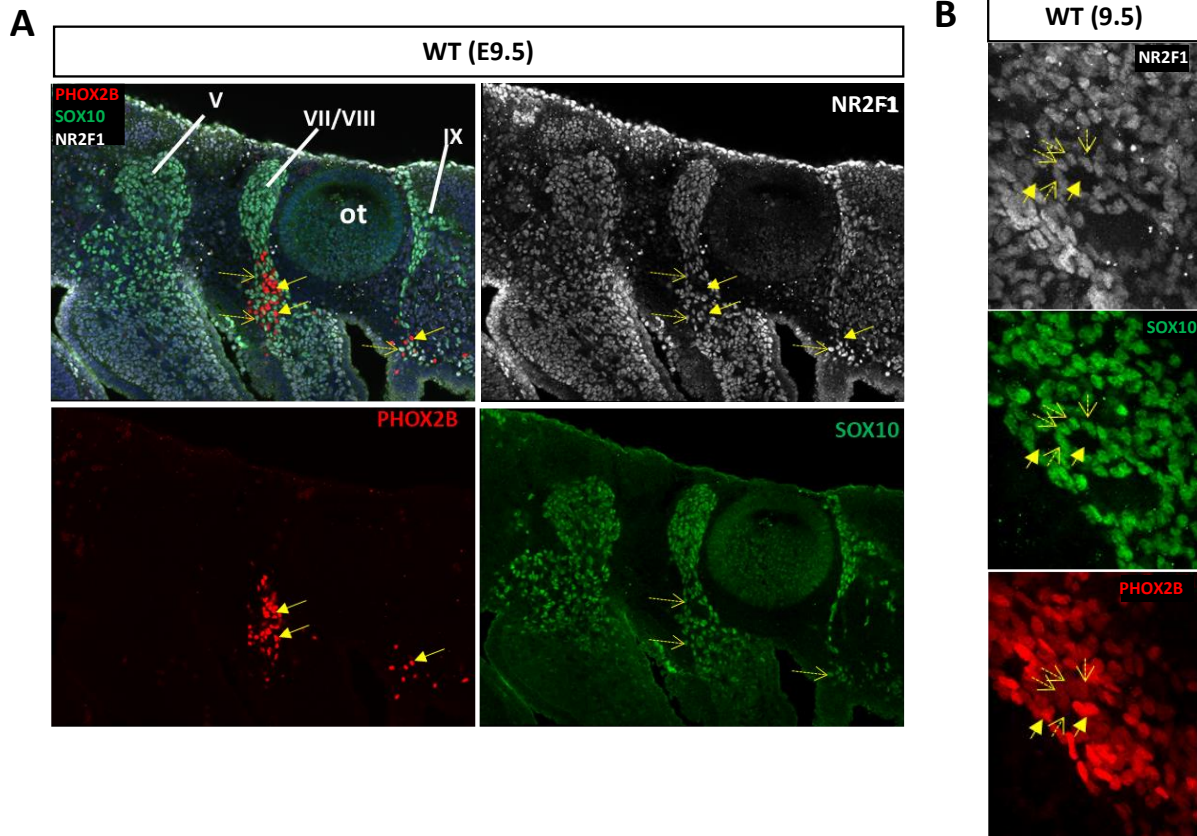


Figure 3.4 Expression de SOX10, PHOX2B et NR2F1 dans les nerfs crâniens à E10.5.

Cette figure montre des images obtenues par microscopie confocale à partir de marquages d'embryons entiers WT à E9.5, illustrant l'expression de SOX10 (vert), PHOX2B (rouge) et NR2F1 (blanc) dans la région otique (ot). Les flèches jaunes pleines indiquent les cellules SOX10+ qui coexpriment NR2F1, tandis que les flèches jaunes pointillées désignent les cellules PHOX2B+ qui n'expriment pas NR2F1.

3.1.3 Comparaison du patron d'expression de NR2F1 entre les embryons contrôles et *Nr2f1^{Spot/Spot}*

Nos précédentes études ont permis de démontrer qu'à E12.5 NR2F1 est surexprimé à la fois dans les progéniteurs du SNE et dans les SCP à chez les embryons *Nr2f1^{Spot/Spot}*. De plus, les défauts de différenciation des CCN, c'est-à-dire la différenciation gliale prématurée au sein du SNE et la différenciation anormale des SCP sont déjà observables à ce stade (Bergeron et al., 2016;

Bonnamour et al., 2022). Ces nouvelles analyses ont permis de confirmer et d'étendre ces observations. En effet, nous avons observé une forte surexpression de NR2F1 dans les CCN SOX10+ du SNE dès le stade E11.5, et cette surexpression est maintenue aux stades ultérieurs (Figure 3.5). Cela suggère que la surexpression de NR2F1 chez les souris *Nr2f1^{Spot/Spot}* débute en amont de la colonisation du tube digestif par les CCN, influençant potentiellement la différenciation et la fonction des cellules du SNE.

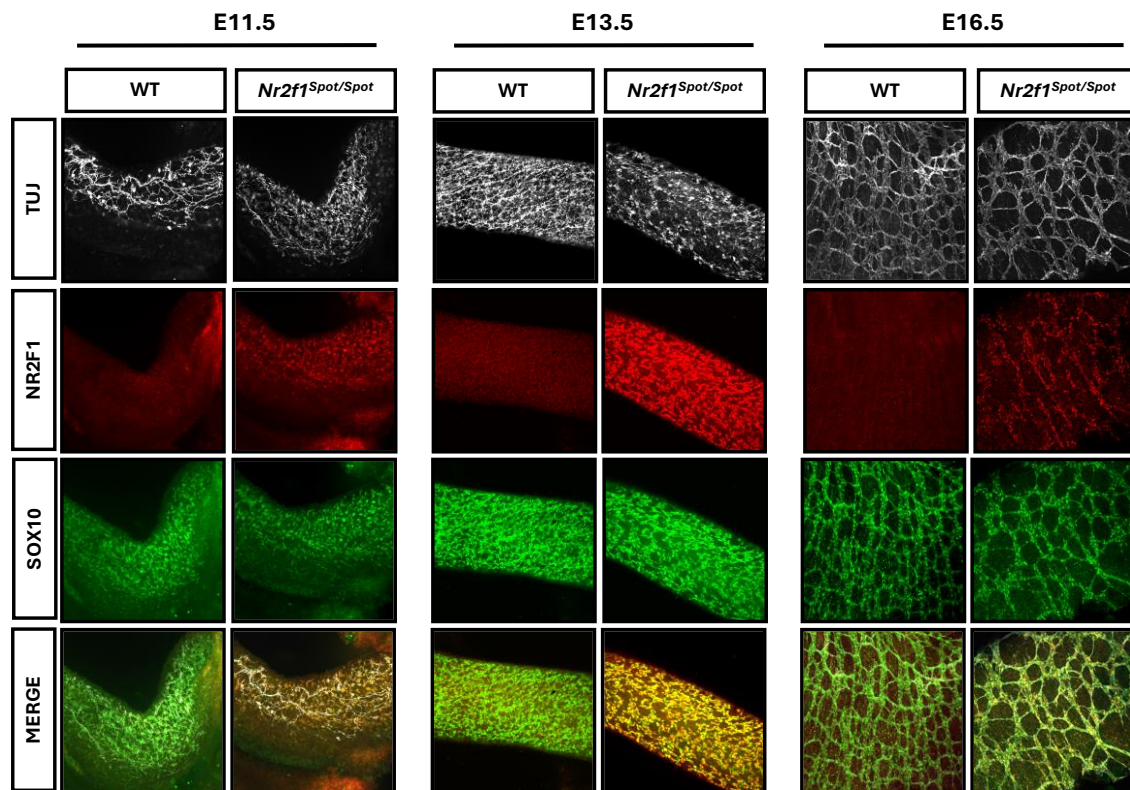


Figure 3.5 Marquage d'intestins embryonnaires entiers à E11.5, E13.5 et E16.5 permettant de comparer l'expression de NR2F1 entre les embryons WT et *Nr2f1^{Spot/Spot}* dans le SNE.

Cette figure montre des intestins embryonnaires de souris WT et *Nr2f1^{Spot/Spot}* à E11.5, E13.5 et E16.5 observés par microscopie confocale. Le marquage par immunofluorescence révèle l'expression de NR2F1 (rouge), SOX10 (vert), et TUJ (blanc). Les images permettent de visualiser la distribution et l'intensité de l'expression de NR2F1 dans les cellules gliales et neuronales du SNE.

Au vu de ces observations, nous avons également analysé le patron d'expression de NR2F1 chez les embryons *Nr2f1*^{Spot/Spot} en amont de la colonisation du tube digestif par les CCN. Nous avons comparé l'expression de NR2F1 dans des embryons contrôles et *Nr2f1*^{Spot/Spot} entiers à E9.5 et E10.5. Une surexpression claire de NR2F1 dans toutes les cellules positives pour SOX10 migrant le long des nerfs crâniens (VII/VIII & X) et périphériques est également observables à ces stades (Figure 3.6). Ces résultats démontrent que la surexpression de NR2F1 commence précocement dans les CCN des embryons *Nr2f1*^{Spot/Spot} en amont de la colonisation du tube digestif et que celle-ci semble être spécifique aux CCN exprimant SOX10. De plus, la co-expression de NR2F1 et SOX10 dans les embryons contrôles à E9.5 et E10.5 suggèrent une interaction potentielle entre ces facteurs de transcription au cours des premières bifurcation de trajectoires développementales des CCN.

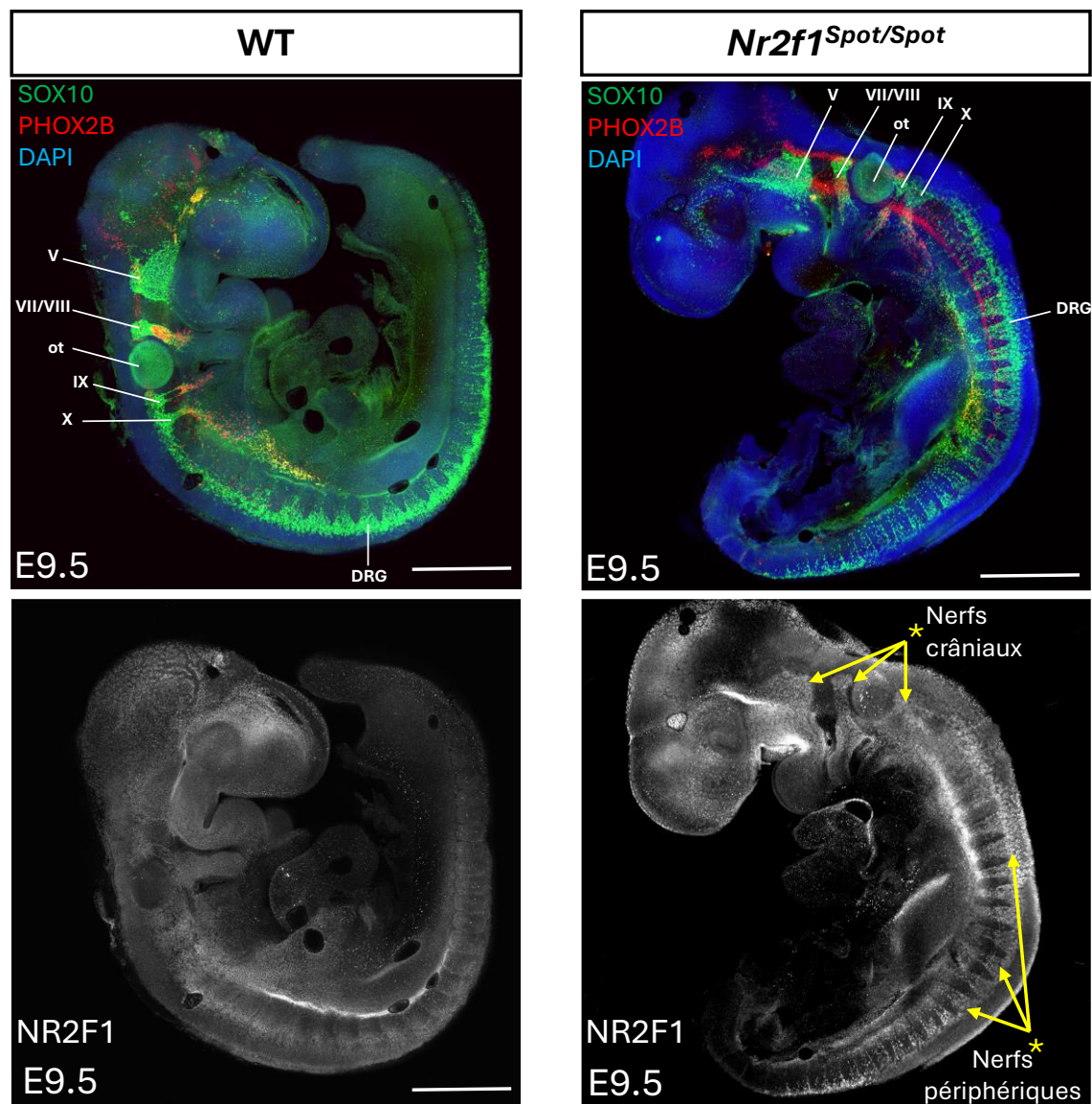


Figure 3.6 Comparaison du patron d'expression de NR2F1 entre des embryons contrôles et WT.

Cette figure présente des images d'embryons entiers WT et *Nr2f1^{Spot/Spot}* marqués pour SOX10 (vert), PHOX2B (rouge), NR2F1 (blanc), et DAPI (bleu) à E9.5. Les flèches dans les images de *Nr2f1^{Spot/Spot}* indiquent une surexpression de NR2F1 dans les ganglions crâniens (V, VII/VIII, IX, X) et les ganglions rachidiens (DRG), comparativement aux embryons WT.

3.2 Analyse de l'interaction entre NR2F1 et le facteur de transcription SOX10

En nous appuyant sur nos observations initiales de la co-expression précoce de NR2F1 et SOX10 dans les CCN en migration, nous avons élargi notre investigation pour explorer les dynamiques

fonctionnelles de ces facteurs de transcription. Nous avons spécifiquement cherché à comprendre leur collaboration fonctionnelle et leur interaction dans la régulation des éléments cis-régulateurs de gènes gliaux spécifiques, connus comme des cibles directes de SOX10. Pour ce faire, nous avons utilisé une série de méthodes expérimentales, y compris des essais de luciférase, des analyses par RT-qPCR et des expériences de BiFC (Bimolecular Fluorescence Complementation).

3.2.1 Évaluation de l'interaction transcriptionnelle entre NR2F1 et SOX10 dans la régulation des gènes gliaux par essais de luciférase.

Afin d'évaluer l'interaction transcriptionnelle entre NR2F1 et SOX10, nous avons effectué des essais de luciférase dans des cellules N2a (Figure 3.7). Ces essais ont été conçus pour examiner l'interaction entre NR2F1 et SOX10 sur six éléments cis-régulateurs de gènes gliaux ciblés par SOX10 : le promoteur proximal de *Fabp7*, l'activateur U3/MCS4 de *Sox10*, le promoteur proximal de *Plp1*, le promoteur proximal de *S100β*, le promoteur de *Mpz*, et un enhancer de 1,4 kb dans l'intron 1 de *Mpz*. Les résultats ont révélé des interactions distinctes entre NR2F1 et SOX10 sur ces différents éléments régulateurs. Pour le promoteur de *Plp1*, le promoteur de *S100β* et l'enhancer dans l'intron 1 de *Mpz*, nous avons observé une activation synergique significative en présence combinée des vecteurs d'expression de SOX10 et NR2F1, comparée à leur expression individuelle. En revanche, l'activateur U3/MCS4 de *Sox10*, le promoteur de *Fabp7* et le promoteur de *Mpz* ont montré un effet inhibiteur de NR2F1 sur l'activation médiée par SOX10. Ces résultats suggèrent que NR2F1 joue un rôle régulateur dans la modulation de l'activité transcriptionnelle des éléments cis-régulateurs des gènes gliaux ciblés par SOX10.

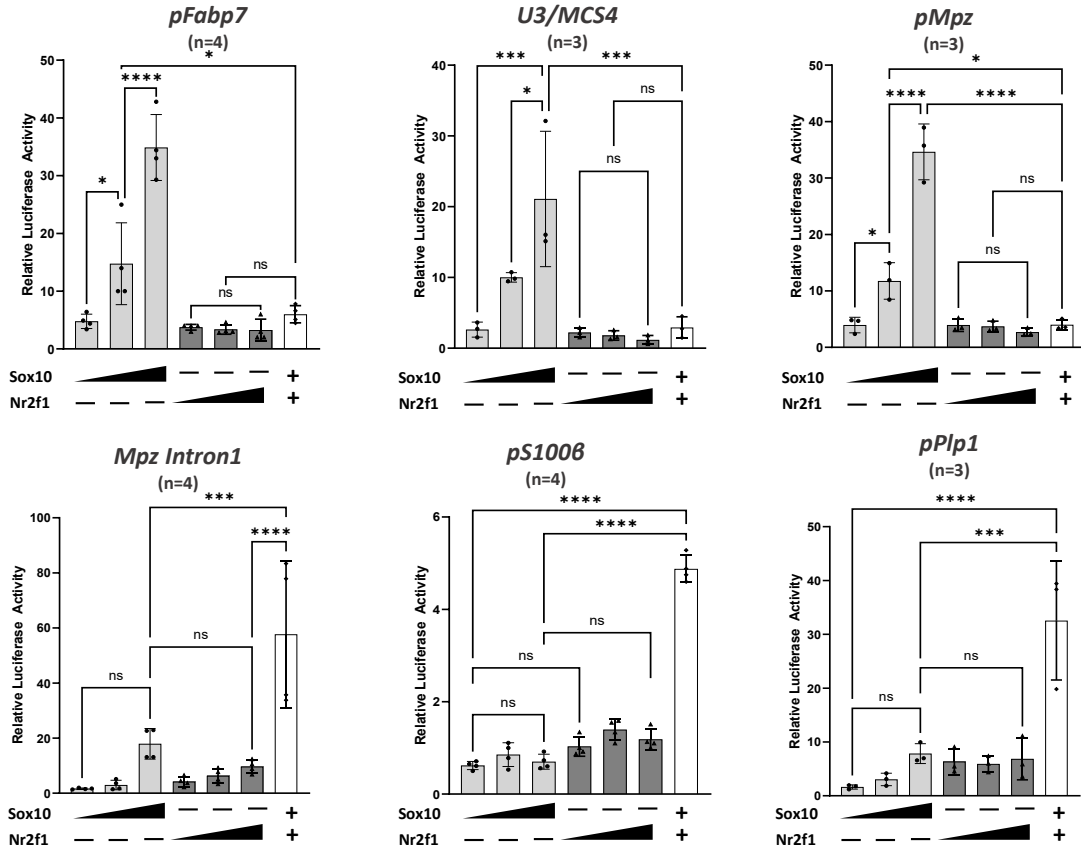


Figure 3.7. Essais luciférase dans les cellules Neuro2a pour évaluer l'interaction transcriptionnelle entre SOX10 et NR2F1 sur six éléments cis-régulateurs de gènes gliaux.

Les graphiques montrent l'activité luciférase mesurée sur six éléments cis-régulateurs ciblés par SOX10, à savoir : le promoteur proximal de *Fabp7*, l'enhancer U3/MCS4 de *Sox10*, le promoteur proximal de *Mpz*, un enhancer de 1,4 kb dans l'intron 1 de *Mpz*, le promoteur proximal de *S100B*, et celui de *Plp1*. Les cellules Neuro2a ont été co-transfectées avec des vecteurs d'expression de *Sox10* et *Nr2f1* à des concentrations croissantes (25, 50, 100 ng). L'activité luciférase est exprimée en fonction de l'activité basale du rapporteur, et les résultats sont présentés sous forme de moyenne $\pm$ SD ($n \geq 3$). Les comparaisons statistiques ont été effectuées par test ANOVA. Les niveaux de significativité statistique sont indiqués par : ns (non significatif, $P > 0,05$), * ($P \leq 0,05$), ** ($P \leq 0,01$), et *** ($P \leq 0,001$).

3.3.2 Études d'interaction par RT-qPCR

Pour compléter les essais de luciférase, nous avons réalisé des analyses par RT-qPCR pour mesurer l'expression endogène des gènes gliaux en présence de NR2F1 et SOX10. Nous avons transfecté des cellules N2a et P19 avec des vecteurs d'expression de NR2F1 et SOX10, seuls ou en

combinaison, et quantifié les niveaux d'ARNm des gènes cibles identifiés dans les essais de luciférase.

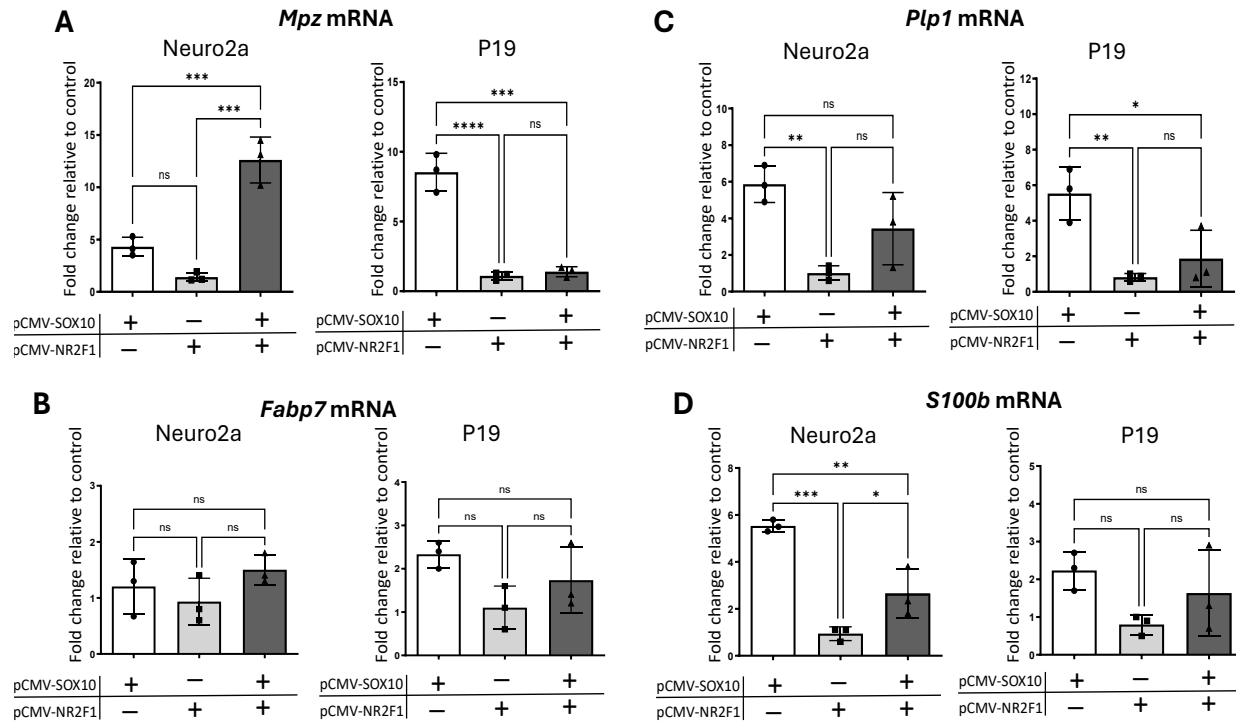


Figure 3.8 Analyse de l'expression endogène des gènes gliaux par RT-qPCR dans les cellules Neuro2a et P19 en réponse à l'expression de NR2F1, SOX10, ou leur co-expression.

Les cellules ont été transfectées avec des vecteurs d'expression pour NR2F1, SOX10, ou une co-expression des deux. L'expression est normalisée par rapport à un gène de référence (*Psmb2*) et exprimée en par rapport à des cellules transfectées avec un vecteur vide. les résultats sont présentés sous forme de moyenne $\pm$ SD ($n \geq 3$). Les comparaisons statistiques ont été effectuées par test ANOVA. Les niveaux de significativité statistique sont indiqués par : ns (non significatif, $P > 0,05$), * ($P \leq 0,05$), ** ($P \leq 0,01$), et *** ($P \leq 0,001$).

L'expression de SOX10 grâce à un vecteur d'expression a entraîné une augmentation des niveaux d'ARNm de *Fabp7*, *S100b*, *Plp1* et *Mpz*, indiquant une activation de la transcription comme anticipé. En revanche, l'expression de NR2F1 seul n'a eu aucun effet sur ces niveaux d'ARNm. Lorsque NR2F1 a été coexprimé avec SOX10, cela a induit des changements sur le niveau d'ARNm par rapport à l'expression de SOX10 seul qui sont différents en fonction de la lignée cellulaire utilisé. Notamment pour *Mpz*, le seul gène pour lequel nous avons observé une activation

synergique par SOX10 et NR2F1 dans les cellules Neuro2a mais dont l'activation par SOX10 a été inhibé par l'expression de NR2F1 dans les cellules P19 (Figure 3.8A). Ces résultats, soulignent l'importance du contexte cellulaire dans l'effet de NR2F1 et SOX10 sur l'activation des gènes gliaux. Ils indiquent également que les études *in vitro* doivent être poursuivies *in vivo* pour mieux comprendre les mécanismes de régulation transcriptionnelle de ces facteurs et leur impact sur le développement des CCN. Les éléments cis-régulateurs comme les promoteurs et les enhancers peuvent répondre différemment à la présence de NR2F1 et SOX10. Les essais de luciférase se concentrent sur l'activité transcriptionnelle de courts fragments de promoteurs ou d'amplificateurs clonés en amont du gène rapporteur luciférase. En revanche, les analyses par RT-qPCR mesurent l'expression des gènes endogènes dans un contexte génomique complet, où d'autres éléments régulateurs distants, interactions protéine-protéine et régulations épigénétiques peuvent influencer l'expression des gènes et leur réponse aux facteurs de transcriptions.

3.3.3 Études d'interaction par BiFC

Pour approfondir la caractérisation de l'interaction potentielle entre NR2F1 et SOX10, nous avons réalisé des expériences de BiFC (Bimolecular Fluorescence Complementation) dans des cellules N2a (Figure 3.9). La technique BiFC permet de visualiser des interactions directes entre protéines en reconstituant une protéine fluorescente (Venus) lorsqu'une interaction étroite se produit entre les protéines d'intérêt (Figure 3.9 A). Dans nos expériences, nous avons observé un signal fluorescent localisé dans les noyaux des cellules transfectées (Figure 3.9 B). Cette localisation nucléaire est en accord avec le rôle de NR2F1 et SOX10 en tant que facteurs de transcription, qui agissent principalement dans le noyau pour réguler l'expression des gènes. La reconstitution du signal fluorescent dans le noyau confirme que NR2F1 et SOX10 interagissent directement dans leur lieu d'action fonctionnel. De plus, pour évaluer la spécificité de cette interaction, nous avons réalisé des essais de compétition en introduisant des quantités croissantes de SOX10 non étiqueté dans les cellules transfectées (Figure 3.9 C). Nous avons observé une diminution de l'intensité du signal BiFC, ce qui suggère que les protéines SOX10 non étiquetées entrent en compétition avec SOX10 fusionné au fragment de Venus pour l'interaction avec NR2F1. Cette réduction du signal

fluorescent indique une interaction compétitive spécifique, renforçant l'idée que NR2F1 et SOX10 interagissent directement dans le noyau des cellules. Ces observations démontrent la capacité de NR2F1 et SOX10 à interagir directement dans le noyau, suggérant que ces deux facteurs de transcription forment un complexe fonctionnel pour moduler l'expression des gènes gliaux, soit par interaction directe protéine-protéine, soit par une interaction médiée par l'ADN et/ou d'autres co-facteurs.

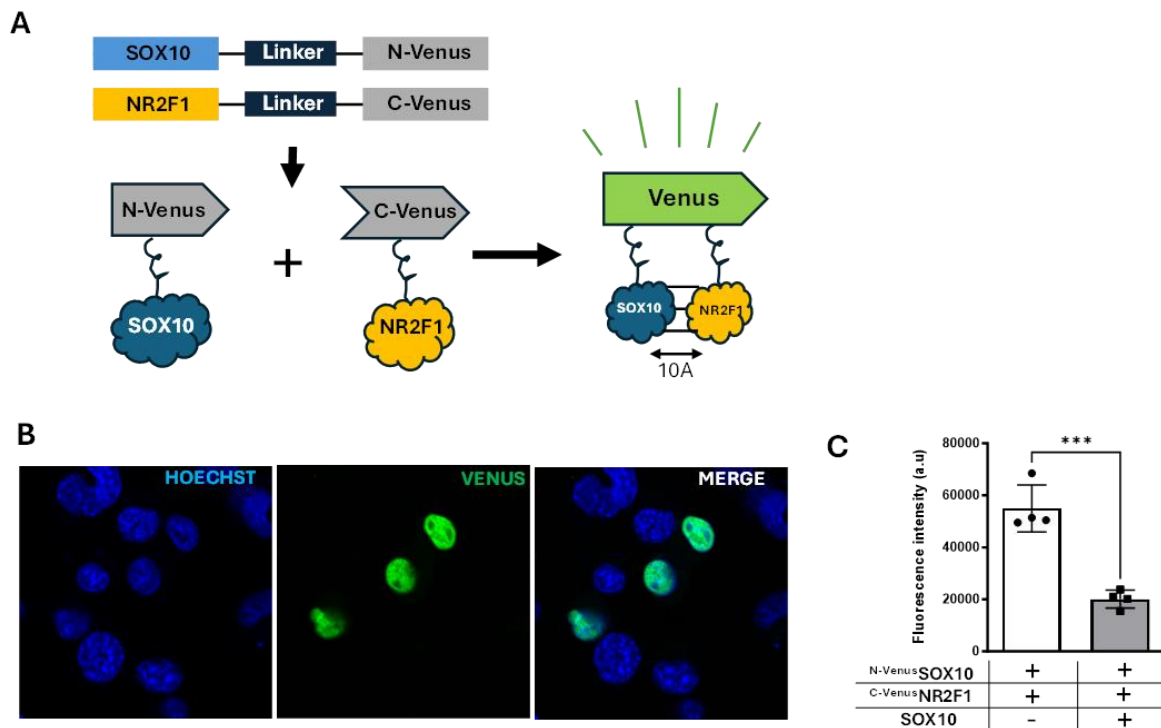


Figure 3.9 Interaction entre SOX10 et NR2F1 détectée dans les noyaux de cellules Neuro2a détectée par BiFC.

(A) SOX10 et NR2F1 ont été fusionnés respectivement avec les fragments N-terminal (N-Venus) et C-terminal (C-Venus) de la protéine fluorescente Venus. L'interaction entre SOX10 et NR2F1 permet la reconstitution de la fluorescence de Venus, visible en vert. (B) Les noyaux des cellules ont été marqués avec HOECHST (bleu). La fluorescence observée dans les cellules transfectées confirme l'interaction directe entre SOX10 et NR2F1 dans le noyau. (C) Diminution significative du signal lorsque SOX10 natif est coexprimé indiquant une compétition pour l'interaction avec NR2F1 confirmant la spécificité de celle-ci.

Ces résultats fournissent des pistes intéressantes concernant la collaboration fonctionnelle et l'interaction physique entre NR2F1 et SOX10 dans la régulation des éléments cis-régulateurs de gènes gliaux. Notre exploration des dynamiques coopératives entre NR2F1 et SOX10 s'étend de leur co-expression dans les CCN en migration précoce à leurs rôles fonctionnels dans la régulation transcriptionnelle. Les différences observées entre les résultats *in vitro* des essais de luciférase et de RT-qPCR ont mis en évidence la nécessité de poursuivre des analyses *in vivo* pour valider et approfondir nos connaissances sur le rôle de NR2F1 dans le développement des CCN et sur son interaction avec SOX10.

3.3 Comparaison du transcriptome de CCN issues d'embryons contrôles et *Nr2f1*^{Spot/Spot}

Afin d'approfondir ces observations, nous avons transféré l'allèle *Nr2f1*^{Spot} sur un fond génétique transgénique *Gata4p-RFP* qui permet de marquer la majorité des CCN migratoires dans les embryons à E10.5 afin d'investiguer l'impact transcriptionnel de la surexpression de NR2F1 sur les CCN en migration (Belanger *et al.*, 2018; Pilon *et al.*, 2008). Cette approche nous a permis de collecter des CCN contrôles (WT) et *Nr2f1*^{Spot/Spot} afin d'explorer l'impact de la surexpression NR2F1 sur le transcriptome des CCN à E10.5

3.3.1 Isolation des CCN à partir des embryons entiers

Pour comparer les CCN des embryons *Nr2f1*^{Spot/Spot} et des embryons contrôles, nous avons d'abord isolé les CCN à partir d'embryons entiers grâce à un tri cellulaire par cytométrie en flux. Les embryons *Gata4p-RFP* (WT) ou *Gata4p-RFP;Nr2f1*^{Spot/Spot} ont disséqués à E10.5 et les cellules positive à la RFP ont été triées (Figure 1.1). Nous avons tout d'abord optimisé les paramètres de tri afin de collecter exclusivement des cellules RFP+. La viabilité des cellules après tri a été confirmée par coloration au bleu Trypan, et la positivité à la RFP a été validée, avec un contrôle négatif montrant moins de 0,2 % de cellules RFP+. Pour chaque échantillon, il a été nécessaire de trier plusieurs embryons (3 à 5) pour obtenir une quantité suffisante de cellules RFP+ (environ 7 500 cellules par embryon). La surexpression de *Nr2f1* dans les cellules RFP+ triées à partir des embryons mutants a été confirmée par RT-qPCR, montrant une augmentation significative de l'expression de *Nr2f1* dans les CCN des embryons *Gata4p-RFP;Nr2f1*^{Spot/Spot} par rapport aux

embryons *Gata4p-RFP* (Figure 3.10D). Ces optimisations ont permis de garantir la collecte de CCN viables et de confirmer la surexpression de *Nr2f1* dans les cellules triées, assurant ainsi la fiabilité des échantillons pour les analyses ultérieures.

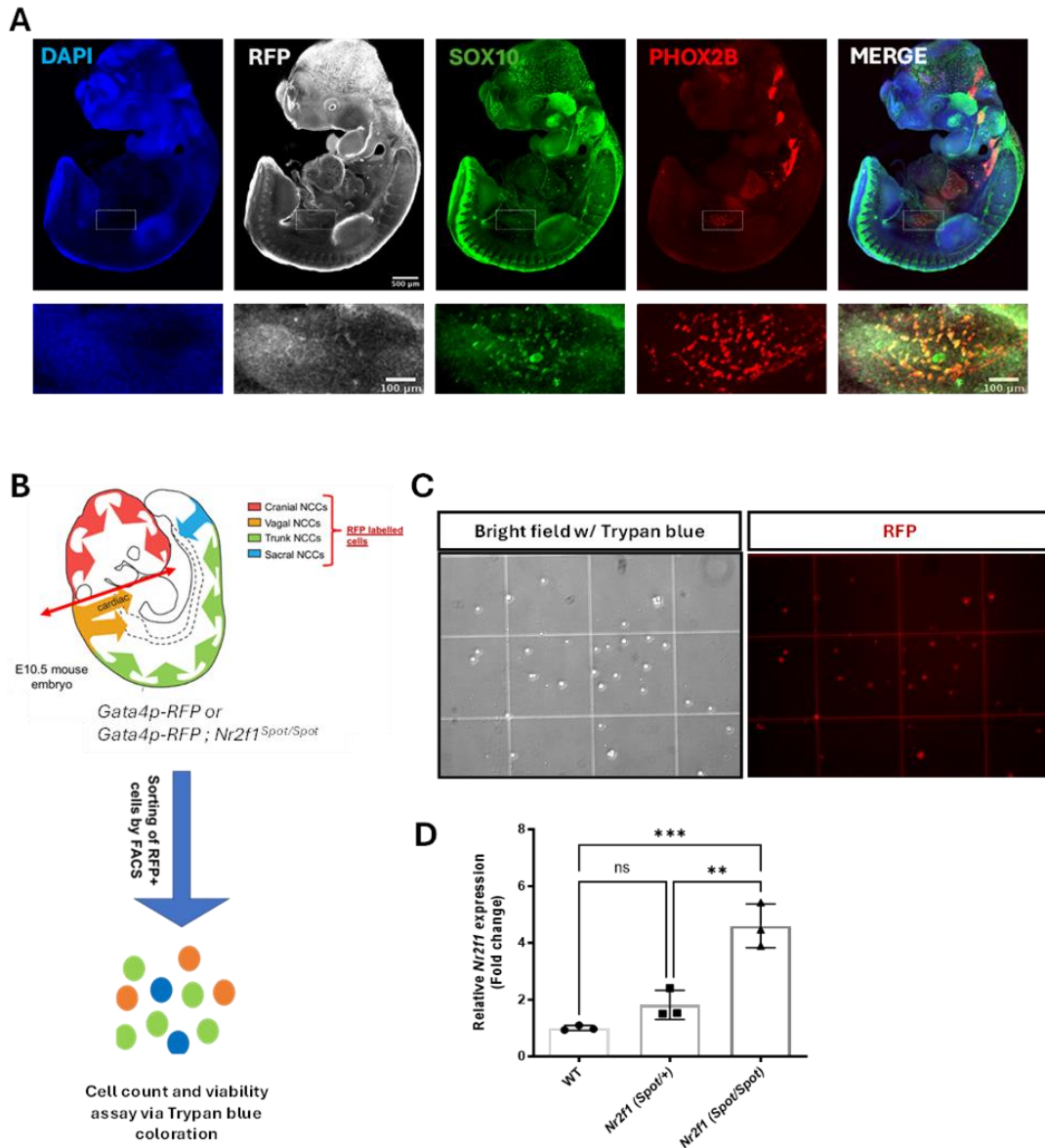


Figure 3.10 Isolation des CCN à partir d'embryons entiers *Gata4p-RFP* (WT) ou *Gata4p-RFP; Nr2f1^{Spot/Spot}*

(A) Marquage d'embryons entiers à E10.5 pour SOX10 (vert), PHOX2B (rouge), et RFP (blanc), illustrant l'expression de RFP dans les CCN. Les images montrent la localisation des cellules RFP+ dans les différentes régions des embryons, notamment les ganglions crâniens et le SNE. (B) Schéma illustrant la méthodologie d'isolation des CCN marquées par RFP (C) Observation des cellules triées sous lumière visible avec coloration au bleu de trypan, et fluorescence RFP, confirmant l'intégrité des cellules et leur expression de RFP. (D) Confirmation de la surexpression de *Nr2f1* dans les cellules mutantes isolées par RT-qPCR, démontrant une augmentation significative par rapport aux cellules WT, comme illustré par le graphique des résultats de qPCR.

3.3.2 Résultats du séquençage d'ARN en vrac

À la lumière de nos observations précédentes concernant les CCN dans le modèle Spot à partir de E12.5 (Bergeron et al., 2016; Bonnamour et al., 2022), et de nos nouveaux résultats montrant la surexpression de NR2F1 dans les cellules SOX10+ dès E10.5, nous avons entrepris des analyses transcriptomiques pour examiner les impacts immédiats de cette surexpression et explorer les changements développementaux potentiels dans les CCN à E10.5. Ce stade est critique pour la divergence des trajectoires de développement des CCN entre les régions antérieure et postérieure, ainsi que pour l'émergence des SCP dérivés des CCN du tronc (Figure 1.4) (Erickson *et al.*, 2023; Pilon, Nicolas, 2021). Les résultats de l'expérience de séquençage d'ARN en vrac ont révélé une dérégulation de 528 gènes, dont l'analyse a mis en évidence des groupes de gènes clés, permettant de tirer des conclusions intéressantes sur les mécanismes sous-jacents (Figure 3.11 et Figure 3.20).

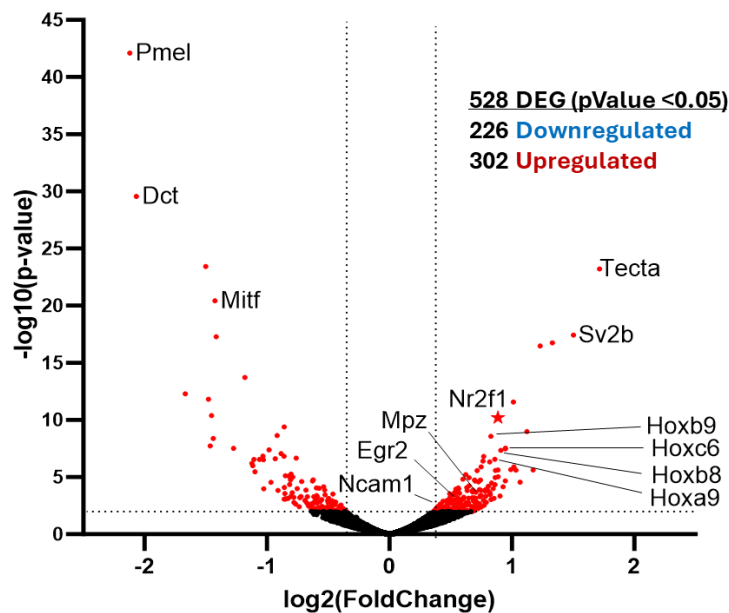


Figure 3.11 Volcano plot des gènes différentiellement exprimés (DEG) issus de l'analyse RNA-seq comparant les CCN issues d'embryons WT et *Nr2f1*^{Spot/Spot}.

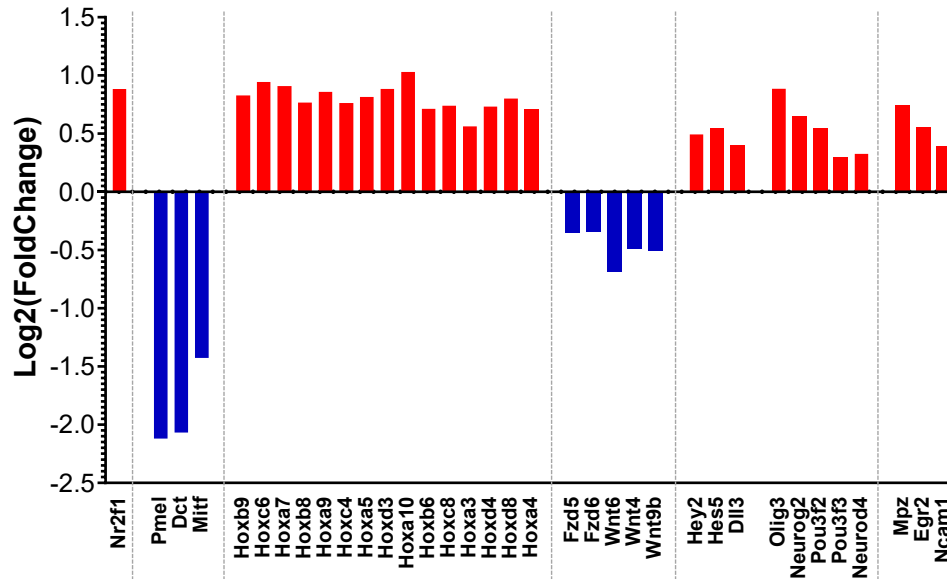


Figure 3.12 Comparaisons de l'expression de plusieurs groupes de gènes significativement dérégulés dans les CCN d'embryons *Nr2f1^{Spot/Spot}*

Ce graphique montre les variations d'expression des gènes dans les CCN *Nr2f1^{Spot/Spot}* par rapport aux cellules WT, incluant les gènes impliqués dans divers processus biologiques. Les gènes représentés incluent *Nr2f1*, les gènes caractéristiques des mélanocytes, les gènes Hox, les gènes des voies WNT et Notch, les gènes du développement du système nerveux et les gènes gliaux qui sont significativement dérégulés (PValue<0.5). Les barres rouges représentent les gènes régulés à la hausse, tandis que les barres bleues indiquent les gènes régulés à la baisse. Les données sont issues de l'analyse RNA-seq et révèlent les dérégulations transcriptionnelles significatives dans ces catégories de gènes en réponse à la mutation *Nr2f1^{Spot/Spot}*.

Nos analyses ont premièrement révélé une réduction significative de l'expression des gènes impliqués dans le développement des mélanocytes, tels que *Pmel*, *Dct* et *Mitf*, dans les CCN des embryons *Nr2f1^{Spot/Spot}* par rapport aux contrôles. Cette diminution d'expression est cohérente avec les défauts de pigmentation observé chez *Spot* et suggère un rôle potentiel de NR2F1 comme régulateur négatif de la différenciation des mélanocytes.

À l'inverse, nos données ont révélé une régulation à la hausse d'un large groupe de gènes Hox, reconnus comme des régulateurs essentiels dans le « *patterning* » des axes embryonnaires et la spécification des identités régionales. Les gènes *Hox* jouent un rôle crucial dans l'organisation

spatiale des structures au cours du développement, notamment en contrôlant la segmentation et la différenciation cellulaire le long de l'axe antéro-postérieur. Leur expression coordonnée détermine le destin des cellules dans des territoires spécifiques, assurant ainsi une régionalisation correcte (Erickson *et al.*, 2023). Les gènes *Hox* positivement régulés incluent *Hoxb9*, *Hoxc6*, *Hoxa7*, *Hoxb8*, *Hoxa9*, *Hoxc4*, *Hoxa5*, *Hoxa6*, *Hoxb6*, *Hoxd3*, *Hoxa10* et *Hoxc8*. Cette régulation positive suggère que NR2F1 pourrait avoir un rôle dans l'établissement de l'identité positionnelle des CCN le long de l'axe antéro-postérieur, un facteur déterminant majeur du destin cellulaire des CCN.

Parmi les marqueurs gliaux dérégulés, seuls les gènes *Mpz*, *Ncam1* et *Egr2* ont montré une augmentation d'expression significative. Cette observation est particulièrement intrigante, car nos résultats d'essais luciférase suggèrent également une régulation positive des gènes *Plp1*, *S100b* et *Fabp7*. L'effet relativement modeste sur les gènes gliaux observé dans nos résultats de séquençage d'ARN en vrac pourrait être dû au stade de développement choisi pour l'analyse. À E10.5, la gliogenèse commence à peine pour la majorité des CCN, et les précurseurs des cellules de Schwann (SCP) émergent. Il est donc possible que ce stade soit encore trop précoce pour détecter des changements plus marqués dans l'expression des gènes gliaux, d'autant plus que l'hétérogénéité des populations de CCN à ce stade peut compliquer l'interprétation. La divergence entre nos résultats d'essais de luciférase et ceux du séquençage d'ARN en vrac pourrait également résulter de cette hétérogénéité, qui pourrait masquer ou diluer les changements d'expression dans certaines sous-populations spécifiques. Afin de mieux comprendre ces différences et d'obtenir une vue plus détaillée de la composition cellulaire de nos échantillons de CCN, nous avons donc mené une analyse de séquençage d'ARN en cellule unique (scRNA-seq), qui sera présentée dans la section suivante.

De plus, en examinant les gènes dérégulés impliqués dans le développement des CCN, nous avons observé que de nombreux gènes sont situés en aval de *Sox10* dans le GRN contrôlant le développement des CCN (Figure 3.15). Ces résultats indiquent que NR2F1 pourrait moduler l'expression de gènes en aval de SOX10, affectant ainsi divers processus de différenciation et de développement des CCN qui dépendent de l'activité transcriptionnelle de SOX10. Cette

découverte renforce notre hypothèse selon laquelle l'interaction entre SOX10 et NR2F1 joue un rôle important dans la modulation du destin cellulaire des CCN.

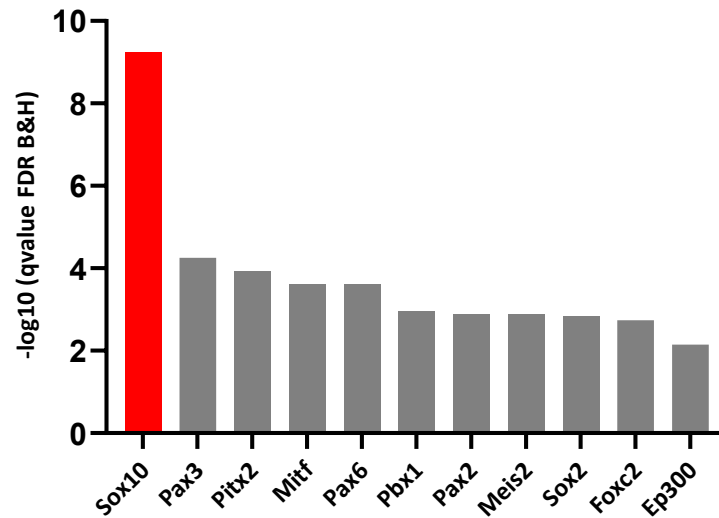


Figure 3.13 Analyse des gènes différentiellement exprimés à l'aide de l'outil TRRUST (*Transcriptional Regulatory Relationships Unraveled by Sentence-based Text mining*).

L'analyse des gènes différentiellement exprimés a été approfondie à l'aide de TRRUST (Transcriptional Regulatory Relationships Unraveled by Sentence-based Text mining), un outil informatique qui identifie les régulateurs transcriptionnels potentiels à partir de publications scientifiques. TRRUST utilise des algorithmes de « *text mining* » pour extraire des informations sur les relations régulatrices entre les facteurs de transcription et leurs cibles, fournissant ainsi un réseau de régulation transcriptionnelle. Dans notre analyse, SOX10 est apparu comme le régulateur le plus significativement relié aux gènes différentiellement exprimés, ce qui suggère qu'il pourrait jouer un rôle central dans les altérations transcriptomiques observées dans les CCN des embryons *Nr2f1^{Spot/Spot}* conformément à notre hypothèse (Figure 3.13 et Tableau 3-1).

Tableau 3-1 Résultats détaillés de l'analyse des gènes différentiellement exprimés par TRRUST.

Key TF	Description	# of genes	P value	Q value	List of overlapped genes
SOX10	SRY (sex determining region Y)-box 10	8	7.21E-12	5.91E-10	<i>Egr2,Mitf,Ret,Aatk,Hes5,Mpz,Dct,Tyr</i>
PAX3	paired box 3	6	1.39E-06	5.68E-05	<i>Dct,Dmrt2,Myod1,Mitf,Neurog2,Pou3f2</i>

PITX2	paired-like homeodomain transcription factor 2	6	4.51E-06	0.000123	<i>Gata4,Tbx15,Tbx5,Tbx1,Gad1,Myod1</i>
MITF	microphthalmia-associated transcription factor	6	1.18E-05	0.000243	<i>Gpr143,Tyr,Dct,Trpm1,Slc45a2,Pmel</i>
PAX6	paired box 6	7	1.50E-05	0.000245	<i>Vsx2,Neurog2,Cryab,Six3,Shh,Gcg,Hoxd4</i>
PBX1	pre B cell leukemia homeobox 1	4	7.96E-05	0.00109	<i>Cdh1,Dcc,Pf4,Hoxb1</i>
PAX2	paired box 2	4	0.00011	0.00129	<i>Ret,Robo3,Gcg,Neurog2</i>
MEIS2	Meis homeobox 2	3	0.00013	0.00133	<i>Cdh1,Krt19,Egr2</i>
SOX2	SRY (sex determining region Y)-box 2	5	0.000164	0.0015	<i>Six3,Egfr,Shh,Nkx2-1,Atoh1</i>
FOXC2	forkhead box C2	3	0.000224	0.00184	<i>Gja4,Tbx1,Hey2</i>
EP300	E1A binding protein p300	6	0.000945	0.00705	<i>Myod1,Wnt4,Flt4,Cryab,Mt1,Gata4</i>

L'analyse de l'enrichissement fonctionnel (GO) des gènes les plus significativement dérégulés a révélé une implication dans des processus liés à la liaison de facteurs de transcription et la régulation de la transcription, à la régionalisation embryonnaire et « la spécification de patrons » (catégorie faisant référence aux processus biologiques qui déterminent l'organisation spatiale des tissus et des cellules au cours du développement) ainsi qu'au développement du système nerveux et squelettique (Tableau 3-2 et Figure 3.14). Ces résultats mettent en lumière la complexité et la polyvalence de la régulation transcriptionnelle orchestrée par NR2F1 dans le destin cellulaire des CCN.

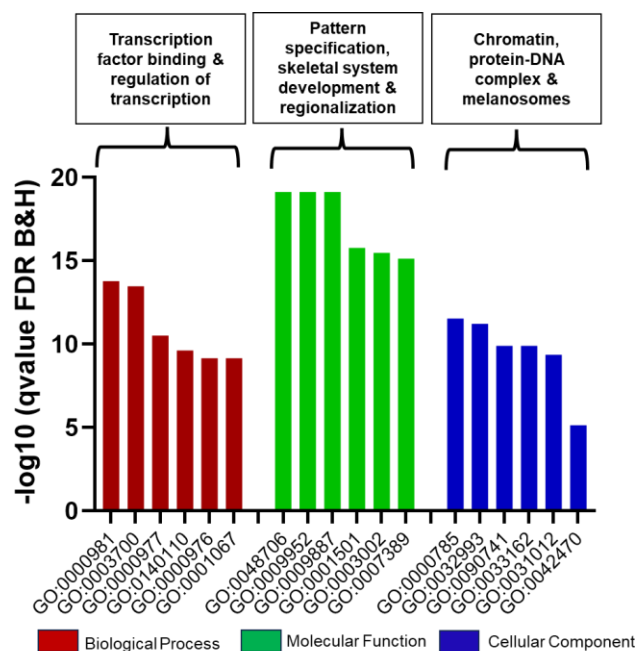


Figure 3.14. Analyse GO des gènes significativement dérégulés dans les CCN des embryons *Nr2f1^{Spot/Spot}*.

Ce graphique présente un résumé des résultats de l'analyse de « Gene Ontology (GO) » des gènes différentiellement exprimés. Les barres illustrent les principales catégories fonctionnelles enrichies parmi les gènes significativement dérégulés dans les CCN des embryons *Nr2f1^{Spot/Spot}*, classées en trois grandes catégories : (1) Liaison des facteurs de transcription et régulation de la transcription (rouge), (2) Spécification des motifs, développement du système squelettique et régionalisation (vert), et (3) Chromatine, complexes protéine-ADN et mélanosomes (bleu). Ces catégories sont détaillées dans le Tableau 3-2.

Tableau 3-2 Résultats détaillés de l'analyse GO des gènes significativement dérégulés dans les CCN des embryons *Nr2f1^{Spot/Spot}*.

ID	Name	q-value Bonferroni	q-value FDR B&H	q-value FDR B&Y	Hit Count
MM15926	WP_NEURAL_CREST_DIFFERENTIATION	1.54E-34	3.86E-32	3.86E-32	16
GO:0140110	transcription regulator activity	1.18E-07	2.95E-08	1.42E-07	12
GO:0007423	sensory organ development	6.44E-09	6.44E-09	4.94E-08	12
GO:0000981	DNA-binding transcription factor activity, RNA polymerase II-specific	3.78E-08	2.95E-08	1.42E-07	11
GO:0003700	DNA-binding transcription factor activity	6.35E-08	2.95E-08	1.42E-07	11

GO:0000977	RNA polymerase II transcription regulatory region sequence-specific DNA binding	1.05E-07	2.95E-08	1.42E-07	11
GO:0000976	transcription cis-regulatory region binding	2.37E-07	4.10E-08	1.98E-07	11
GO:0001067	transcription regulatory region nucleic acid binding	2.46E-07	4.10E-08	1.98E-07	11
GO:0009887	animal organ morphogenesis	2.13E-04	1.12E-05	8.61E-05	10
GO:0000785	chromatin	1.90E-06	1.54E-06	7.19E-06	10
GO:0032993	protein-DNA complex	3.07E-06	1.54E-06	7.19E-06	10
GO:0001501	skeletal system development	6.40E-06	1.60E-06	1.23E-05	9
GO:0007389	pattern specification process	1.17E-05	1.74E-06	1.33E-05	9
GO:0000987	cis-regulatory region sequence-specific DNA binding	2.79E-07	1.92E-05	1.92E-06	9
GO:0003002	regionalization	1.78E-04	9.86E-06	7.57E-05	8
GO:0045165	cell fate commitment	4.26E-10	5.14E-07	1.71E-07	8
GO:0009952	anterior/posterior pattern specification	1.21E-05	1.74E-06	1.33E-05	7
GO:0048839	inner ear development	9.00E-09	1.09E-05	1.74E-06	7
GO:0051960	regulation of nervous system development	5.21E-07	6.29E-04	2.86E-05	7
GO:0061351	neural precursor cell proliferation	3.52E-08	4.25E-05	3.55E-06	6

Plusieurs gènes spécifiquement impliqués dans le développement des CCN sont dérégulés dans les CCN des embryons *Nr2f1^{Spot/Spot}*. Notamment, plusieurs gènes impliqués dans la voie Wnt/ β -caténine, voie de signalisation cruciale pour le développement des mélanocytes à partir des CCN, sont régulés à la baisse tels que *Fzd5*, *Fzd6*, *Wnt4*, *Wnt6* et *Wnt9b*. À l'inverse certains gènes de la voie Notch, tels que *Hey2*, *Hes5* et *Dll3* (et *Dll1* de manière non significative), montrent une régulation positive, suggérant une activation accrue de cette voie dans les CCN *Nr2f1^{Spot/Spot}*. *Pax7*, un gène qui joue de multiples rôles au cours du développement des CCN allant de leur spécification à leur différenciation est également régulé à la hausse.

Enfin, de nombreux autres gènes associés au développement neuronal, comme *Neurog2*, *Neurod4*, *Olig3*, *Pou3f2*, *Pou3f3* et *Pou3f4*, sont significativement régulés à la hausse, suggérant que l'influence de NR2F1 dépasse largement la lignée gliale et affecte le destin cellulaire des CCN de manière plus complexe. Cela pourrait expliquer la mortalité périnatale de la majorité des embryons *Nr2f1^{Spot/Spot}* et les défauts de formation du système nerveux périphériques observés dans certains embryons *Spot* (Bergeron *et al.*, 2016). Par ailleurs, l'analyse transcriptomique a révélé une régulation positive des gènes *Sv2b* et *Tecta* dans les CCN *Nr2f1^{Spot/Spot}*. SV2B est impliqué dans le développement des odontoblastes, qui sont dérivés des CCN, tandis que TECTA joue un rôle dans la formation de l'oreille interne, défectueuse chez *Spot*.

Dans l'ensemble ces résultats indiquent que NR2F1 semble être un régulateur clé du destin cellulaire des CCN et que son rôle n'est pas restreint à la différenciation gliale ni à son interaction avec SOX10.

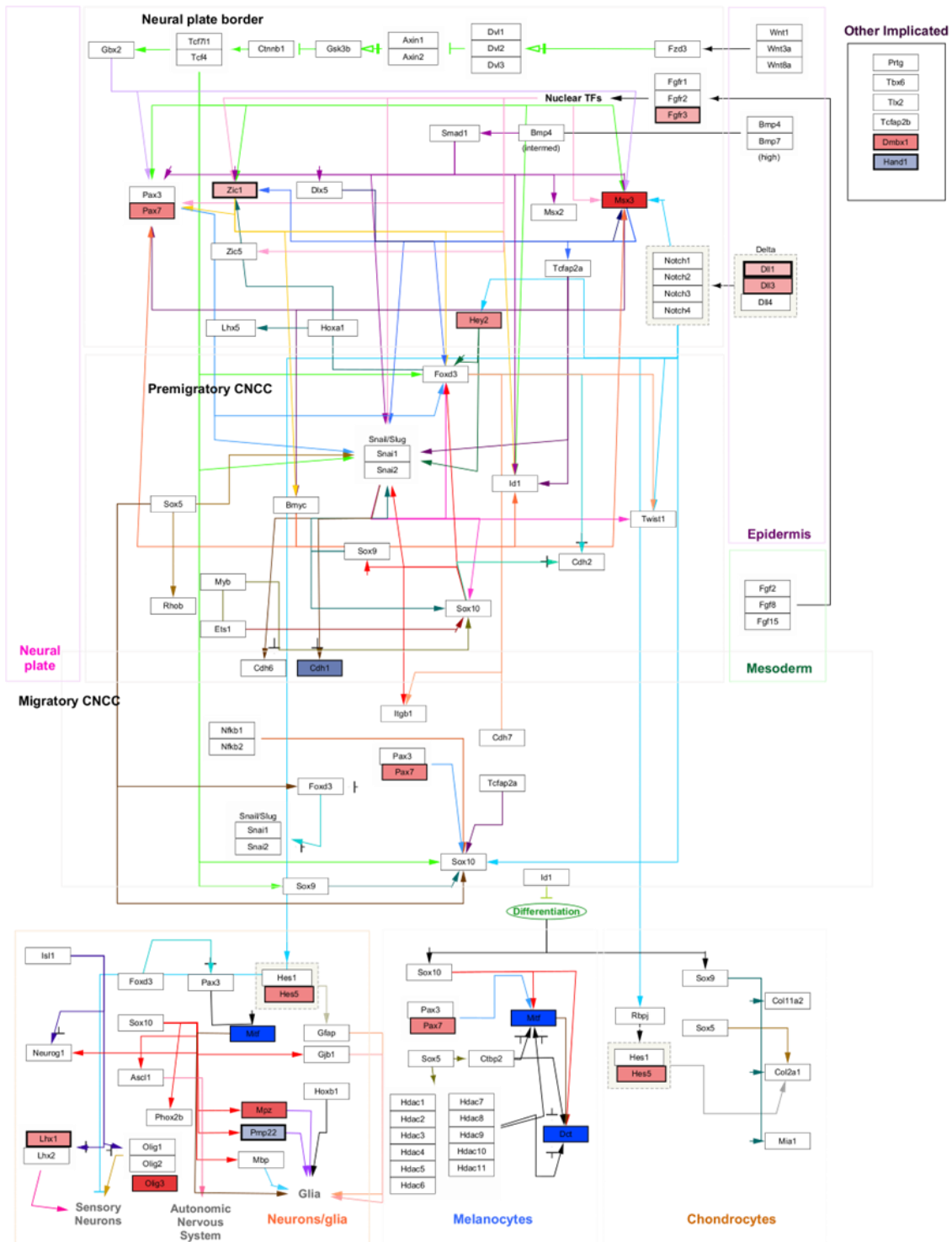


Figure 3.15 Visualisation des gènes différentiellement exprimés (DEG) impliqués dans la différenciation des CCN.

Cette figure, réalisée à l'aide de Cytoscape, représente un réseau d'interactions et de régulation des gènes impliqués dans la différenciation des CCN, basé sur le WikiPathway Neural Crest Differentiation

(MM15926). Les gènes sur-régulés (upregulated) sont indiqués en rouge, tandis que les gènes sous-régulés (downregulated) sont en bleu. L'intensité de la couleur est proportionnelle au niveau de dérégulation, illustrant les variations d'expression des gènes analysés dans le contexte des CCN *Nr2f1^{Spot/Spot}*. Le réseau est divisé en plusieurs sections reflétant les différentes voies de différenciation cellulaire. Les principales populations dérivées des CCN, telles que les neurones, les cellules gliales, les mélanocytes, et les chondrocytes, sont représentées avec leurs régulateurs transcriptionnels associés, tels que SOX10, PAX3, MITF, et FOXD3. Les flèches colorées indiquent les interactions transcriptionnelles entre les gènes, les protéines de signalisation, et les facteurs de transcription clés, reliant les différentes voies de différenciation. Les différentes boîtes représentent les catégories fonctionnelles ou les groupes de gènes impliqués dans la régulation du développement des CCN. Le réseau est organisé de manière à refléter les transitions et engagements cellulaires, allant de la crête neurale indifférenciée (neural plate) aux différentes lignées terminales (neurones sensoriels, cellules gliales, mélanocytes, et chondrocytes). Cette carte offre une vue d'ensemble des effets transcriptionnels de la mutation *Spot* sur les CCN et leurs dérivés, mettant en évidence les gènes affectés par la mutation.

3.3.3 Analyse de séquençage d'ARN en cellule unique (scRNA-seq)

3.3.3.1 Méthodologie et Identification des Sous-populations Cellulaires

Alors que nos analyses séquençage d'ARN en vrac ont révélé des changements transcriptionnels étendus dans les CCN des embryons *Nr2f1^{Spot/Spot}*, les résultats ont également mis en lumière certaines limitations liées à cette approche. La dérégulation modeste de certains marqueurs gliaux, malgré les prévisions basées sur nos essais luciférase, et l'identification d'une grande diversité de gènes affectés suggèrent que l'hétérogénéité cellulaire inhérente aux CCN pourrait masquer des effets spécifiques à certaines sous-populations. Pour surmonter cette limitation, nous avons effectué une analyse de séquençage d'ARN en cellule unique (scRNA-seq) afin de décomposer cette hétérogénéité et examiner plus précisément comment la surexpression de *Nr2f1* influence les différentes sous-populations de CCN à E10.5 dans les embryons *Nr2f1^{Spot/Spot}*.

Pour cette analyse, nous avons regroupé les CCN issus de quatre embryons de chaque génotype à E10.5, afin de constituer un échantillon contrôle (Gata4p-RFP) et un échantillon Gata4p-RFP;*Nr2f1^{Spot/Spot}*. Comme pour l'expérience de séquençage d'ARN en vrac, les embryons ont été dissociés minutieusement en suspensions de cellules uniques et ont immédiatement subi un tri cellulaire afin d'isoler les cellules RFP+. Ces cellules isolées ont ensuite été introduites dans le système de 10X Genomics Chromium, aboutissant à la capture de 6 398 cellules des embryons témoins et de 5 995 cellules des embryons *Nr2f1^{Spot/Spot}*. Les jeux de données ont ensuite été

traités, analysés et visualisés avec soin à l'aide de l'instance communautaire Cellenics® (<https://scp.biomage.net/>) hébergée par Biomage. Des mesures de contrôle de qualité rigoureuses ont été mises en place pour exclure les cellules présentant des nombres de gènes anormalement élevés ou faibles, indicatifs de doublets ou de cellules mourantes, respectivement. Par la suite, nous avons effectué un regroupement non supervisé de Louvain. Cette analyse a révélé un total de 10 populations cellulaires distincts dans chaque jeu de données. Une annotation subséquente, basée sur l'expression de gènes marqueurs connus, nous a permis d'identifier plusieurs populations cellulaires qui n'étaient pas directement liées à l'objectif principal de notre étude. Celles-ci comprenaient des populations représentant des cellules sanguines, des cellules endothéliales et des cellules avec une signature épidermique que nous avons choisis d'ignorer étant donné l'absence de marqueurs de cellules dérivés des CCN. Après élimination de ces populations cellulaires non pertinentes, nous avons obtenu 1 090 cellules dans le jeu de données contrôle et 1 027 cellules dans le jeu de données *Nr2f1^{Spot/Spot}*. Les jeux de données ont ensuite été visualisés à l'aide de la méthode UMAP (Uniform Manifold Approximation and Projection) pour la réduction de dimension. En analysant méticuleusement les profils d'expression au sein de chacun des 6 populations restant via un regroupement non supervisé de Louvain, nous avons attribué des types cellulaires distincts à ces populations en fonction de leurs signatures transcriptomiques (Figure 3.16, 3.17 et 3.18).

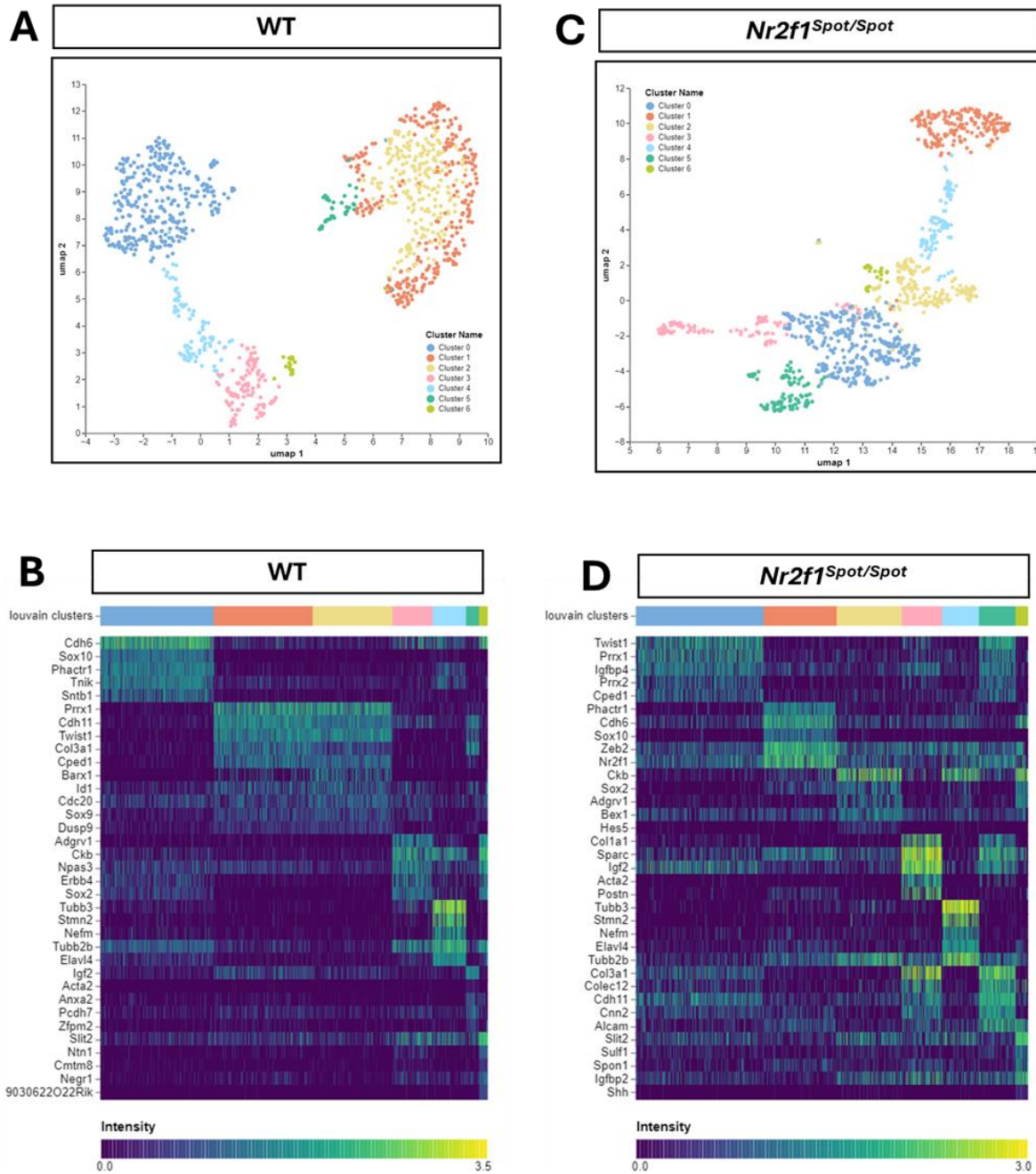


Figure 3.16 Regroupement non supervisé de Louvain et projection UMAP des CCN WT et *Nr2f1*^{Spot/Spot}

Projection UMAP et regroupement non supervisé de Louvain des CCN WT (A) et *Nr2f1*^{Spot/Spot} (C), les couleurs attribuées à chaque population sont aléatoires et ne sont pas représentatives des mêmes populations cellulaires dans les CCN WT et *Nr2f1*^{Spot/Spot}. (B et D) Heatmaps présentant les 5 gènes dont l'expression caractérise chacun des 6 regroupements de Louvain.

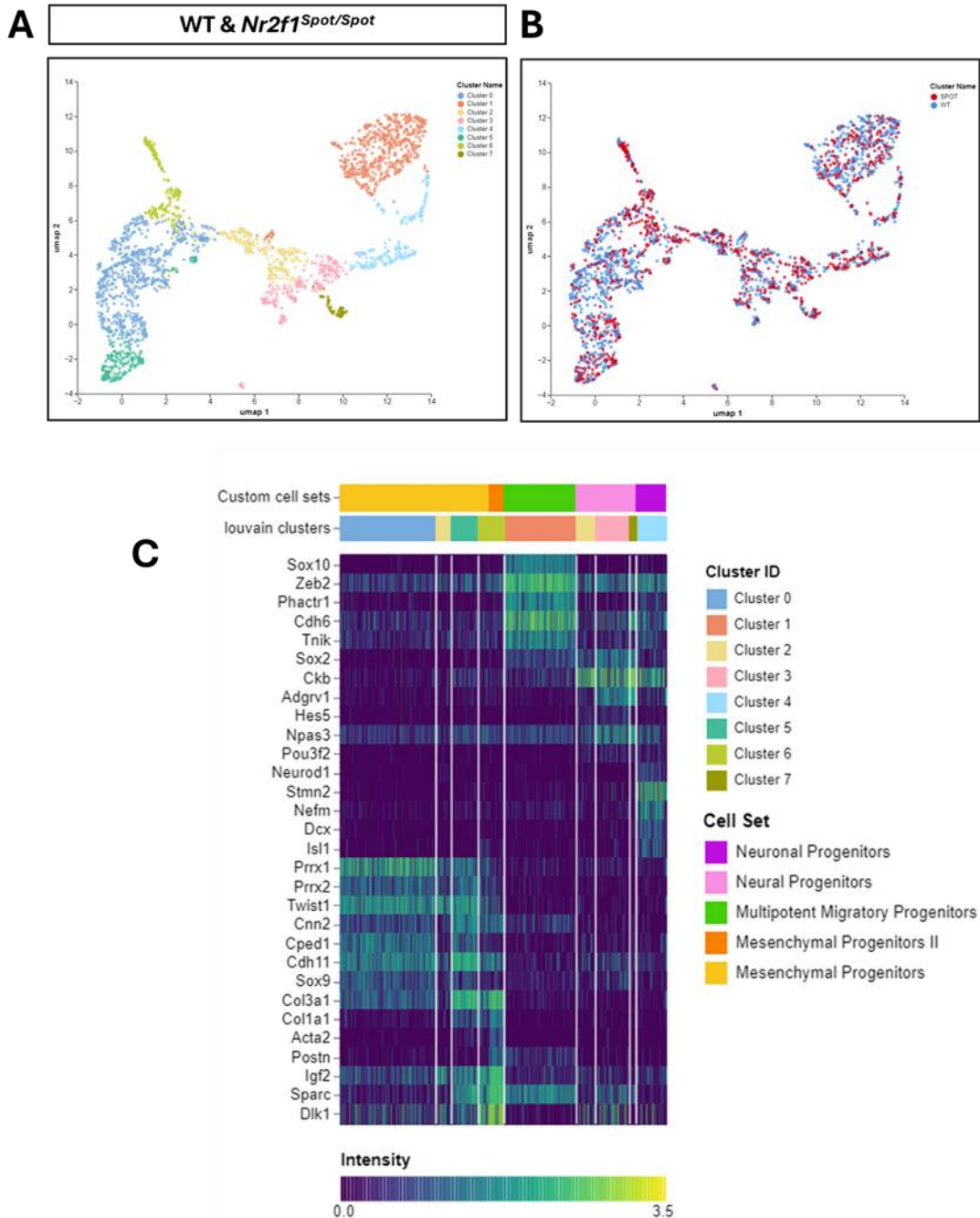


Figure 3.17 Projection combinée des CCN WT et *Nr2f1*^{Spot/Spot} avec regroupement Louvain et comparaison avec les populations cellulaires attribués manuellement.

(A) Projection UMAP combinée des cellules WT et *Nr2f1*^{Spot/Spot}, montrant la répartition des populations cellulaires selon le regroupement non supervisé de Louvain. Chaque couleur correspond à un groupe de cellules distinct. (B) Les points rouges représentent les cellules mutantes (*Nr2f1*^{Spot/Spot}) et les points bleus représentent les cellules WT. La comparaison visuelle permet de suivre la distribution des cellules mutantes dans les différentes populations cellulaires par rapport aux cellules WT (*Gata4p-RFP*). (C) Heatmap montrant l'expression des gènes dans les regroupement de Louvain par rapport aux populations

cellulaires attribuées manuellement. Chaque groupe de cellules est associé à un ensemble spécifique de populations cellulaires, telles que les progéniteurs neuronaux, les progéniteurs neuraux, et les progéniteurs mésenchymateux.

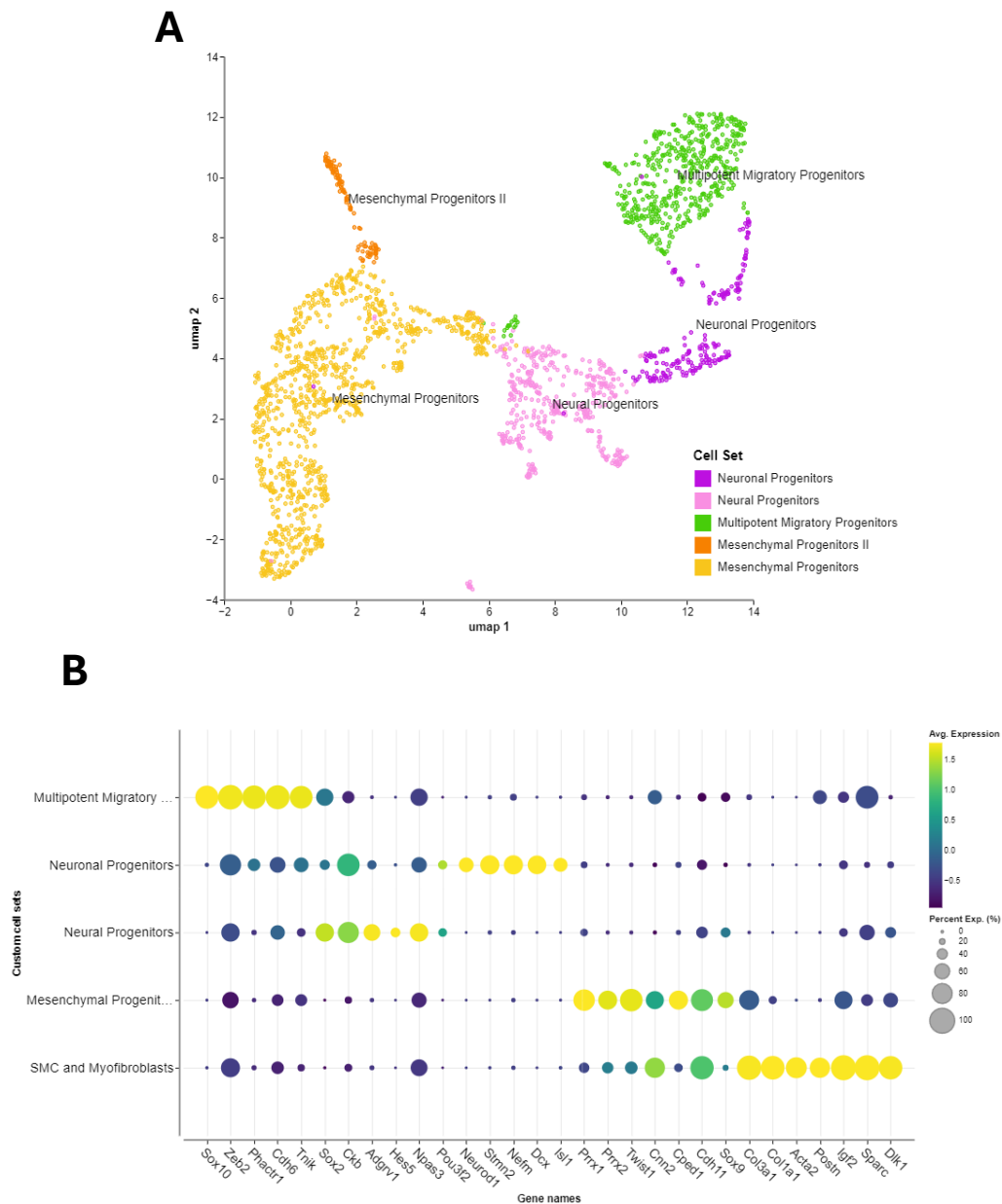


Figure 3.18 Attribution finale des regroupements de cellules à des populations cellulaires dérivées CCN.

(D) Projection UMAP représentant l'attribution finale des regroupement de cellules à des populations cellulaires dérivées CCN. Les différentes populations cellulaires sont classées en plusieurs groupes

distincts : progéniteurs neuronaux (violet), progéniteurs neuraux (rose), progéniteurs migratoires multipotents (vert), progéniteurs mésenchymateux (orange), et progéniteurs mésenchymateux II (marron). Chaque couleur correspond à un ensemble cellulaire attribué, permettant de visualiser la diversité des populations cellulaires dérivées des CCN. (E) Dot plot illustrant l'expression moyenne des gènes spécifiques dans chacune des populations cellulaires. Les gènes sont représentés par des points dont la taille reflète la proportion de cellules exprimant ces gènes, et l'intensité de la couleur indique le niveau moyen d'expression. Ce graphique met en évidence les caractéristiques transcriptomiques distinctes de chaque population de progéniteurs dérivés des CCN.

3.3.3.2 Caractérisation des sous-populations cellulaires dérivées des CCN

La visualisation des jeux de données via la méthode UMAP a permis de distinguer plusieurs sous-populations de CCN selon leurs signatures transcriptomiques caractéristiques (Figure 3.18). Nous avons identifié cinq populations cellulaires majeurs dérivés des CCN:

- Progéniteurs migratoires et multipotents (***Sox10***, *Phactr1*, *Tfap2b*): Cellules maintenues dans un état indifférencié, possédant le potentiel de se différencier en diverses lignées, y compris neuronale, mésenchymateuse, gliale ou mélanocytaire.
- Progéniteurs mésenchymateux (I) (***Twist1***, ***Prrx1***, *Prrx2*) : Cellules en cours d'engagement vers des trajectoires de différenciation mésenchymateuses, telles que les lignées chondrogéniques, ostéogéniques et fibroblastiques (Soldatov et al., 2019).
- Progéniteurs mésenchymateux II (myo-fibrogéniques) (*Col1a1*, ***Dlk1***, ***Postn***, ***Acta2***) : Cellules différenciées vers des lignées mésenchymateuses spécialisées, exprimant des marqueurs caractéristiques des cellules musculaires lisses et des myofibroblastes.
- Progéniteurs neuraux (***Sox2***, *Adgrv1*, *Dcx*, ***Npas3***) : Cellules montrant des signes d'engagement vers des lignées neurale (neurones ou cellules gliales).
- Progéniteurs neuronaux (*Stmn2*, *Nefm*, *Elavl4*) : Cellules avancées sur la voie de la différenciation neuronale.

Il est important de noter qu'il n'est pas possible dans cette expérience de distinguer les CCN provenant de différentes régions (ex : tronc vs crâne), d'autre part la quantité de cellules et la comparaison de seulement deux échantillons limite la possibilité de déterminer avec précision l'identité des différentes sous-populations observées. Cela étant dit, en nous basant sur

l'expression de certains marqueurs clés nous avons pu identifier plusieurs populations significativement distinctes les unes des autres et présente dans chacun des échantillons. Bien que les mêmes populations cellulaires ont été retrouvées dans les échantillons mutants *Gata4p-RFP;Nr2f1^{Spot/Spot}* et contrôles *Gata4p-RFP*, nous avons en revanche constaté que leurs proportions varient significativement, suggérant un impact de la surexpression de Nr2f1 sur la dynamique de différenciation des CCN dès le stade E10.5. (Figure 3.19)

3.3.3.3 Comparaison des sous-populations cellulaires dérivées des CCN

Nos analyses ont en effet révélé que la surexpression de *Nr2f1* dans les embryons *Nr2f1^{Spot/Spot}* entraîne des changements dans les proportions des différentes populations de progéniteurs dérivés des CCN observées à E10.5 (Figure 3.19 B et C). Nous avons observé une réduction marquée de la proportion de progéniteurs multipotents exprimant *Sox10*, qui passe de 29.3% dans les échantillons contrôles à 18.4 % chez les mutants *Nr2f1^{Spot/Spot}*. Cette diminution d'environ 10 % suggère que ces progéniteurs multipotents ont été réorientés vers une voie de différenciation plus spécifique, probablement neurogliale, car cette réduction correspond à une augmentation d'environ 10 % de la proportion de progéniteurs neuraux chez les mutants (de 12.4 % à 20.4 % chez les mutants). Ces données suggèrent une un engagement plus important des progéniteur multipotent vers un état neuroglial sous l'effet de la surexpression de NR2F1. En revanche, les proportions de progéniteurs neuronaux sensoriels et autonomes ne sont pas significativement affectées suggérant que la surexpression de NR2F1, bien que favorisant un destin neuroglial, ne semble pas provoquer l'engagement des progéniteurs neurogliaux vers un destin neuronal.

Concernant les progéniteurs mésenchymateux, leur proportion globale reste similaire entre les deux échantillons (environ 50 % au total). Toutefois, nous avons également observé un engagement plus important de ces progéniteurs vers des lignées myofibrogéniques : 10 % des cellules mésenchymateuses chez les mutants présentent des profils transcriptionnels orientés vers la différenciation en fibroblastes ou cellules musculaires, contre 3 % chez les contrôles.

De plus, la méthode UMAP est une technique de réduction dimensionnelle qui permet de visualiser des relations complexes dans les données, notamment la proximité ou la séparation de différentes populations cellulaires en fonction de leurs profils d'expression. Dans la figure 3.19 (A et B), une séparation nette entre deux grandes populations cellulaires est observable dans l'échantillon contrôle *Gata4p-RFP* alors que cette séparation est moins évidente dans l'échantillon mutant *Gata4p-RFP;Nr2f1^{Spot/Spot}*, cela pourrait suggérer un biais dans la différenciation ou à une perturbation dans la spécification des lignées (Figure 3.19 A et B). Globalement ces observations suggèrent que NR2F1 semble promouvoir l'engagement des CCN vers des trajectoires de différenciation spécifiques, ce qui réduit leur potentiel multipotent et influence de manière significative le développement de plusieurs lignées cellulaires, telles que les mélanocytes et les progéniteurs du SNE.

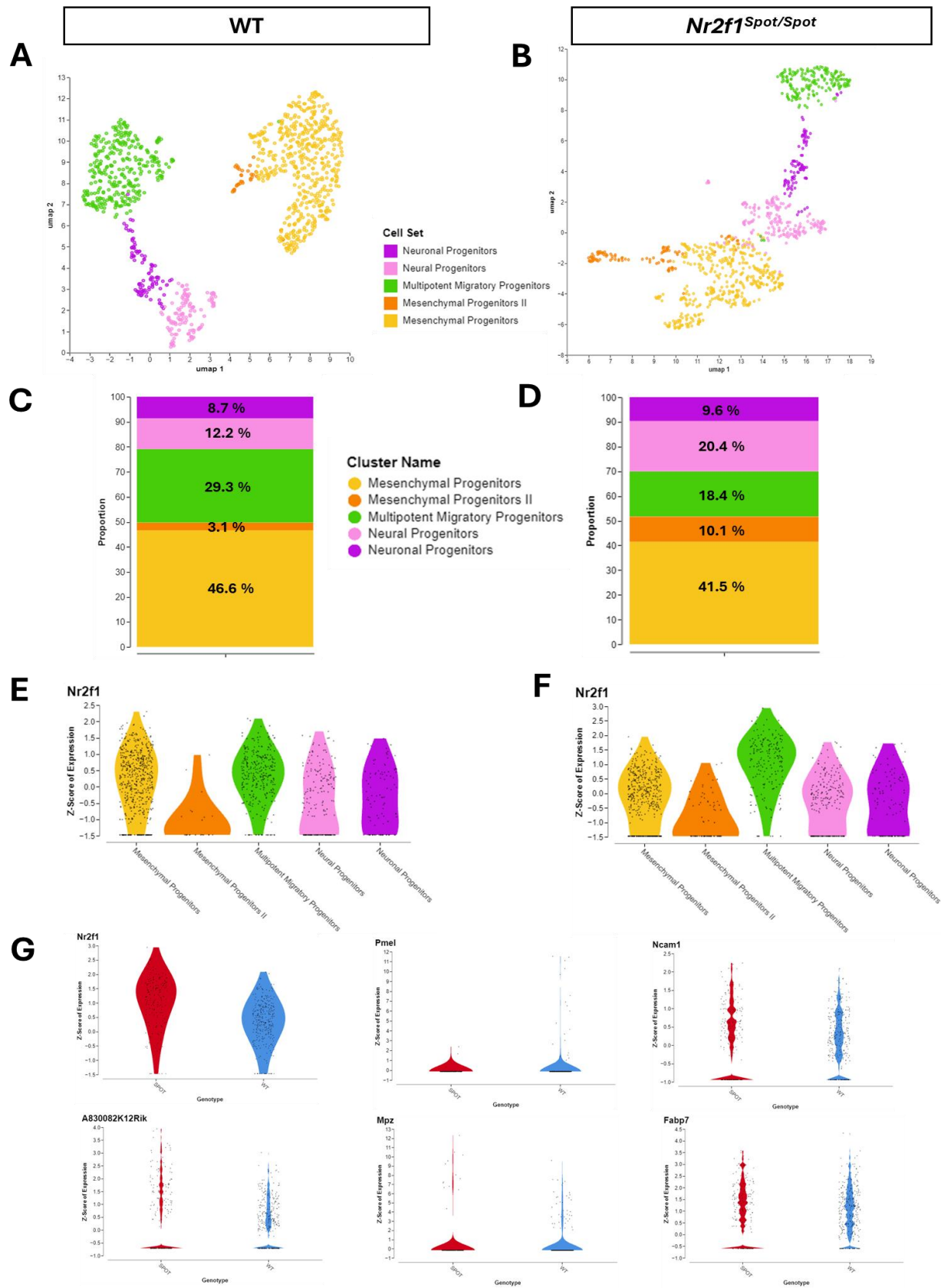


Figure 3.19 Comparaison des populations cellulaires dérivées des CCN entre les embryons WT et *Nr2f1^{Spot/Spot}*.

(A) et (B) Projection UMAP des CCN WT et *Nr2f1^{Spot/Spot}*, montrant la répartition des différentes populations de progéniteurs cellulaires. Les populations sont classées en progéniteurs neuronaux, progéniteurs neuronaux, progéniteurs mésenchymateux, progéniteurs mésenchymateux II, et progéniteurs migratoires multipotents. (C) et (D) Comparaison des proportions relatives de ces populations entre les cellules WT et *Nr2f1^{Spot/Spot}*. Les barres de couleurs représentent les pourcentages des différentes populations dans chaque condition, avec des différences notables dans la distribution des progéniteurs entre les deux génotypes. (E) et (F) Graphiques en forme de violon représentant l'expression de *Nr2f1* dans chacune des populations cellulaires attribuées chez les WT et *Nr2f1^{Spot/Spot}*. Ces graphiques permettent de visualiser l'intensité et la distribution de l'expression de *Nr2f1* au sein de chaque population. (G) Expression de *Nr2f1*, *Pmel*, *Ncam1*, *Mpz*, *Fabp7*, et *A830082K12Rik* dans la population de progéniteurs multipotents (caractérisée par l'expression de *Sox10*). Ces graphiques en violon montrent la variation de l'expression entre les cellules WT et *Nr2f1^{Spot/Spot}* pour ces gènes, spécifiquement au sein des progéniteurs multipotents exprimant *SOX10* (vert).

Par ailleurs, nous avons observé que, conformément aux observations présentées dans la section 3.1, la surexpression de *Nr2f1* (ainsi que celle du lncRNA antisens divergent *A830082K12Rik* ou *Nr2f1-AS*) semble spécifiquement restreinte aux progéniteurs multipotents exprimant *SOX10* (Figure 3.19 E et F). Cette surexpression est accompagnée d'une augmentation de l'expression des gènes gliaux, tels que *Mpz* et *Egr2*, et d'une diminution de l'expression des gènes mélanocytaires comme *Dct* et *Pmel*, en accord avec les résultats obtenus par l'analyse du séquençage ARN en vrac (section 3.3.2) (Figure 3.19 G). Cela pourrait en partie expliquer les phénotypes observés chez les souris *Nr2f1^{Spot/Spot}*. En effet, nos observations suggèrent que la dérégulation de *Nr2f1* n'affecte que les progéniteurs dérivés des CCN qui expriment *SOX10*. On peut donc s'attendre à ce que les dérivés des CCN, pour lesquels l'expression de *SOX10* est maintenue tardivement, comme les progéniteurs des mélanocytes dérivés des SCP et les progéniteurs entériques, soient plus fortement affectés par la surexpression de *Nr2f1* comme on peut l'observer chez *Spot*.

En conclusion, ces résultats suggèrent que le phénotype des souris *Spot* est principalement dû à la spécificité de la dérégulation de *Nr2f1* dans les CCN exprimant *SOX10*. Cette observation soulève des questions importantes concernant les mécanismes sous-jacents à cette régulation spécifique de *Nr2f1* dans les CCN, et comment ces mécanismes sont perturbés chez les souris

Spot. Pour mieux comprendre ces processus qui régule l'expression de *Nr2f1* au cours du développement des CCN, nous avons entrepris d'explorer les causes potentielles de la dérégulation de *Nr2f1* dans les CCN des embryons *Nr2f1^{Spot/Spot}*.

3.4 Identification des mécanismes sous-jacent à la dérégulation de *Nr2f1* dans les CCN des embryons *Nr2f1^{Spot/Spot}*.

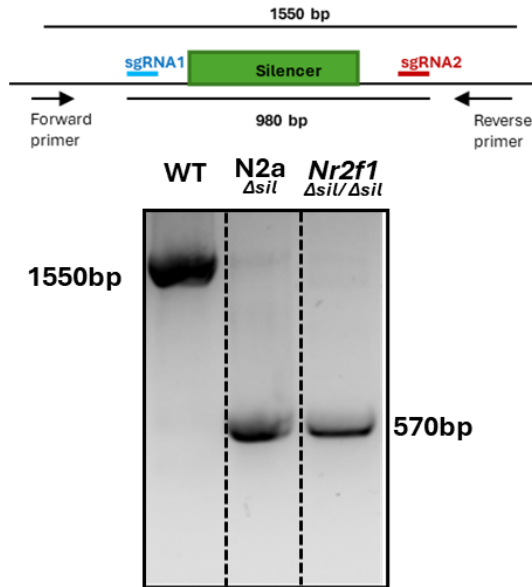
Afin d'explorer les mécanismes régulant l'expression de *Nr2f1* au cours du développement des CCN, nous avons focalisé notre attention sur un élément d'ADN de 676pb, hautement conservé chez les vertébrés, situé dans le dernier intron du lncRNA antisens *A830082k12Rik* (renommé *Nr2f1-AS* chez l'humain). Cet élément avait précédemment attiré notre attention en raison de son potentiel rôle régulateur dans les CCN : il est hautement conservé spécifiquement chez les vertébrés, interagit *in vivo* avec le promoteur de *Nr2f1/Nr2f1-AS* (démonstré par des essais de capture conformation de chromatine 3C) dans les CCN et exerce une activité répressive, comme suggéré par des essais de luciférase (Bergeron *et al.*, 2016).

Notre hypothèse initiale était que cet élément régulateur de 676 pb joue un rôle essentiel dans le contrôle de l'expression de *Nr2f1* et que la perturbation de son interaction avec le promoteur de *Nr2f1/Nr2f1-AS* pourrait expliquer la dérégulation de *Nr2f1* observée dans le modèle *Spot*. Pour tester cette hypothèse, nous avons entrepris de supprimer spécifiquement cet élément en utilisant la technologie CRISPR-Cas9 et d'évaluer si sa délétion reproduirait le phénotype observé chez *Spot*. Nous avons conçu deux guides CRISPR ciblant les régions flanquantes de l'élément conservé. Ces guides ont été validés *in vitro* par transfection dans des lignées cellulaires, où la délétion de l'élément cible a été confirmée par PCR et séquençage. Des zygotes murins ont ensuite été micro-injectés avec les complexes CRISPR-Cas9 contenant les guides, puis implantés dans des mères porteuses. Les souris nées de ces manipulations ont été criblées par PCR et séquençage direct de l'ADN génomique pour confirmer la délétion (Figure 3.20 A). Des croisements ont ensuite été effectués afin d'obtenir des animaux homozygotes pour la délétion (*Nr2f1^{ΔSil/ΔSil}*). Cependant, contrairement à nos attentes, les souris homozygotes pour la délétion de l'élément de 676 pb n'ont présenté aucun des phénotypes observés dans le modèle *Spot*.

Étant donné l'absence de phénotype observables à la suite de la délétion de l'élément conservé de 676 pb, nous avons cherché à comprendre les mécanismes expliquant la dérégulation de *Nr2f1* dans le modèle *Spot*. Plusieurs hypothèses seront discutées dans le chapitre 4. Parmi celles-ci, nous avons envisagé le rôle potentiel du lncRNA *Nr2f1-AS*, plus précisément de son isoforme longue, qui inclut le dernier exon alternatif, particulièrement distant des autres exons. L'expression de cette isoforme longue est perdue dans les CCN des embryons *Spot* en raison de l'insertion transgénique, contrairement aux isoformes courtes qui, elles, sont surexprimées avec *Nr2f1* (Bergeron *et al.*, 2016) (Figure 1.7). Pour évaluer l'impact de la délétion de l'élément conservé sur l'expression de l'isoforme longue de *Nr2f1-AS*, nous avons réalisé des analyses par RT-qPCR sur des cellules Neuro2a dans lesquelles cet élément a été supprimé via CRISPR-Cas9 (Figure 3.20 B). Nos résultats ont révélé que l'expression de l'isoforme longue de *Nr2f1-AS*, incluant le dernier exon, n'est pas affectée par la délétion de cet élément. Cela suggère que la perte de l'isoforme longue de *Nr2f1-AS* dans le modèle *Spot* reste une hypothèse valide pour expliquer, au moins en partie, la dérégulation de *Nr2f1*.

En conclusion, nos résultats indiquent que la régulation de *Nr2f1* dans les CCN repose probablement sur plusieurs mécanismes redondants ou complémentaires. En effet, l'absence de phénotype chez les souris *Nr2f1^{ΔSil/ΔSil}* suggère que la délétion de l'élément conservé de 676pb ne suffit pas, à elle seule, à perturber la régulation de *Nr2f1* ou que d'autres mécanismes compensatoires pourraient pallier cette dérégulation. Il sera important, dans les recherches futures, d'explorer plus en profondeur l'organisation locale de la chromatine, les interactions à longues distances, ainsi que le rôle des différents variants de lncRNA *Nr2f1-AS* dans le maintien de l'expression normale de *Nr2f1* dans les CCN.

A



B

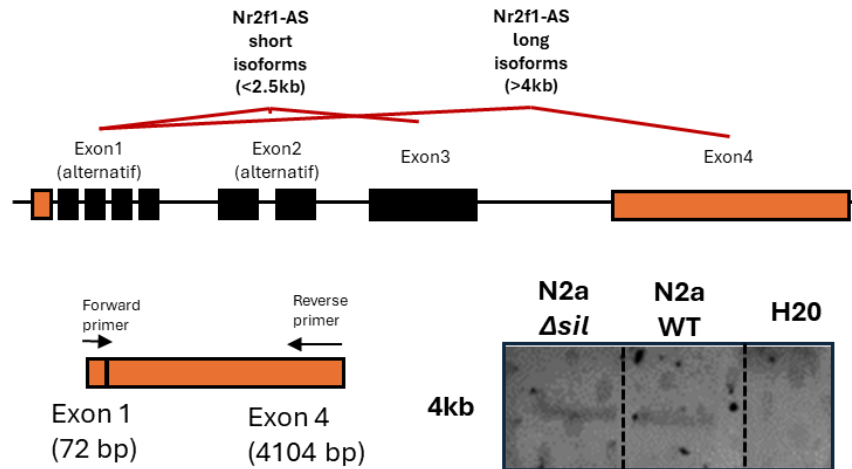


Figure 3.20 Délétion du répresseur présumé de *Nr2f1* par CRISPR-Cas9 dans des cellules NeuroA et génération de la lignée murine *Nr2f1*^{Δsil}.

(A) Schéma des brins guides (sgRNA1 et sgRNA2) utilisés pour cibler et déléter le répresseur présumé de *Nr2f1* par CRISPR-Cas9. Le répresseur, situé en amont du gène *Nr2f1*, dans l'intron de *Nr2f1*-AS spécifiques aux formes longues a été ciblé par ces brins guides pour générer une délétion. Le gel d'électrophorèse montre les produits de PCR confirmant la délétion du répresseur dans les cellules Neuro2a et dans le génome des souris *Nr2f1*^{Δsil/Δsil}. (B) Schéma du lncRNA *Nr2f1*-AS montrant l'épissage des formes longues et courtes de *Nr2f1*-AS. Les amplifications des isoformes longues ont été réalisées par RT-PCR, comme montré dans le gel d'agarose. Les résultats confirment l'expression de l'isoforme longue dans les cellules Neuro2a ayant subi la délétion du répresseur (N2a^{Δsil}).

CHAPITRE 4

DISCUSSION

4.1 Introduction de la discussion

L'objectif de cette recherche était d'élucider le rôle du gène *Nr2f1* dans la différenciation des CCN en utilisant le modèle murin *Nr2f1^{Spot/Spot}*. Ce modèle nous a permis d'explorer les mécanismes moléculaires par lesquels le récepteur nucléaire NR2F1 influence le développement des CCN, avec un accent particulier sur les lignées gliales et mélanocytaires. Nos résultats apportent des éléments nouveaux sur la dynamique d'expression de NR2F1, ses interactions avec d'autres facteur de transcriptions, notamment SOX10, et sur sa fonction dans la régulation du destin des CCN.

Les principales conclusions de cette étude montrent que NR2F1 est coexprimé avec SOX10 dès les premières étapes de la migration des CCN, aux stades développementaux E9.5 et E10.5 chez la souris. Cette co-expression précoce suggère un rôle potentiel de NR2F1 dès les premières étapes du développement des CCN. Cela est corroboré par l'enrichissement en motifs de liaison pour NR2F1/NR2F2 au niveau d'enhancers spécifiques aux CCN et par la présence simultanée de NR2F1/2, TFAP2A, un facteur pionnier dans l'établissement des CCN, et de marques de chromatine permissive comme P300 et la marque d'histone H3k27ac au niveau de ces sites dans des CCN issues d'embryons de poulet (Rada-Iglesias *et al.*, 2012). De plus, nous avons mis en évidence une interaction fonctionnelle entre les facteurs de transcription NR2F1 et SOX10, indiquant que ces deux facteurs collaborent pour réguler l'expression des gènes qui définissent l'identité gliale des cellules gliales entériques et des cellules de Schwann ce qui confirme le rôle de NR2F1 comme un cofacteur de SOX10 spécifiquement impliqué dans la spécification des cellules gliales du SNP comme suggéré par les travaux Lopez-Anido *et al.*, (Lopez-Anido *et al.*, 2015). Les analyses transcriptomiques qui ont été réalisées ont cependant révélé une influence de NR2F1 sur le transcriptome des CCN à E10.5 qui s'étend au-delà de la différenciation et de la maturation des cellules gliales du SNP. En effet, nous avons découvert un large éventail de gènes dérégulés dans les CCN des embryons *Nr2f1^{Spot/Spot}*, démontrant qu'à E10.5 chez la souris, NR2F1

exerce un contrôle plus étendu sur les destinées cellulaires des CCN qui sera discuté dans la section suivante.

D'autre part, nos observations suggèrent que la surexpression de NR2F1 dans les CCN des embryons *Nr2f1^{Spot/Spot}* est dépendante de l'expression de SOX10. Trop peu d'informations sont disponibles à ce jour pour conclure sur la cause de cette dérégulation. Cependant, si cet effet n'est pas provoqué par un mécanisme introduit ou perturbé artificiellement par la fonction du transgène lui-même, il serait particulièrement intéressant de comprendre les mécanismes qui permettent le contrôle de l'expression de *Nr2f1* au cours du développement des CCN. Bien que la délétion de l'élément répresseur précédemment identifié comme un potentiel régulateur spécifique aux CCN n'ait pas permis de reproduire le phénotype *Spot*, nos résultats, combinés à d'autres données expérimentales et aux connaissances actuelles de la littérature, ont conduit à l'élaboration de nouvelles hypothèses qui seront décrites dans la section 4.3, notamment pour discuter l'implication du lncRNA *A830082k12Rik*, plus simplement connu sous le nom de *NR2F1-AS* chez l'homme. En effet, l'organisation particulière du locus *NR2F1/NR2F1-AS* chez les vertébrés (gène/lncRNA antisens divergent avec variants d'épissage courts et longs), combinée à la conservation des domaines fonctionnels de NR2F1 à travers les métazoaires, suggère une importance évolutive clé de cette structure génomique dans la régulation de NR2F1 dans les CCN (Coppola et Waxman, 2021). Il est possible que cette configuration soit le résultat d'une adaptation évolutive chez les vertébrés, permettant la régulation de l'expression de NR2F1 dans les CCN.

Cette discussion examine en détail les implications des résultats obtenus au cours de mes travaux de recherche et les replace dans le contexte des connaissances actuelles sur le rôle de NR2F1, en particulier dans la régulation du destin cellulaire des CCN et dans la spécification et la diversification des cellules gliales dérivées des CCN, incluant les cellules de Schwann et les cellules gliales entériques (CGE). Elle explore également les conséquences plus larges de la dérégulation de *Nr2f1* observées dans le transcriptome des CCN *Nr2f1^{Spot/Spot}* à E10.5 ainsi que son impact sur la différenciation cellulaire, en mettant en avant les principaux groupes de gènes affectés et les voies de signalisation perturbées. Enfin, nous explorerons les hypothèses alternatives pour tenter

d'expliquer et de comprendre la spécificité de la dérégulation de *Nr2f1* à une sous-population spécifique des CCN chez *Spot*, en mettant en lumière la complexité des mécanismes régulateurs sous-jacents, ainsi que les conséquences potentielles de telles perturbations dans le cadre des neurocristopathies et des processus oncogéniques.

4.2 Rôle de NR2F1 dans le développement des CCN et dans la différenciation des cellules de Schwann

En plus d'avoir identifié NR2F1 comme un régulateur clé des gènes impliqués dans le développement des CCN, les travaux de Rada-Iglesias et al. (2012) ont montré que la réduction de l'expression de *NR2F1* perturbe la régulation de gènes important pour le développement crâniofacial, tels que *SOX9*, *DLX1*, et *SNAI1*. Cette étude met ainsi en évidence l'importance de NR2F1 dans la maintenance de la régulation transcriptionnelle des CCN et la morphogenèse des structures crâniofaciales dérivées des CCN (Rada-Iglesias et al., 2012). Par ailleurs, Okeke et al. (2022) ont démontré que les récepteurs nucléaires NR2F, dont NR2F2 et NR2F5 chez le poisson-zèbre, jouent un rôle crucial dans l'activation du programme ectomésenchymateux dans les CCN céphalique. Cette étude montre que les récepteurs NR2F2 et NR2F5 agissent comme des activateurs intrinsèques du programme ectomésenchymateux, et que leur absence chez les mutants entraîne un retard dans l'expression de gènes clés tels que *dlx2a*, *prrx1a*, *prrx1b*, *sox9a*, *twist1a*, et *fli1a* (Okeke et al., 2022). Chez les mammifères et les oiseaux, cette fonction est assurée principalement par NR2F1 et NR2F2, NR2F5 ayant été perdu dans la majorité des lignées amniotes. Ainsi, NR2F1 et ses homologues chez le poisson-zèbre semblent jouer un rôle similaire dans la régulation des CCN crânielles (Okeke et al., 2022; Rada-Iglesias et al., 2012). Enfin, Hovland et al. (2022) ont démontré que les facteurs de pluripotence, comme SOX2 et OCT4, sont réutilisés par les CCN pour réguler leur potentiel de différenciation (Hovland et al., 2022). Cette réutilisation des facteurs de pluripotence est le reflet de l'adaptation de GRN préexistants qui ont permis l'émergence des CCN comme mentionné dans l'introduction (York et al., 2023). De manière intéressante, cette étude met en lumière un rôle potentiel de NR2F1 dans la mise en place d'un programme génétique spécifique aux CCN car il ressort comme un des facteurs de transcription dont l'accessibilité aux motifs de liaisons augmente le plus au cours de la transition des CCN

multipotentes vers des lignées différenciée (Hovland *et al.*, 2022). Dans l'ensemble, ces études démontrent le rôle important que semble avoir NR2F1 dans le développement des CCN.

En parallèle, il apparaît que NR2F1 joue un rôle crucial dans la différenciation des cellules de Schwann, les cellules responsables de la formation des gaines de myéline dans le SNP. En utilisant une approche combinée de ChIP-Seq et de knockdown par siRNA, Lopez-Anido *et al.* (2015) ont montré que la réduction de l'expression de *Nr2f1* et *Nr2f2* entraîne une diminution significative des gènes permettant la production de myéline, tels que *Mbp* et *Ndr1*. Ces résultats suggèrent que NR2F1 (et/ou NR2F2) est un cofacteur clé de SOX10 dans le réseau transcriptionnel contrôlant le développement et la fonction des cellules de Schwann (Lopez-Anido *et al.*, 2015). SOX10 est en effet essentiel pour l'activation de plusieurs gènes gliaux nécessaire au cours de la spécialisation des cellules de Schwann comme *Mpz*, *Fabp7*, *Plp1* ou *S100b* et il régule directement l'expression de ces gènes via des éléments cis-régulateurs différents dans les cellules myélinisantes du SNC et du SNP, c'est-à-dire, respectivement, dans les oligodendrocytes et dans les cellules de Schwann (Jacob *et al.*, 2014; Lopez-Anido *et al.*, 2015).

Nos résultats révèlent plusieurs observations intrigantes concernant l'interaction entre NR2F1, SOX10 et EGR2 (KROX20) dans la régulation du gène *Mpz*. Tout d'abord, dans les CCN *Nr2f1^{Spot/Spot}*, nous avons observé une régulation à la hausse de *Egr2* et de *Mpz*, deux gènes essentiels pour la production de myéline par les cellules de Schwann (Jones *et al.*, 2007; Stolt et Wegner, 2016). Nos résultats d'essais de luciférase apportent des éclaircissements supplémentaires sur l'influence de NR2F1 dans la régulation de l'activation transcriptionnelle de *Mpz* par SOX10. En effet, dans nos essais luciférase, la présence de NR2F1 inhibe l'activation du promoteur de *Mpz* par SOX10 mais induit une activation beaucoup plus forte de l'enhancer de *Mpz* situé dans l'intron 1, lequel est justement corégulé par EGR2 et SOX10 (Jones *et al.*, 2007). Cela suggère que NR2F1 pourrait moduler spécifiquement l'interaction entre SOX10 et les différentes régions régulatrices de *Mpz*, favorisant l'activation de l'enhancer corégulé par EGR2 qui est nécessaire lors la maturation des cellules de Schwann. De plus, les résultats de Lopez-Anido *et al.* (2015) démontrent que la suppression de l'expression par siRNA de *Nr2f1*, seule ou en combinaison avec *Nr2f2*, n'affecte pas l'expression d'*Egr2* dans une culture primaire de cellules de Schwann mais que, dans ces

conditions, la suppression de l'expression de *Nr2f2* seulement entraîne une surexpression d'*Egr2* comme nous l'avons observé dans les CCN *Nr2f1^{Spot/Spot}*. De manière intéressante ils démontrent également que le knock-down de *Nr2f2* induit une surexpression de *Nr2f1*. Il se pourrait donc que ce soit cela qui soit à l'origine de l'augmentation de l'expression de *Egr2* lors du knock-down de *Nr2f2*. En effet, nos résultats d'analyses transcriptomiques montrent que l'expression de *Nr2f2* ne change pas dans les CCN des embryons *Nr2f1^{Spot/Spot}*, il semblerait donc que dans le contexte des CCN *Nr2f1^{Spot/Spot}*, tout comme dans les cellules de Schwann primaires, l'augmentation de l'expression de *Nr2f1*, spécifiquement, soit associée à une activation de *Egr2/Krox20*, gène critique pour l'activation de la myélinisation des cellules de Schwann (Stolt et Wegner, 2016).

D'autre part, plusieurs études démontrent que NR2F1 s'associe à P300, une histone acétyltransférase, pour promouvoir l'acétylation des histones sur des régions régulatrices des CCN ou de gènes gliaux comme *Fabp7* (Montemayor *et al.*, 2010; Rada-Iglesias *et al.*, 2012). Les travaux de Jacob *et al.* (2014), illustrent l'importance de la désacétylation au cours la spécification des cellules de Schwann. Ils montrent que les complexes HDAC1/HDAC2 sont essentiels pour la régulation des gènes gliaux par SOX10, dont *Mpz* et *Fabp7*, pendant la différenciation et la spécification des cellules de Schwann (Jacob *et al.*, 2014). Ces observations combinées, mettent en évidence une dynamique entre l'acétylation, activée par p300 en interaction avec NR2F1, et la désacétylation, régulée par les histones désacétylases (HDACs), dans la régulation de la spécification et de la maturation des cellules de Schwann. NR2F1 pourrait ainsi jouer un rôle central dans cet équilibre en modulant ces processus au niveau des régions régulatrices de gènes gliaux ciblés par SOX10, tels que *Fabp7* ou *Mpz*. Cette flexibilité de régulation par l'équilibre entre acétylation et désacétylation pourrait expliquer plusieurs phénomènes. Premièrement, elle pourrait contribuer au maintien de la multipotence et à la migration d'une partie des SCP qui conservent ces caractéristiques très particulières des CCN (Furlan et Adameyko, 2018). Deuxièmement, cela permettrait de comprendre comment SOX10 cible des régulateurs distincts pour les mêmes gènes dans différents contextes cellulaires. Enfin, cela pourrait expliquer la double fonction de SOX10, comme facteur impliqué à la fois dans le maintien de la multipotence, la prolifération et la migration des CCN, et dans l'activation de la différenciation gliale (Jacob *et al.*, 2014; Lopez-Anido *et al.*, 2015). L'ensemble de ces observations illustrent la complexité des

interactions transcriptionnelles qui régulent la différenciation des cellules de Schwann à partir des CCN tout en assurant le maintien d'un pool de SCP comme réservoir de progéniteurs multipotents. Nos résultats suggèrent un rôle important de NR2F1 dans la régulation de la spécialisation et de la maturation des cellules de Schwann à partir des CCN, notamment via la modulation de l'activité de SOX10 et EGR2 sur leurs cibles transcriptionnelles.

Ainsi, nos résultats viennent renforcer l'implication de NR2F1 dans le développement des CCN et dans la différenciation des cellules de Schwann. L'expression précoce de NR2F1, observée conjointement avec celle de SOX10 dans les CCN dès les premières étapes de migration (E9.5 à E10.5), indique une co-régulation potentielle dès les stades initiaux du développement des CCN. En outre, mes études d'interaction *in vitro*, utilisant des essais de luciférase et des approches BiFC, ont confirmé non seulement une interaction physique directe entre NR2F1 et SOX10, mais aussi une collaboration fonctionnelle dans l'activation des promoteurs et des enhancers des gènes gliaux ciblés par SOX10, en particulier pour *Fabp7* ou *Mpz*. Ces résultats soutiennent l'idée que NR2F1 agit comme un cofacteur de SOX10, modulant l'expression des gènes nécessaires à la différenciation gliale des CCN.

D'après nos résultats et des connaissances actuelles discutées ci-dessus, il semblerait que NR2F1 intervient plusieurs fois dans les bifurcations des trajectoires développementales qui se font au cours du développement des CCN. Lorsqu'elle se détachent de la crête neurale, les CCN expriment initialement à la fois SOX10 et SOX9 durant les premières phases de leur migration. SOX9 est important pour les cellules mésenchymateuses dérivées des CCN, notamment celles destinées à former des dérivés squelettiques comme les chondrocytes et les ostéoblastes dans la région du crâne. SOX10, de son côté, est essentiel pour le maintien du potentiel multipotent des CCN et dans leur engagement vers les lignées neuronales, gliales et mélanocytaires (Mori-Akiyama *et al.*, 2003; Schock et LaBonne, 2020). La perte ou le maintien de l'expression de SOX10 ou SOX9 constitue un événement clé dans la spécification des lignées dérivées des CCN en fonction de leur stade de développement et de leur localisation sur l'axe antéro-postérieur. Aux stades les plus précoces et dans les régions les plus antérieures comme le crâne, une grande partie des CCN perdent SOX10 et conservent SOX9, ce qui les engage vers des trajectoires mésenchymateuses

(chondrocytes, ostéoblastes) (Cheung et Briscoe, 2003). En revanche, aux stades plus tardifs et dans les régions plus postérieures comme dans le tronc, une grande partie des CCN maintiennent SOX10 et perdent SOX9, et conservent leur multipotence et leur capacité à migrer, puis s'engage ultérieurement vers des lignées neurogliales et mélanocytaires (Kelsh, 2006; Kim *et al.*, 2003; Stolt et Wegner, 2016). Les SCP qui dérivent de ces cellules conservent également la capacité à se différencier en mélanocytes ou en progéniteurs entériques et contribuent à la formation du SNE (Bonnamour *et al.*, 2022; Jessen et Mirsky, 2005; Lefevre *et al.*, 2024; Mort *et al.*, 2015)

Chez *Spot*, nos résultats d'analyse d'immunofluorescence et de scRNA-seq suggèrent que la surexpression de *Nr2f1* est spécifique aux CCN exprimant SOX10 ce qui pourrait expliquer l'influence plus grande de la mutation *Spot* sur les dérivées des CCN qui maintiennent l'expression de SOX10 plus tardivement au cours de leur développement incluant les SCP, les progéniteurs du SNE et les mélanocytes. Cela permet aussi d'expliquer pourquoi les dérivés ectomésenchymateux ne semble pas particulièrement affecté chez *Spot* malgré les études qui démontrent un rôle important de NR2F1 dans le développement des structures crâniofaciales (Okeke *et al.*, 2022; Rada-Iglesias *et al.*, 2012). Dans la région du crâne, les CCN perdent rapidement l'expression de SOX10 et échappent à la dérégulation de *Nr2f1* dans le contexte du modèle *Spot*, elles conservent ainsi leur capacité à se différencier en dérivés ectomésenchymateux, tels que les chondrocytes et les ostéoblastes, car leur destin cellulaire est moins dépendant de l'expression de SOX10 et donc potentiellement moins affecté par la dérégulation de NR2F1.

Dans l'ensemble nos résultats combinées aux connaissances actuelles suggère que NR2F1 intervient dans plusieurs prise de décisions de destin cellulaire au cours du développement des CCN: une première fois au cours de la bifurcation des dérivés SOX9+ et SOX10+ (respectivement ectomésenchymateux vs neurogliaux et mélanocytes) et a nouveaux lors de la bifurcation de la trajectoire des progéniteurs du SNE et des mélanocytes à partir de celle des SCP qui conservent une identité proches des CCN dont ils dérivent (Erickson *et al.*, 2023; Furlan et Adameyko, 2018; Okeke *et al.*, 2022; Soldatov *et al.*, 2019). D'après nos résultats, chez *Spot*, il semble que la combinaison de l'interaction de NR2F1 avec l'activité transcriptionnelle de SOX10 ainsi que de la spécificité de la dérégulation de *Nr2f1* dans les CCN SOX10+ soit responsable de la perturbation

de cette plasticité et du biais de la différenciation des CCN multipotentes vers une trajectoire gliale (SCP) au détriment des progéniteurs du SNE et des mélanocytes (Bergeron *et al.*, 2016; Bonnamour *et al.*, 2022).

4.3 Impact de la dérégulation de *Nr2f1* sur le transcriptome des CCN

Les récepteurs nucléaires peuvent fonctionner en tant que monomères, homodimères ou hétérodimères, augmentant ainsi la complexité de leur régulation. NR2F1 et NR2F2, se distinguent par leur capacité à interagir avec une grande variété de partenaires, régulant ainsi de nombreux processus de développement et de différenciation cellulaire. NR2F1 peut agir directement en se liant aux éléments régulateurs de l'ADN, tels que les promoteurs ou les enhancers, à travers des séquences de reconnaissance spécifiques présentes dans les régions cibles des gènes. Ce mécanisme permet à NR2F1 de moduler l'expression des gènes en recrutant soit des coactivateurs transcriptionnels pour activer la transcription, soit des corépresseurs pour réprimer la transcription, en fonction du contexte cellulaire et des signaux moléculaires disponibles (Evans et Mangelsdorf, 2014). De plus, NR2F1 peut réguler l'expression des gènes en modifiant la structure de la chromatine, ce qui modifie l'accès aux sites de liaison de l'ADN pour d'autres facteurs de transcription (Weikum *et al.*, 2018). Les altérations transcriptionnelles observées dans les CCN *Nr2f1*^{Spot/Spot} peuvent donc être le résultat d'une régulation directe ou indirecte par NR2F1 via sa liaison à l'ADN ou via une interaction avec d'autre facteur comme d'autres NR (RAR, RXR, ou NR2F2 par exemple) ou facteurs de transcription mais sont aussi associées à des perturbations significatives de plusieurs voies de signalisation clés, notamment les voies Wnt et Notch qui jouent des rôles essentiels dans le développement et la différenciation des CCN.

De nombreuses études montrent que la voie de signalisation WNT joue un rôle crucial à la fois dans le maintien de la pluripotence des CCN et dans la régulation de la différenciation des mélanocytes à partir des CCN (Adameyko *et al.*, 2012; Dorsky *et al.*, 1998; Hari *et al.*, 2012; Kleber *et al.*, 2005; Lewis *et al.*, 2004; Thomas et Erickson, 2008; Vibert *et al.*, 2017). Cette signalisation est essentielle pour promouvoir le destin mélanocytaire des CCN, ce qui est corroboré par l'augmentation des dérivés pigmentaires en réponse à la surexpression de β -caténine, un

médiateur clé de la voie WNT (Dorsky *et al.*, 1998). La sous-expression des gènes de la voie Wnt, comme *Fzd5*, *Fzd6*, *Wnt4*, *Wnt6*, et *Wnt9b* observé dans notre analyse transcriptomique des CCN *Nr2f1*^{*Spot/Spot*}, indiquant une diminution de l'activation de cette voie, pourrait expliquer en partie les défauts de pigmentation observé chez *Spot* et la réduction de l'expression de gènes spécifiques aux mélanocytes, tels que *Mitf*, *Dct*, et *Pmel* et contribuer au déséquilibre entre la voie de différenciation gliale et la voie de différenciation mélanocytaire.

Nous avons également observé la surexpression des gènes *Dll1*, *Dll3*, *Hes5*, et *Hey2* qui suggère une activation exacerbée de Notch. L'activation de la voie Notch joue un rôle crucial dans les processus de développement, notamment en régulant les décisions de destin cellulaire par un mécanisme d'inhibition latérale. Ce mécanisme permet à une cellule de devenir distincte de ses voisines en empêchant celles-ci de suivre la même voie de différenciation. Ce processus est fondamental pour la formation de structures complexes et la diversification des types cellulaires au cours du développement embryonnaire. Dans le cadre de l'inhibition latérale, les ligands de la voie Notch, tels que DLL1 et DLL3, sont exprimés sur la membrane de certaines cellules. Ces ligands se lient aux récepteurs NOTCH présents sur les cellules voisines, activant ainsi la signalisation Notch dans ces cellules. Une fois activée, la protéine NOTCH subit une série de clivages protéolytiques qui libèrent le domaine intracellulaire de NOTCH (NICD). Ce domaine se transloque alors dans le noyau, où il active la transcription de gènes cibles, dont *Hes5*, un répresseur transcriptionnel essentiel.

Hes5 fait partie de la famille des gènes hairy and enhancer of split (*Hes*), qui sont des effecteurs directs de la voie NOTCH. Ces gènes codent pour des protéines qui répriment la transcription de gènes promouvant la différenciation, maintenant ainsi les cellules dans un état non différencié ou en les orientant vers un destin spécifique, comme celui des cellules gliales. Bansod et al. (2017) ont montré que *Hes5* joue un rôle essentiel dans la régulation de la temporalité de la transition entre la neurogenèse et la gliogenèse dans le développement du néocortex des mammifères. En générant des souris transgéniques surexprimant *Hes5*, ils ont observé une inhibition marquée de la différenciation neuronale et une accélération de la transition vers la gliogenèse, confirmant que *Hes5* favorise la différenciation gliale précoce en réponse à une activation exacerbée de la

voie Notch. À l'inverse, dans les souris knockout pour *Hes5*, la transition de la neurogenèse vers la gliogenèse est retardée, indiquant que *Hes5* est crucial pour orchestrer cette transition développementale. Ces observations corroborent l'idée que l'activation excessive de la voie NOTCH, caractérisée par la surexpression de ses cibles *Dll1*, *Dll3*, *Hes5*, et *Hey2* dans les CCN *Nr2f1^{Spot/Spot}* peut induire une différenciation gliale prématurée par la répression du destin neuronal via *Hes5*, un mécanisme essentiel pour maintenir l'équilibre entre les différentes lignées cellulaires au cours du développement du système nerveux. Morrison et al. (2000) démontre également que l'activation de NOTCH promeut directement la différenciation gliale au détriment du destin neuronal dans les cellules souches de la crête neurale (NCSCs). Leurs résultats montrent que même une activation transitoire de NOTCH suffit à provoquer une perte rapide et irréversible de la capacité neurogénique, accompagnée d'une différenciation gliale accélérée. Dans cette étude, ils démontrent que l'activation de NOTCH ne maintient pas ces cellules souches dans un état non engagé ou ne favorise pas leur auto-renouvellement; au lieu de cela, elle favorise un basculement cellulaire irréversible vers la gliogenèse (Morrison et al., 2000). Ainsi, chez les souris *Spot*, la surexpression de *Nr2f1* semble avoir un double impact sur le destin cellulaire des CCN. D'une part, la sous-expression des gènes de la voie *Wnt* (tels que *Fzd5*, *Fzd6*, *Wnt4*, *Wnt6*, et *Wnt9b*) suggère une inhibition de cette voie, ce qui conduit à une diminution de la différenciation des mélanocytes. Cet effet anti-mélanocytaire est corroboré par la réduction de l'expression des gènes spécifiques aux mélanocytes comme *Mitf*, *Dct*, et *Pmel*, ainsi que les défauts de pigmentation observés chez les souris *Spot*. D'autre part, la surexpression des gènes *Dll1*, *Dll3*, *Hes5*, et *Hey2*, indicatifs d'une activation exacerbée de la voie NOTCH, soutient un effet proglial de NR2F1, favorisant la différenciation gliale précoce par la répression du destin neuronal via *Hes5*. Par conséquent, NR2F1 agit probablement en orchestrant un équilibre délicat entre ces deux voies de signalisation, modulant la différenciation cellulaire des CCN en faveur d'une augmentation des lignées gliales tout en réduisant la différenciation des lignées mélanocytaires.

La voie de signalisation de l'acide rétinoïque (RA) joue un rôle fondamental dans le développement embryonnaire, notamment dans la formation et la différenciation des CCN (Huang, M. et al., 2016; Ito et Morita, 1995; Li, C. et al., 2018; Martinez-Morales et al., 2011; Vega-Lopez et al., 2017; Villanueva et al., 2002). L'acide rétinoïque un dérivé de la vitamine A, et sa

signalisation est médiée par les récepteurs nucléaires RA (RAR) qui, en formant des hétérodimères avec les récepteurs X rétinoïdes (RXR), régulent l'expression des gènes cibles en se liant aux éléments de réponse au RA (RARE) sur l'ADN. Cette voie est cruciale pour l'établissement des axes antéro-postérieurs de l'embryon et pour la différenciation cellulaire tout au long de ce gradient, jouant ainsi un rôle central dans la morphogenèse des structures embryonnaires (Ito et Morita, 1995; Maden, 2007). NR2F1, en tant que récepteur nucléaire, peut interférer avec la signalisation par le RA via son interaction avec d'autres récepteurs nucléaires (Ben-Shushan *et al.*, 1995; Neuman *et al.*, 1995; Sosa *et al.*, 2015). Les études montrent que NR2F1 peut agir comme un régulateur négatif de la signalisation RA, soit par compétition pour les sites de liaison sur les éléments de réponse RA, soit en séquestrant les molécules RXR, limitant ainsi la disponibilité de ces récepteurs pour la signalisation RA. Les gènes *Hox* sont justement connus pour être en partie régulé par la signalisation RA (Nolte *et al.*, 2019). Ainsi, la dérégulation de *Nr2f1* pourrait donc entraîner une expression anormale des gènes *Hoxb9*, *Hoxc6*, *Hoxa7*, *Hoxb8*, *Hoxa9*, *Hoxc4*, *Hoxa5*, *Hoxa6*, *Hoxb6*, *Hoxd3*, *Hoxa10* et *Hoxc8*, soit en induisant une activation anormale de ces gènes ou en empêchant leur répression perturbant ainsi la différenciation des CCN.

En somme, nos résultats démontrent que NR2F1 joue un rôle complexe et plurifonctionnel dans la régulation du destin cellulaire des CCN. NR2F1 influence probablement de manière directe et indirecte plusieurs trajectoires de différenciation en exerçant des effets anti-mélanocytaire et pro-gliale, favorisant ainsi la différenciation gliale au détriment des lignées mélanocytaires mais également en contribuant à la promotion de la différenciation cellulaire plutôt qu'à la maintenance de la multipotence, en orientant les progéniteurs des CCN vers des états cellulaires plus différenciés et spécialisés qui varient en fonction du contexte développemental. Par ailleurs, l'influence de NR2F1 s'étend à la perturbation de l'identité positionnelle des CCN le long de l'axe antéro-postérieur, probablement en modulant directement l'expression des gènes *Hox* ou via une interférence avec la signalisation de l'acide rétinoïque par une interaction avec d'autres NR ou leur site de liaison.

En plus des effets directs ou indirects de la surexpression de NR2F1 dans la régulation transcriptionnelle, les isoformes courtes du lncRNA NR2F1-AS qui sont surexprimées dans les CCN *Nr2f1*^{Spot/Spot} peuvent aussi exercer une régulation indépendante de NR2F1 sur l'expression des gènes. En effet, d'après Lim et al. (2020) et Ang et al. (2019), NR2F1-AS a démontré un rôle clé dans la modulation de l'expression des gènes de différenciation, notamment en agissant comme un régulateur épigénétique et comme une éponge à microARN (miRNA), modulant ainsi les niveaux de miRNA disponibles pour cibler l'ARNm des gènes de différenciation neuronale et des cellules musculaires lisses vasculaires (VSMC) (Ang et al., 2019; Lim et al., 2020). La capacité de NR2F1-AS à agir indépendamment est également renforcée par ses interactions avec des complexes de remodelage de la chromatine, influençant ainsi l'état transcriptionnel des gènes voisins ou distants sans affecter directement l'expression de *Nr2f1* lui-même. En effet, Lim et al. (2020) montrent que la déplétion de NR2F1-AS réduit de manière significative l'expression des marqueurs contractiles des VSMC, indiquant un rôle autonome de NR2F1-AS dans la régulation de la différenciation cellulaire, indépendamment de l'expression de *Nr2f1*. Ces observations pourraient être en partie responsable de la plus grande proportion de progéniteurs mésenchymateux exprimant des marqueurs contractiles des VSMCs comme *Acta2*, *Tagln*, *Cnn2* observé dans notre analyse de scRNA-seq des CCN *Nr2f1*^{Spot/Spot} (Sorokin et al., 2020). De plus, de nombreux lncRNAs, y compris NR2F1-AS, peuvent fonctionner en tant que guides ou échafaudages pour recruter des complexes de modification des histones à des loci cibles, altérant la transcription par des mécanismes épigénétiques complexes (Rinn et Chang, 2020). L'ensemble des effets observés sur le transcriptome peut donc résulter d'une combinaison de ces multiples mécanismes, impliquant à la fois NR2F1 et son lncRNA antisens NR2F1-AS.

4.4 Mécanismes sous-jacents à la dérégulation de *Nr2f1* dans le modèle *Spot*

Notre hypothèse de départ postulait que la dérégulation de *Nr2f1* dans le modèle *Spot* était due à l'altération d'une interaction entre un élément répresseur en *cis* particulièrement conservé chez les vertébrés et le promoteur de *Nr2f1/Nr2f1-as*. Plusieurs explications peuvent être envisagées pour comprendre pourquoi la délétion de cet élément répresseur en *cis* n'a pas reproduit le phénotype observé dans le modèle *Spot*. Tout d'abord, la régulation des gènes par des éléments

en *cis*, tels que les enhancers et les répresseurs, est parfois redondante. Les «shadow» enhancers sont des éléments régulateurs qui fonctionnent en parallèle avec les enhancers primaires pour garantir une expression robuste et précise des gènes. Ils peuvent compenser les perturbations de l'expression génétique en maintenant un niveau d'expression adéquat, même lorsque l'enhancer primaire est absent ou altéré (Cannavo *et al.*, 2016; Hong *et al.*, 2008; Swami, 2010). Dans le cas de *Nr2f1*, un ou plusieurs «shadow» enhancers pourraient agir en concert avec l'élément répresseur supprimé pour maintenir une expression normale. Il est donc possible que d'autres éléments régulateurs non identifiés puissent compenser la perte de l'élément supprimé, maintenant ainsi un niveau d'expression normal de *Nr2f1*. Par exemple, une étude a récemment révélé que *Nr2f1*, qui joue également un rôle crucial dans l'acquisition des identités cellulaires régionales du cortex cérébral, est régulé par au moins six enhancers distincts pendant le développement cortical prénatal, dont certains sont altérés chez des individus atteints de troubles du spectre autistique (ASD) (Liu *et al.*, 2024).

De plus, l'activité de cet élément répresseur pourrait être dépendante de la configuration chromatinienne locale qui n'est pas reproduite dans le modèle de délétion. L'organisation tridimensionnelle de la chromatine joue également un rôle clé dans la régulation de l'expression des gènes via la formation de boucles rapprochant les régulateurs de leurs gènes cibles. Chez *Spot*, l'insertion transgénique, impliquant un bloc d'ADN de 75kb, pourrait avoir induit un changement structurel de la chromatine, altérant l'interaction entre *Nr2f1* et ses régulateurs distaux. La dérégulation de *Nr2f1* pourrait donc être due à des changements dans la conformation tridimensionnelle de la chromatine qui altèrent l'interaction entre *Nr2f1* et ses régulateurs à distance. Par exemple, une perturbation de l'organisation locale de la chromatine autour de *Nr2f1* pourrait exposer ou masquer des éléments régulateurs importants, ou perturber la mise en place d'une signature épigénétique permettant le contrôle adapté de son expression au cours des différentes étapes clés du développement des CCN.

De plus, les gènes développementaux tels que *Nr2f1* sont souvent soumis à une régulation bivalente, marqués à la fois par des marques répressives (H3K27me3) et activatrices (H3K4me3), maintenant ces gènes dans un état "prêt à l'emploi" jusqu'à ce qu'une activation ou une

répression définitive soit nécessaire (Minoux *et al.*, 2017). Minoux *et al.* (2017) ont révélé que la plasticité des CCN, notamment au niveau crâniofacial, est maintenue par des mécanismes épigénétiques complexes, impliquant ces marques de chromatine bivalente (H3K27me3 et H3K4me3). Le complexe PRC2 est crucial dans la répression de ces gènes jusqu'à ce que des signaux appropriés viennent lever cette répression. Des perturbations de la dynamique entre ces marques épigénétiques pourraient affecter l'expression de *Nr2f1* dans les CCN. La configuration bivalente des marques sur le locus de *Nr2f1* pourrait ainsi ne pas être correctement modulée, entraînant une dérégulation. Les gènes bivalents nécessitent des régulateurs capables d'activer ou de réprimer leur expression en fonction des signaux extrinsèques. Le complexe PRC2 (Polycomb Repressive Complex 2) joue un rôle important dans la répression des gènes bivalents, et il est probable que la régulation de *Nr2f1* dans les CCN soit partiellement dépendante de ces mécanismes comme observé dans d'autres contextes (Laursen *et al.*, 2013). Cette régulation par PRC2 assure que les gènes critiques pour la différenciation, comme *Nr2f1*, puissent être activés de manière temporelle et spatiale appropriée pendant le développement embryonnaire. Dans ce contexte, *Nr2f1* pourrait également être sujet à une régulation fine par des mécanismes similaires, où des enhancers multiples et des éléments de contrôle à longue distance combiné à une signature épigénétique spécifique permettent de moduler son expression durant la migration et la différenciation des CCN. La robustesse de ce système de régulation pourrait expliquer pourquoi des perturbations isolées de certains éléments régulateurs n'entraînent pas de phénotypes majeurs comme dans le cas des souris *Nr2f1^{ΔSil/ΔSil}*.

Le rôle des lncRNA comme *Nr2f1-AS* dans la régulation de l'expression des gènes constitue une piste particulièrement intéressante. En effet, les lncRNA peuvent interagir avec la chromatine, les complexes protéiques ou même d'autres ARN pour influencer la transcription de gènes à proximité ou à distance (Derrien *et al.*, 2011; Dykes et Emanueli, 2017; Engreitz *et al.*, 2016; Statello *et al.*, 2021; Ziegler et Kretz, 2017). Dans le modèle *Spot*, la perte de l'expression de la forme longue de *Nr2f1-AS* pourrait affecter l'expression de *Nr2f1* par des effets dépendants du transcrit incluant le dernier exon ou par le processus de transcription en lui-même en altérant la conformation de la chromatine ou la mise en place d'une signature épigénétique adéquate ou en séquestrant des facteurs de régulation. La dérégulation de *Nr2f1* dans le modèle *Spot* peut donc

résulter de la perturbation d'un réseau de régulations complexes qui impliquent des enhancers et des répresseurs redondants, des modifications dans la conformation tridimensionnelle de la chromatine, ainsi que des mécanismes épigénétiques et impliquant le lncRNA *Nr2f1-AS*.

Bien que notre hypothèse initiale selon laquelle un élément répresseur en *cis* serait responsable de la dérégulation de *Nr2f1* dans le modèle *Spot* n'ait pas été confirmée, nos résultats soulignent la complexité des mécanismes régulateurs qui contrôlent son expression. Les hypothèses alternatives, telles que l'existence de régulateurs redondants, la perturbation de la structure chromatinienne ou l'implication des lncRNA, ouvrent de nouvelles voies de recherche. Une meilleure compréhension de ces mécanismes est essentielle, non seulement pour décoder la régulation normale de *Nr2f1*, mais aussi pour explorer son implication pathologique, notamment dans le cancer et les maladies du système nerveux périphérique. Ces connaissances pourraient également avoir des implications thérapeutiques dans des domaines tels que la reprogrammation cellulaire et les thérapies régénératives.

4.5 Impact de la recherche fondamentale sur *Nr2f1* et sa régulation dans le contexte des maladies humaines

Les résultats de cette étude mettent en lumière l'importance cruciale des régions régulatrices non codantes dans le contexte des maladies génétiques, en particulier des neurocristopathies. Les enhancers, les répresseurs, et d'autres séquences régulatrices non codantes jouent un rôle essentiel dans la régulation spatio-temporelle de l'expression des gènes nécessaires au développement normal des CCN. En utilisant le modèle *Spot*, nos recherches ont révélé que la dérégulation de *Nr2f1* dans les CCN est associée à des perturbations dans ces régions régulatrices, suggérant que de telles altérations pourraient contribuer à l'étiologie des neurocristopathies mais souligne également la complexité des mécanismes régulateurs en jeu. Bien que notre recherche se concentre sur le rôle de NR2F1 dans le développement des CCN et dans la pathogenèse des neurocristopathies, elle présente également des implications significatives pour le domaine du cancer. En effet, NR2F1 et son ARN long non codant, NR2F1-AS1, ont récemment attiré une attention grandissante en raison de leur rôle émergent dans différents types de cancers

(Ghafouri-Fard *et al.*, 2022; Khalil *et al.*, 2022; Li, D. *et al.*, 2022; Luo *et al.*, 2022; Sajinovic et Baier, 2023; Wu *et al.*, 2022; Zhai *et al.*, 2023).

En parallèle, le lncRNA *NR2F1-AS*, qui est transcrit de manière antisens au gène *Nr2f1*, a émergé comme un acteur clé dans plusieurs types de cancers. Il influence divers processus oncogéniques, notamment via des mécanismes d'éponge à microARN et d'interactions avec diverse voies de signalisation (Wang, L. *et al.*, 2019; Zhai *et al.*, 2023; Zhang, C. *et al.*, 2020). Par exemple, dans le cancer hépatocellulaire, *NR2F1-AS* régule l'expression de *ABCC1* via miR-363, favorisant ainsi la résistance à la chimiothérapie (Huang, H. *et al.*, 2018). De nombreuses études montrent que *NR2F1* joue également un rôle clé dans la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT), un processus fondamental pour la progression tumorale et la dissémination métastatique. Ce type de régulation démontre comment *NR2F1-AS* peut influencer des processus critiques comme la migration cellulaire, la prolifération et la chimiorésistance, indépendamment ou en complément de son interaction avec *NR2F1*.

Cette interaction entre *NR2F1-AS* et d'autres voies de signalisation, telles que celles modulant l'EMT, pourrait s'étendre à la régulation du destin cellulaire des CCN. En effet, la migration des CCN et leur différenciation sont des processus étroitement liés à des signaux environnementaux et à la plasticité cellulaire, deux aspects régulés par *NR2F1-AS* dans le contexte tumoral. Ainsi, bien que le rôle de *NR2F1-AS* ait d'abord été étudié dans le contexte du cancer, il est pertinent de se demander comment ces mêmes mécanismes pourraient fonctionner dans la régulation des CCN au cours du développement. L'implication de *NR2F1-AS* dans la régulation de microARN et de la chromatine pourrait aussi être extrapolée aux processus de différenciation des CCN et de leurs dérivés, où des interactions similaires entre des facteurs de transcription et des ARN non codants jouent un rôle dans la régulation fine de la multipotence cellulaire (Antonaci et Wheeler, 2022; Borger *et al.*, 2022; Gokey *et al.*, 2012; Hushcha *et al.*, 2021).

En conclusion, *NR2F1* et *NR2F1-AS* représentent des régulateurs majeurs dans les mécanismes complexes de différenciation et de tumorigenèse. Leur rôle émergent dans le contrôle de la dormance et de la métastase, ainsi que dans la régulation transcriptionnelle, offre une

perspective nouvelle sur leur fonction dans les CCN et dans les pathologies associées à la dérégulation de ces processus. Dans ce contexte, notre étude apporte de nouvelles perspectives sur les mécanismes de régulation transcriptionnelle et épigénétique de NR2F1, qui pourraient être pertinents pour comprendre son implication dans divers types de cancers, mais également pour élucider les mécanismes sous-jacents à la remarquable plasticité et multipotence des cellules gliales entériques. Ces cellules, dont la diversité et la fonction est influencée par des facteurs spatio-temporels encore en partie méconnus, représentent une avenue très prometteuse pour les thérapies régénératives du SNE (Lefevre *et al.*, 2024) (Lefevre *et al.*, 2023). Une meilleure compréhension du rôle de NR2F1 et des mécanismes responsables de la régulation de son expression au cours de la diversification des cellules gliales entériques et de la reprogrammation des SCP en progéniteurs entériques pourrait ainsi contribuer à des avancées significatives dans ce domaine.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Cette thèse a permis de mieux comprendre le rôle essentiel du gène *Nr2f1* dans la régulation du destin cellulaire des CCN. Grâce à une combinaison d'approches génétiques, transcriptomiques et fonctionnelles, nos travaux ont révélé que NR2F1, coexprimé précocement avec SOX10, joue un rôle critique dans la spécification des destinées cellulaires des CCN, en particulier dans la régulation de la différenciation gliale. Nous avons démontré que NR2F1 interagit fonctionnellement avec SOX10 pour moduler l'expression des gènes gliaux, et qu'il influence également de manière plus large le transcriptome des CCN, affectant des voies de signalisation clés comme celles de WNT et NOTCH. Ces observations renforcent l'idée que NR2F1 agit à plusieurs niveaux du processus de décision du destin cellulaire des CCN, notamment au moment de la bifurcation entre les lignées gliales et mélanocytaires, mais aussi dans d'autres types cellulaires dérivés des CCN.

Concernant la dérégulation de *Nr2f1* dans le modèle *Spot*, nos résultats suggèrent que sa surexpression semble spécifique aux CCN exprimant SOX10, ce qui renforce l'hypothèse d'un mécanisme régulateur dépendant de SOX10. Cependant, la délétion d'un élément répresseur en cis n'a pas reproduit le phénotype observé, ce qui indique que d'autres mécanismes épigénétiques, comme la conformation tridimensionnelle de la chromatine ou l'implication de l'ARN non codant *Nr2f1-AS*, pourraient jouer un rôle crucial dans la régulation de *Nr2f1*. Ces mécanismes restent encore à explorer afin de mieux comprendre les processus sous-jacents à cette régulation, que ce soit dans le développement normal ou dans des contextes pathologiques comme le cancer. Ces mécanismes restent encore à explorer pour mieux comprendre les processus sous-jacents à la régulation transcriptionnelle et épigénétique de *Nr2f1*, à la fois dans le développement des CCN, des cellules gliales entériques, des cellules de Schwann et dans les processus oncogéniques.

Ce travail illustre à quel point la recherche sur les maladies rares peut entraîner des répercussions bien plus larges et inattendues. Il souligne l'importance de soutenir de telles recherches, car elles contribuent non seulement à comprendre ces pathologies spécifiques, mais elles offrent

également une fenêtre sur des mécanismes généraux, essentiels à la compréhension de processus biologiques fondamentaux, notamment ceux impliqués dans la biologie développementale qui sont souvent détournés en processus oncogénique dans le cancer.

BIBLIOGRAPHIE

- Abitua, P. B., Wagner, E., Navarrete, I. A. et Levine, M. (2012, Dec 6). Identification of a rudimentary neural crest in a non-vertebrate chordate. *Nature*, 492(7427), 104-107.
<https://doi.org/10.1038/nature11589>
- Adameyko, I., Lallemand, F., Furlan, A., Zinin, N., Aranda, S., Kitambi, S. S., Blanchart, A., Favaro, R., Nicolis, S., Lubke, M., Muller, T., Birchmeier, C., Suter, U., Zaitoun, I., Takahashi, Y. et Ernfors, P. (2012, Jan). Sox2 and Mitf cross-regulatory interactions consolidate progenitor and melanocyte lineages in the cranial neural crest. *Development*, 139(2), 397-410.
<https://doi.org/10.1242/dev.065581>
- Ang, C. E., Ma, Q., Wapinski, O. L., Fan, S., Flynn, R. A., Lee, Q. Y., Coe, B., Onoguchi, M., Olmos, V. H., Do, B. T., Dukes-Rimsky, L., Xu, J., Tanabe, K., Wang, L., Elling, U., Penninger, J. M., Zhao, Y., Qu, K., Eichler, E. E., Srivastava, A., Wernig, M. et Chang, H. Y. (2019, Jan 10). The novel lncRNA lnc-NR2F1 is pro-neurogenic and mutated in human neurodevelopmental disorders. *Elife*, 8.
<https://doi.org/10.7554/eLife.41770>
- Antonaci, M. et Wheeler, G. N. (2022, Apr 29). MicroRNAs in neural crest development and neurocristopathies. *Biochem Soc Trans*, 50(2), 965-974. <https://doi.org/10.1042/BST20210828>
- Baggiolini, A., Varum, S., Mateos, J. M., Bettosini, D., John, N., Bonalli, M., Ziegler, U., Dimou, L., Clevers, H., Furrer, R. et Sommer, L. (2015, Mar 5). Premigratory and migratory neural crest cells are multipotent in vivo. *Cell Stem Cell*, 16(3), 314-322. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.02.017>
- Balakrishnan, A., Belfiore, L., Chu, T. H., Fleming, T., Midha, R., Biernaskie, J. et Schuurmans, C. (2020). Insights Into the Role and Potential of Schwann Cells for Peripheral Nerve Repair From Studies of Development and Injury. *Front Mol Neurosci*, 13, 608442.
<https://doi.org/10.3389/fnmol.2020.608442>
- Belanger, C., Berube-Simard, F. A., Leduc, E., Bernas, G., Campeau, P. M., Lalani, S. R., Martin, D. M., Bielas, S., Moccia, A., Srivastava, A., Silversides, D. W. et Pilon, N. (2018, Jan 23). Dysregulation of cotranscriptional alternative splicing underlies CHARGE syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115(4), E620-E629. <https://doi.org/10.1073/pnas.1715378115>
- Ben-Shushan, E., Sharir, H., Pikarsky, E. et Bergman, Y. (1995, Feb). A dynamic balance between ARP-1/COUP-TFII, EAR-3/COUP-TFI, and retinoic acid receptor:retinoid X receptor heterodimers regulates Oct-3/4 expression in embryonal carcinoma cells. *Mol Cell Biol*, 15(2), 1034-1048.
<https://doi.org/10.1128/MCB.15.2.1034>
- Bergeron, K. F., Cardinal, T., Toure, A. M., Beland, M., Raiwet, D. L., Silversides, D. W. et Pilon, N. (2015, Mar). 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.
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005093>

- Bergeron, K. F., Nguyen, C. M., Cardinal, T., Charrier, B., Silversides, D. W. et Pilon, N. (2016, Nov 1). 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. <https://doi.org/10.1242/dmm.026773>
- Bergeron, K. F., Silversides, D. W. et Pilon, N. (2013, Jan). The developmental genetics of Hirschsprung's disease [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Clin Genet*, 83(1), 15-22. <https://doi.org/10.1111/cge.12032>
- Bertacchi, M., Parisot, J. et Studer, M. (2018, Apr 27). The pleiotropic transcriptional regulator COUP-TFI plays multiple roles in neural development and disease. *Brain Res*. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.04.024>
- Bertacchi, M., Romano, A. L., Loubat, A., Tran Mau-Them, F., Willems, M., Faivre, L., Khau van Kien, P., Perrin, L., Devillard, F., Sorlin, A., Kuentz, P., Philippe, C., Garde, A., Neri, F., Di Giaimo, R., Oliviero, S., Cappello, S., D'Incerti, L., Frassoni, C. et Studer, M. (2020, Jul 1). NR2F1 regulates regional progenitor dynamics in the mouse neocortex and cortical gyrification in BBSOAS patients. *EMBO J*, 39(13), e104163. <https://doi.org/10.15252/embj.2019104163>
- Bhattarai, C., Poudel, P. P., Ghosh, A. et Kalthur, S. G. (2022, Nov-Dec). Comparative role of SOX10 gene in the gliogenesis of central, peripheral, and enteric nervous systems. *Differentiation*, 128, 13-25. <https://doi.org/10.1016/j.diff.2022.09.001>
- Bogdanova-Mihaylova, P., Alexander, M. D., Murphy, R. P. J. et Murphy, S. M. (2017, Sep). Waardenburg syndrome: a rare cause of inherited neuropathy due to SOX10 mutation. *J Peripher Nerv Syst*, 22(3), 219-223. <https://doi.org/10.1111/jns.12221>
- Bolande, R. P. (1997, Jan-Feb). Neurocristopathy: its growth and development in 20 years. *Pediatr Pathol Lab Med*, 17(1), 1-25. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9050057>
- Bondurand, N., Dastot-Le Moal, F., Stanchina, L., Collot, N., Baral, V., Marlin, S., Attie-Bitach, T., Giurgea, I., Skopinski, L., Reardon, W., Toutain, A., Sarda, P., Echaieb, A., Lackmy-Port-Lis, M., Touraine, R., Amiel, J., Goossens, M. et Pingault, V. (2007, Dec). Deletions at the SOX10 gene locus cause Waardenburg syndrome types 2 and 4 [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Am J Hum Genet*, 81(6), 1169-1185. <https://doi.org/10.1086/522090>
- Bondurand, N., Natarajan, D., Barlow, A., Thapar, N. et Pachnis, V. (2006, May). Maintenance of mammalian enteric nervous system progenitors by SOX10 and endothelin 3 signalling [Research Support, N.I.H., Extramural]
- Bondurand, N. et Sham, M. H. (2013, Oct 1). The role of SOX10 during enteric nervous system development. *Dev Biol*, 382(1), 330-343. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2013.04.024>

- Bondurand, N. et Southard-Smith, E. M. (2016, Sep 15). Mouse models of Hirschsprung disease and other developmental disorders of the enteric nervous system: Old and new players. *Dev Biol*, 417(2), 139-157. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2016.06.042>
- Bonnamour, G., Charrier, B., Sallis, S., Leduc, E. et Pilon, N. (2022, Sep). NR2F1 regulates a Schwann cell precursor-vs-melanocyte cell fate switch in a mouse model of Waardenburg syndrome type IV. *Pigment Cell Melanoma Res*, 35(5), 506-516. <https://doi.org/10.1111/pcmr.13054>
- Borger, A., Stadlmayr, S., Haertinger, M., Semmler, L., Supper, P., Millesi, F. et Radtke, C. (2022, Mar 22). How miRNAs Regulate Schwann Cells during Peripheral Nerve Regeneration-A Systemic Review. *Int J Mol Sci*, 23(7). <https://doi.org/10.3390/ijms23073440>
- Bosch, D. G., Boonstra, F. N., Gonzaga-Jauregui, C., Xu, M., de Ligt, J., Jhangiani, S., Wiszniewski, W., Muzny, D. M., Yntema, H. G., Pfundt, R., Vissers, L. E., Spruijt, L., Blokland, E. A., Chen, C. A., Baylor-Hopkins Center for Mendelian, G., Lewis, R. A., Tsai, S. Y., Gibbs, R. A., Tsai, M. J., Lupski, J. R., Zoghbi, H. Y., Cremers, F. P., de Vries, B. B. et Schaaf, C. P. (2014, Feb 6). NR2F1 mutations cause optic atrophy with intellectual disability. *Am J Hum Genet*, 94(2), 303-309. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2014.01.002>
- Cannavo, E., Khoueiry, P., Garfield, D. A., Geeleher, P., Zichner, T., Gustafson, E. H., Ciglar, L., Korbel, J. O. et Furlong, E. E. (2016, Jan 11). Shadow Enhancers Are Pervasive Features of Developmental Regulatory Networks. *Curr Biol*, 26(1), 38-51. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.11.034>
- Cantrell, V. A., Owens, S. E., Chandler, R. L., Airey, D. C., Bradley, K. M., Smith, J. R. et Southard-Smith, E. M. (2004, Oct 1). 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. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddh243>
- Cardinal, T., Bergeron, K. F., Soret, R., Souchkova, O., Faure, C., Guillon, A. et Pilon, N. (2020, Sep). Male-biased aganglionic megacolon in the TashT mouse model of Hirschsprung disease involves upregulation of p53 protein activity and Ddx3y gene expression. *PLoS Genet*, 16(9), e1009008. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009008>
- Cheung, M. et Briscoe, J. (2003, Dec). Neural crest development is regulated by the transcription factor Sox9. *Development*, 130(23), 5681-5693. <https://doi.org/10.1242/dev.00808>
- Coppola, U. et Waxman, J. S. (2021). Origin and evolutionary landscape of Nr2f transcription factors across Metazoa. *PLoS One*, 16(11), e0254282. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0254282>
- Creuzet, S., Couly, G. et Le Douarin, N. M. (2005, Nov). Patterning the neural crest derivatives during development of the vertebrate head: insights from avian studies. *J Anat*, 207(5), 447-459. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2005.00485.x>

- De Calisto, J., Araya, C., Marchant, L., Riaz, C. F. et Mayor, R. (2005, Jun). Essential role of non-canonical Wnt signalling in neural crest migration. *Development*, 132(11), 2587-2597. <https://doi.org/10.1242/dev.01857>
- Derrien, T., Guigo, R. et Johnson, R. (2011). The Long Non-Coding RNAs: A New (P)layer in the "Dark Matter". *Front Genet*, 2, 107. <https://doi.org/10.3389/fgene.2011.00107>
- Donoghue, P. C., Graham, A. et Kelsh, R. N. (2008, Jun). The origin and evolution of the neural crest. *Bioessays*, 30(6), 530-541. <https://doi.org/10.1002/bies.20767>
- Dorsky, R. I., Moon, R. T. et Raible, D. W. (1998, Nov 26). Control of neural crest cell fate by the Wnt signalling pathway. *Nature*, 396(6709), 370-373. <https://doi.org/10.1038/24620>
- Druckenbrod, N. R. et Epstein, M. L. (2005, Nov 1). The pattern of neural crest advance in the cecum and colon. *Dev Biol*, 287(1), 125-133. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.08.040>
- Dupin, E. (2011). [Phenotypic plasticity of neural crest-derived melanocytes and Schwann cells]. *Biol Aujourd'hui*, 205(1), 53-61. <https://doi.org/10.1051/jbio/2011008> (Plasticite phenotypique des melanocytes et des cellules de Schwann.)
- Dupin, E. et Sommer, L. (2012, Jun 1). Neural crest progenitors and stem cells: from early development to adulthood. *Dev Biol*, 366(1), 83-95. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.02.035>
- Dykes, I. M. et Emanuelli, C. (2017, Jun). Transcriptional and Post-transcriptional Gene Regulation by Long Non-coding RNA [Review]. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 15(3), 177-186. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2016.12.005>
- Edery, P., Lyonnet, S., Mulligan, L. M., Pelet, A., Dow, E., Abel, L., Holder, S., Nihoul-Fekete, C., Ponder, B. A. et Munnich, A. (1994, Jan 27). Mutations of the RET proto-oncogene in Hirschsprung's disease. *Nature*, 367(6461), 378-380. <https://doi.org/10.1038/367378a0>
- Engreitz, J. M., Haines, J. E., Perez, E. M., Munson, G., Chen, J., Kane, M., McDonel, P. E., Guttman, M. et Lander, E. S. (2016, Nov 17). Local regulation of gene expression by lncRNA promoters, transcription and splicing. *Nature*, 539(7629), 452-455. <https://doi.org/10.1038/nature20149>
- Erickson, A. G., Kameneva, P. et Adameyko, I. (2023, Mar 30). The transcriptional portraits of the neural crest at the individual cell level. *Semin Cell Dev Biol*, 138, 68-80. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2022.02.017>
- Espinosa-Medina, I., Jevans, B., Boismoreau, F., Chettouh, Z., Enomoto, H., Muller, T., Birchmeier, C., Burns, A. J. et Brunet, J. F. (2017, Nov 7). Dual origin of enteric neurons in vagal Schwann cell precursors and the sympathetic neural crest. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114(45), 11980-11985. <https://doi.org/10.1073/pnas.1710308114>

- Espinosa-Medina, I., Outin, E., Picard, C. A., Chettouh, Z., Dymecki, S., Consalez, G. G., Coppola, E. et Brunet, J. F. (2014, Jul 4). Neurodevelopment. Parasympathetic ganglia derive from Schwann cell precursors [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Science*, 345(6192), 87-90. <https://doi.org/10.1126/science.1253286>
- Etchevers, H. C., Amiel, J. et Lyonnet, S. (2006). Molecular bases of human neurocristopathies [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Adv Exp Med Biol*, 589, 213-234. https://doi.org/10.1007/978-0-387-46954-6_14
- Etchevers, H. C., Dupin, E. et Le Douarin, N. M. (2019, Mar 11). The diverse neural crest: from embryology to human pathology. *Development*, 146(5). <https://doi.org/10.1242/dev.169821>
- Evans, R. M. et Mangelsdorf, D. J. (2014, Mar 27). Nuclear Receptors, RXR, and the Big Bang. *Cell*, 157(1), 255-266. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.012>
- Faedo, A., Tomassy, G. S., Ruan, Y., Teichmann, H., Krauss, S., Pleasure, S. J., Tsai, S. Y., Tsai, M. J., Studer, M. et Rubenstein, J. L. (2008, Sep). COUP-TFI coordinates cortical patterning, neurogenesis, and laminar fate and modulates MAPK/ERK, AKT, and beta-catenin signaling. *Cereb Cortex*, 18(9), 2117-2131. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhm238>
- Fujiwara, S., Hoshikawa, S., Ueno, T., Hirata, M., Saito, T., Ikeda, T., Kawaguchi, H., Nakamura, K., Tanaka, S. et Ogata, T. (2014). SOX10 transactivates S100B to suppress Schwann cell proliferation and to promote myelination. *PLoS One*, 9(12), e115400. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115400>
- Furlan, A. et Adameyko, I. (2018, Dec 1). Schwann cell precursor: a neural crest cell in disguise? *Dev Biol*, 444 Suppl 1, S25-S35. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2018.02.008>
- Furlan, A., Dyachuk, V., Kastriti, M. E., Calvo-Enrique, L., Abdo, H., Hadjab, S., Chontorotzea, T., Akkuratova, N., Usoskin, D., Kamenev, D., Petersen, J., Sunadome, K., Memic, F., Marklund, U., Fried, K., Topilko, P., Lallemand, F., Kharchenko, P. V., Ernfors, P. et Adameyko, I. (2017, Jul 7). Multipotent peripheral glial cells generate neuroendocrine cells of the adrenal medulla [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Science*, 357(6346). <https://doi.org/10.1126/science.aal3753>
- Gammill, L. S. et Bronner-Fraser, M. (2003, Oct). Neural crest specification: migrating into genomics. *Nat Rev Neurosci*, 4(10), 795-805. <https://doi.org/10.1038/nrn1219>
- George, F. S. A., Sam, L. E., Tanwar, M. et Wall, L. (2023, Sep 7). Association of autism spectrum disorder with Waardenburg syndrome in a toddler. *BMJ Case Rep*, 16(9). <https://doi.org/10.1136/bcr-2023-254741>

- Ghafouri-Fard, S., Khoshbakht, T., Hussen, B. M., Baniahmad, A., Taheri, M. et Samsami, M. (2022, Dec). A review on the role of NR2F1-AS1 in the development of cancer. *Pathol Res Pract*, 240, 154210. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2022.154210>
- Gokey, N. G., Srinivasan, R., Lopez-Anido, C., Krueger, C. et Svaren, J. (2012, Jan). Developmental regulation of microRNA expression in Schwann cells. *Mol Cell Biol*, 32(2), 558-568. <https://doi.org/10.1128/MCB.06270-11>
- Green, S. A., Simoes-Costa, M. et Bronner, M. E. (2015, Apr 23). Evolution of vertebrates as viewed from the crest. *Nature*, 520(7548), 474-482. <https://doi.org/10.1038/nature14436>
- Hall, B. K. (2008, Dec). The neural crest and neural crest cells: discovery and significance for theories of embryonic organization. *J Biosci*, 33(5), 781-793. <https://doi.org/10.1007/s12038-008-0098-4>
- Hall, B. K. (2018, Jun). Germ layers, the neural crest and emergent organization in development and evolution. *Genesis*, 56(6-7), e23103. <https://doi.org/10.1002/dvg.23103>
- Hari, L., Miescher, I., Shakhova, O., Suter, U., Chin, L., Taketo, M., Richardson, W. D., Kessar, N. et Sommer, L. (2012, Jun). Temporal control of neural crest lineage generation by Wnt/beta-catenin signaling. *Development*, 139(12), 2107-2117. <https://doi.org/10.1242/dev.073064>
- Harris, M. L., Buac, K., Shakhova, O., Hakami, R. M., Wegner, M., Sommer, L. et Pavan, W. J. (2013). A dual role for SOX10 in the maintenance of the postnatal melanocyte lineage and the differentiation of melanocyte stem cell progenitors. *PLoS Genet*, 9(7), e1003644. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003644>
- Hong, J. W., Hendrix, D. A. et Levine, M. S. (2008, Sep 5). Shadow enhancers as a source of evolutionary novelty. *Science*, 321(5894), 1314. <https://doi.org/10.1126/science.1160631>
- Horikiri, T., Ohi, H., Shibata, M., Ikeya, M., Ueno, M., Sotozono, C., Kinoshita, S. et Sato, T. (2017). SOX10-Nano-Lantern Reporter Human iPS Cells; A Versatile Tool for Neural Crest Research. *PLoS One*, 12(1), e0170342. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170342>
- Hou, L., Arnheiter, H. et Pavan, W. J. (2006, Jun 13). Interspecies difference in the regulation of melanocyte development by SOX10 and MITF. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(24), 9081-9085. <https://doi.org/10.1073/pnas.0603114103>
- Hovland, A. S., Bhattacharya, D., Azambuja, A. P., Pramio, D., Copeland, J., Rothstein, M. et Simoes-Costa, M. (2022, Oct 10). Pluripotency factors are repurposed to shape the epigenomic landscape of neural crest cells. *Dev Cell*, 57(19), 2257-2272 e2255. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2022.09.006>
- Hu, N., Strobl-Mazzulla, P. H. et Bronner, M. E. (2014, Dec 15). Epigenetic regulation in neural crest development. *Dev Biol*, 396(2), 159-168. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2014.09.034>

- Huang, H., Chen, J., Ding, C. M., Jin, X., Jia, Z. M. et Peng, J. (2018, Jun). LncRNA NR2F1-AS1 regulates hepatocellular carcinoma oxaliplatin resistance by targeting ABCC1 via miR-363. *J Cell Mol Med*, 22(6), 3238-3245. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13605>
- Huang, M., Miller, M. L., McHenry, L. K., Zheng, T., Zhen, Q., Ilkhanizadeh, S., Conklin, B. R., Bronner, M. E. et Weiss, W. A. (2016, Jan 27). Generating trunk neural crest from human pluripotent stem cells. *Sci Rep*, 6, 19727. <https://doi.org/10.1038/srep19727>
- Hushcha, Y., Blo, I., Oton-Gonzalez, L., Mauro, G. D., Martini, F., Tognon, M. et Mattei, M. (2021, Jun 5). microRNAs in the Regulation of Melanogenesis. *Int J Mol Sci*, 22(11). <https://doi.org/10.3390/ijms22116104>
- Ito, K. et Morita, T. (1995, Oct). Role of retinoic acid in mouse neural crest cell development in vitro. *Dev Dyn*, 204(2), 211-218. <https://doi.org/10.1002/aja.1002040212>
- Ivashkin, E. et Adameyko, I. (2013, Apr 10). Progenitors of the protochordate ocellus as an evolutionary origin of the neural crest. *Evodevo*, 4(1), 12. <https://doi.org/10.1186/2041-9139-4-12>
- Jacob, C., Lotscher, P., Engler, S., Baggiolini, A., Varum Tavares, S., Brugger, V., John, N., Buchmann-Moller, S., Snider, P. L., Conway, S. J., Yamaguchi, T., Matthias, P., Sommer, L., Mantei, N. et Suter, U. (2014, Apr 23). HDAC1 and HDAC2 control the specification of neural crest cells into peripheral glia [Research Support, N.I.H., Extramural]
- Jessen, K. R. et Mirsky, R. (2005, Sep). The origin and development of glial cells in peripheral nerves [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Nat Rev Neurosci*, 6(9), 671-682. <https://doi.org/10.1038/nrn1746>
- Jessen, K. R. et Mirsky, R. (2019). Schwann Cell Precursors; Multipotent Glial Cells in Embryonic Nerves. *Front Mol Neurosci*, 12, 69. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00069>
- Jones, E. A., Jang, S. W., Mager, G. M., Chang, L. W., Srinivasan, R., Gokey, N. G., Ward, R. M., Nagarajan, R. et Svaren, J. (2007, Nov). Interactions of Sox10 and Egr2 in myelin gene regulation. *Neuron Glia Biol*, 3(4), 377-387. <https://doi.org/10.1017/S1740925X08000173>
- Kalcheim, C. (2019). The Neural Crest: A Remarkable Model System for Studying Development and Disease. *Methods Mol Biol*, 1976, 1-19. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9412-0_1
- Kameneva, P., Kastriti, M. E. et Adameyko, I. (2021, Jan). Neuronal lineages derived from the nerve-associated Schwann cell precursors [Review]. *Cell Mol Life Sci*, 78(2), 513-529. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03609-5>
- Kelsh, R. N. (2006, Aug). Sorting out Sox10 functions in neural crest development [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Bioessays*, 28(8), 788-798. <https://doi.org/10.1002/bies.20445>

- Khalil, B. D., Sanchez, R., Rahman, T., Rodriguez-Tirado, C., Moritsch, S., Martinez, A. R., Miles, B., Farias, E., Mezei, M., Nobre, A. R., Singh, D., Kale, N., Sproll, K. C., Sosa, M. S. et Aguirre-Ghiso, J. A. (2022, Jan 3). An NR2F1-specific agonist suppresses metastasis by inducing cancer cell dormancy. *J Exp Med*, 219(1). <https://doi.org/10.1084/jem.20210836>
- Kieback, D. G., Runnebaum, I. B., Moebus, V. J., Kreienberg, R., McCamant, S. K., Edwards, C. L., Jones, L. A., Tsai, M. J. et O'Malley, B. W. (1993, Nov). Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor (COUP-TF): an orphan steroid receptor with a specific pattern of differential expression in human ovarian cancer cell lines. *Gynecol Oncol*, 51(2), 167-170. <https://doi.org/10.1006/gyno.1993.1266>
- Kim, J., Lo, L., Dormand, E. et Anderson, D. J. (2003, Apr 10). SOX10 maintains multipotency and inhibits neuronal differentiation of neural crest stem cells. *Neuron*, 38(1), 17-31. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(03\)00163-6](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(03)00163-6)
- Kleber, M., Lee, H. Y., Wurdak, H., Buchstaller, J., Riccomagno, M. M., Ittner, L. M., Suter, U., Epstein, D. J. et Sommer, L. (2005, Apr 25). Neural crest stem cell maintenance by combinatorial Wnt and BMP signaling. *J Cell Biol*, 169(2), 309-320. <https://doi.org/10.1083/jcb.200411095>
- Kuo, B. R. et Erickson, C. A. (2010, Oct-Dec). Regional differences in neural crest morphogenesis. *Cell Adh Migr*, 4(4), 567-585. <https://doi.org/10.4161/cam.4.4.12890>
- Laursen, K. B., Mongan, N. P., Zhuang, Y., Ng, M. M., Benoit, Y. D. et Gudas, L. J. (2013, Jul). Polycomb recruitment attenuates retinoic acid-induced transcription of the bivalent NR2F1 gene. *Nucleic Acids Res*, 41(13), 6430-6443. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt367>
- Le Douarin, N. M., Brito, J. M. et Creuzet, S. (2007, Oct). Role of the neural crest in face and brain development. *Brain Res Rev*, 55(2), 237-247. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2007.06.023>
- Le Douarin, N. M., Creuzet, S., Couly, G. et Dupin, E. (2004, Oct). Neural crest cell plasticity and its limits. *Development*, 131(19), 4637-4650. <https://doi.org/10.1242/dev.01350>
- Le Douarin, N. M. et Dupin, E. (2003, Oct). Multipotentiality of the neural crest. *Curr Opin Genet Dev*, 13(5), 529-536. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2003.08.002>
- Lee, M., Goodall, J., Verastegui, C., Ballotti, R. et Goding, C. R. (2000, Dec 1). Direct regulation of the Microphthalmia promoter by Sox10 links Waardenburg-Shah syndrome (WS4)-associated hypopigmentation and deafness to WS2. *J Biol Chem*, 275(48), 37978-37983. <https://doi.org/10.1074/jbc.M003816200>
- Lefevre, M. A., Godefroid, Z., Soret, R. et Pilon, N. (2024). Enteric glial cell diversification is influenced by spatiotemporal factors and source of neural progenitors in mice. *Front Neurosci*, 18, 1392703. <https://doi.org/10.3389/fnins.2024.1392703>

- Lefevre, M. A., Soret, R. et Pilon, N. (2023, Aug 5). Harnessing the Power of Enteric Glial Cells' Plasticity and Multipotency for Advancing Regenerative Medicine. *Int J Mol Sci*, 24(15). <https://doi.org/10.3390/ijms241512475>
- Lewis, J. L., Bonner, J., Modrell, M., Ragland, J. W., Moon, R. T., Dorsky, R. I. et Raible, D. W. (2004, Mar). Reiterated Wnt signaling during zebrafish neural crest development. *Development*, 131(6), 1299-1308. <https://doi.org/10.1242/dev.01007>
- Li, C., Hu, R., Hou, N., Wang, Y., Wang, Z., Yang, T., Gu, Y., He, M., Shi, Y., Chen, J., Song, W. et Li, T. (2018). Alteration of the Retinoid Acid-CBP Signaling Pathway in Neural Crest Induction Contributes to Enteric Nervous System Disorder. *Front Pediatr*, 6, 382. <https://doi.org/10.3389/fped.2018.00382>
- Li, D., Xu, M., Wang, Z., Huang, P., Huang, C., Chen, Z., Tang, G., Zhu, X., Cai, M. et Qin, S. (2022, Jan 26). The EMT-induced lncRNA NR2F1-AS1 positively modulates NR2F1 expression and drives gastric cancer via miR-29a-3p/VAMP7 axis. *Cell Death Dis*, 13(1), 84. <https://doi.org/10.1038/s41419-022-04540-2>
- Lim, Y. H., Ryu, J., Kook, H. et Kim, Y. K. (2020, Dec 4). Identification of Long Noncoding RNAs Involved in Differentiation and Survival of Vascular Smooth Muscle Cells. *Mol Ther Nucleic Acids*, 22, 209-221. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2020.08.032>
- Liu, Z., Ypsilanti, A. R., Markenscoff-Papadimitriou, E., Dickel, D. E., Sanders, S. J., Dong, S., Pennacchio, L. A., Visel, A. et Rubenstein, J. L. (2024, Oct). Nr2f1 enhancers have distinct functions in controlling Nr2f1 expression during cortical development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 121(40), e2402368121. <https://doi.org/10.1073/pnas.2402368121>
- Lopez-Anido, C., Sun, G., Koenning, M., Srinivasan, R., Hung, H. A., Emery, B., Keles, S. et Svaren, J. (2015, Nov). Differential Sox10 genomic occupancy in myelinating glia. *Glia*, 63(11), 1897-1914. <https://doi.org/10.1002/glia.22855>
- Luo, D., Liu, Y., Yuan, S., Bi, X., Yang, Y., Zhu, H., Li, Z., Ji, L. et Yu, X. (2022, Jul). The emerging role of NR2F1-AS1 in the tumorigenesis and progression of human cancer. *Pathol Res Pract*, 235, 153938. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2022.153938>
- Maden, M. (2007, Oct). Retinoic acid in the development, regeneration and maintenance of the nervous system. *Nat Rev Neurosci*, 8(10), 755-765. <https://doi.org/10.1038/nrn2212>
- Martinez-Morales, P. L., Diez del Corral, R., Olivera-Martinez, I., Quiroga, A. C., Das, R. M., Barbas, J. A., Storey, K. G. et Morales, A. V. (2011, Aug 8). FGF and retinoic acid activity gradients control the timing of neural crest cell emigration in the trunk. *J Cell Biol*, 194(3), 489-503. <https://doi.org/10.1083/jcb.201011077>
- Mayor, R. et Theveneau, E. (2013, Jun). The neural crest. *Development*, 140(11), 2247-2251. <https://doi.org/10.1242/dev.091751>

- Merabet, S. (2022, Aug 18). Special Issue "Hox Genes in Development: New Paradigms". *J Dev Biol*, 10(3). <https://doi.org/10.3390/jdb10030034>
- Minoux, M., Holwerda, S., Vitobello, A., Kitazawa, T., Kohler, H., Stadler, M. B. et Rijli, F. M. (2017, Mar 31). Gene bivalency at Polycomb domains regulates cranial neural crest positional identity. *Science*, 355(6332). <https://doi.org/10.1126/science.aal2913>
- Miyadai, M., Takada, H., Shiraishi, A., Kimura, T., Watakabe, I., Kobayashi, H., Nagao, Y., Naruse, K., Higashijima, S. I., Shimizu, T., Kelsh, R. N., Hibi, M. et Hashimoto, H. (2023, Oct 1). A gene regulatory network combining Pax3/7, Sox10 and Mitf generates diverse pigment cell types in medaka and zebrafish. *Development*, 150(19). <https://doi.org/10.1242/dev.202114>
- Mollaaghababa, R. et Pavan, W. J. (2003, May 19). The importance of having your SOX on: role of SOX10 in the development of neural crest-derived melanocytes and glia. *Oncogene*, 22(20), 3024-3034. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206442>
- Monk, K. R., Feltri, M. L. et Taveggia, C. (2015, Aug). New insights on Schwann cell development [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Glia*, 63(8), 1376-1393. <https://doi.org/10.1002/glia.22852>
- Montemayor, C., Montemayor, O. A., Ridgeway, A., Lin, F., Wheeler, D. A., Pletcher, S. D. et Pereira, F. A. (2010, Jan 27). Genome-wide analysis of binding sites and direct target genes of the orphan nuclear receptor NR2F1/COUP-TF1 [Research Support, N.I.H., Extramural]. *PLoS One*, 5(1), e8910. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008910>
- Mori-Akiyama, Y., Akiyama, H., Rowitch, D. H. et de Crombrughe, B. (2003, Aug 5). Sox9 is required for determination of the chondrogenic cell lineage in the cranial neural crest. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(16), 9360-9365. <https://doi.org/10.1073/pnas.1631288100>
- Morrison, S. J., Perez, S. E., Qiao, Z., Verdi, J. M., Hicks, C., Weinmaster, G. et Anderson, D. J. (2000, May 26). Transient Notch activation initiates an irreversible switch from neurogenesis to gliogenesis by neural crest stem cells [Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *Cell*, 101(5), 499-510. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10850492> http://ac.els-cdn.com/S0092867400808600/1-s2.0-S0092867400808600-main.pdf?_tid=4b6904ba-b02b-11e6-981a-00000aab0f01&acdnat=1479761247_7ff3e52d4c62db9f8892cd8cb292fd08
- Mort, R. L., Jackson, I. J. et Patton, E. E. (2015, Feb 15). The melanocyte lineage in development and disease. *Development*, 142(4), 620-632. <https://doi.org/10.1242/dev.106567>
- Neuman, K., Soosaar, A., Nornes, H. O. et Neuman, T. (1995, May 1). Orphan receptor COUP-TF I antagonizes retinoic acid-induced neuronal differentiation. *J Neurosci Res*, 41(1), 39-48. <https://doi.org/10.1002/jnr.490410106>

- Nolte, C., De Kumar, B. et Krumlauf, R. (2019, Jul). Hox genes: Downstream "effectors" of retinoic acid signaling in vertebrate embryogenesis. *Genesis*, 57(7-8), e23306. <https://doi.org/10.1002/dvg.23306>
- Okeke, C., Paulding, D., Riedel, A., Paudel, S., Phelan, C., Teng, C. S. et Barske, L. (2022, Dec 1). Control of cranial ectomesenchyme fate by Nr2f nuclear receptors. *Development*, 149(23). <https://doi.org/10.1242/dev.201133>
- Park, J. I., Tsai, S. Y. et Tsai, M. J. (2003, Sep). Molecular mechanism of chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor (COUP-TF) actions. *Keio J Med*, 52(3), 174-181. <https://doi.org/10.2302/kjm.52.174>
- Pilon, N. (2016). Pigmentation-based insertional mutagenesis is a simple and potent screening approach for identifying neurocristopathy-associated genes in mice. *Rare Dis*, 4(1), e1156287. <https://doi.org/10.1080/21675511.2016.1156287>
- Pilon, N. (2021, May). Treatment and Prevention of Neurocristopathies. *Trends Mol Med*, 27(5), 451-468. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2021.01.009>
- Pilon, N. (2021). Treatment and Prevention of Neurocristopathies. *Trends in Molecular Medicine*, 27(5), 451-468. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2021.01.009>
- Pilon, N. (2022, Nov 8). Neural Crest Development in Health and Disease. *Int J Mol Sci*, 23(22). <https://doi.org/10.3390/ijms232213684>
- Pilon, N., Raiwet, D., Viger, R. S. et Silversides, D. W. (2008, Apr). Novel pre- and post-gastrulation expression of Gata4 within cells of the inner cell mass and migratory neural crest cells. *Dev Dyn*, 237(4), 1133-1143. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21496>
- Pingault, V., Bondurand, N., Kuhlbrodt, K., Goerich, D. E., Prehu, M. O., Puliti, A., Herbarth, B., Hermans-Borgmeyer, I., Legius, E., Matthijs, G., Amiel, J., Lyonnet, S., Ceccherini, I., Romeo, G., Smith, J. C., Read, A. P., Wegner, M. et Goossens, M. (1998, Feb). SOX10 mutations in patients with Waardenburg-Hirschsprung disease. *Nat Genet*, 18(2), 171-173. <https://doi.org/10.1038/ng0298-171>
- Pingault, V., Ente, D., Dastot-Le Moal, F., Goossens, M., Marlin, S. et Bondurand, N. (2010, Apr). Review and update of mutations causing Waardenburg syndrome [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Hum Mutat*, 31(4), 391-406. <https://doi.org/10.1002/humu.21211>
- Pingault, V., Puliti, A., Prehu, M. O., Samadi, A., Bondurand, N. et Goossens, M. (1997, Jan 1). Human homology and candidate genes for the Dominant megacolon locus, a mouse model of Hirschsprung disease. *Genomics*, 39(1), 86-89. <https://doi.org/10.1006/geno.1996.4476>

- Pingault, V., Zerad, L., Bertani-Torres, W. et Bondurand, N. (2022, Feb). SOX10: 20 years of phenotypic plurality and current understanding of its developmental function. *J Med Genet*, 59(2), 105-114. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2021-108105>
- Potterf, S. B., Furumura, M., Dunn, K. J., Arnheiter, H. et Pavan, W. J. (2000, Jul). Transcription factor hierarchy in Waardenburg syndrome: regulation of MITF expression by SOX10 and PAX3. *Hum Genet*, 107(1), 1-6. <https://doi.org/10.1007/s004390000328>
- Pozniak, C. D., Langseth, A. J., Dijkgraaf, G. J., Choe, Y., Werb, Z. et Pleasure, S. J. (2010, Dec 14). Sox10 directs neural stem cells toward the oligodendrocyte lineage by decreasing Suppressor of Fused expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(50), 21795-21800. <https://doi.org/10.1073/pnas.1016485107>
- Rada-Iglesias, A., Bajpai, R., Prescott, S., Brugmann, S. A., Swigut, T. et Wysocka, J. (2012, Nov 2). Epigenomic annotation of enhancers predicts transcriptional regulators of human neural crest [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Cell Stem Cell*, 11(5), 633-648. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.07.006>
- Rinn, J. L. et Chang, H. Y. (2020, Jun 20). Long Noncoding RNAs: Molecular Modalities to Organismal Functions. *Annu Rev Biochem*, 89, 283-308. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-062917-012708>
- Rocha, M., Beiriger, A., Kushkowski, E. E., Miyashita, T., Singh, N., Venkataraman, V. et Prince, V. E. (2020, Oct 26). From head to tail: regionalization of the neural crest. *Development*, 147(20). <https://doi.org/10.1242/dev.193888>
- Sajinovic, T. et Baier, G. (2023, Jan 17). New Insights into the Diverse Functions of the NR2F Nuclear Orphan Receptor Family. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 28(1), 13. <https://doi.org/10.31083/j.fbl2801013>
- Saldana-Caboverde, A., Perera, E. M., Watkins-Chow, D. E., Hansen, N. F., Vemulapalli, M., Mullikin, J. C., Program, N. C. S., Pavan, W. J. et Kos, L. (2015, Nov 15). The transcription factors Ets1 and Sox10 interact during murine melanocyte development. *Dev Biol*, 407(2), 300-312. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2015.04.012>
- Sallis, S., Berube-Simard, F. A., Grondin, B., Leduc, E., Azouz, F., Belanger, C. et Pilon, N. (2023, Aug). The CHARGE syndrome-associated protein FAM172A controls AGO2 nuclear import. *Life Sci Alliance*, 6(8). <https://doi.org/10.26508/lsa.202302133>
- Sauka-Spengler, T. et Bronner-Fraser, M. (2008, Jul). A gene regulatory network orchestrates neural crest formation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(7), 557-568. <https://doi.org/10.1038/nrm2428>
- Schock, E. N. et LaBonne, C. (2020). Sorting Sox: Diverse Roles for Sox Transcription Factors During Neural Crest and Craniofacial Development. *Front Physiol*, 11, 606889. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.606889>

- Schreiner, S., Cossais, F., Fischer, K., Scholz, S., Bosl, M. R., Holtmann, B., Sendtner, M. et Wegner, M. (2007, Sep). Hypomorphic Sox10 alleles reveal novel protein functions and unravel developmental differences in glial lineages [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Development*, 134(18), 3271-3281. <https://doi.org/10.1242/dev.003350>
- Shyamala, K., Yanduri, S., Girish, H. C. et Murgod, S. (2015, May-Aug). Neural crest: The fourth germ layer. *J Oral Maxillofac Pathol*, 19(2), 221-229. <https://doi.org/10.4103/0973-029X.164536>
- Simoes-Costa, M. et Bronner, M. E. (2015, Jan 15). Establishing neural crest identity: a gene regulatory recipe. *Development*, 142(2), 242-257. <https://doi.org/10.1242/dev.105445>
- Soldatov, R., Kaucka, M., Kastriti, M. E., Petersen, J., Chontorotzea, T., Englmaier, L., Akkuratova, N., Yang, Y., Haring, M., Dyachuk, V., Bock, C., Farlik, M., Piacentino, M. L., Boismoreau, F., Hilscher, M. M., Yokota, C., Qian, X., Nilsson, M., Bronner, M. E., Croci, L., Hsiao, W. Y., Guertin, D. A., Brunet, J. F., Consalez, G. G., Ernfors, P., Fried, K., Kharchenko, P. V. et Adameyko, I. (2019, Jun 7). Spatiotemporal structure of cell fate decisions in murine neural crest. *Science*, 364(6444). <https://doi.org/10.1126/science.aas9536>
- Soret, R. (2015, Dec). A collagen VI-dependent pathogenic mechanism for Hirschsprung's disease. *J Clin Invest*, 125(12), 4483-4496. <https://doi.org/10.1172/JCI83178>
- Soret, R. (2020, Nov). Glial Cell-Derived Neurotrophic Factor Induces Enteric Neurogenesis and Improves Colon Structure and Function in Mouse Models of Hirschsprung Disease. *Gastroenterology*, 159(5), 1824-1838 e1817. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.07.018>
- Soret, R., Mennetrey, M., Bergeron, K. F., Dariel, A., Neunlist, M., Grunder, F., Faure, C., Silversides, D. W. et Pilon, N. (2015, Dec). A collagen VI-dependent pathogenic mechanism for Hirschsprung's disease [Clinical Trial Multicenter Study Research Support, Non-U.S. Gov't]. *J Clin Invest*, 125(12), 4483-4496. <https://doi.org/10.1172/JCI83178>
- Sorokin, V., Vickneson, K., Kofidis, T., Woo, C. C., Lin, X. Y., Foo, R. et Shanahan, C. M. (2020). Role of Vascular Smooth Muscle Cell Plasticity and Interactions in Vessel Wall Inflammation. *Front Immunol*, 11, 599415. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.599415>
- Sosa, M. S., Parikh, F., Maia, A. G., Estrada, Y., Bosch, A., Bragado, P., Ekpın, E., George, A., Zheng, Y., Lam, H. M., Morrissey, C., Chung, C. Y., Farias, E. F., Bernstein, E. et Aguirre-Ghiso, J. A. (2015, Jan 30). NR2F1 controls tumour cell dormancy via SOX9- and RARbeta-driven quiescence programmes [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S.]. *Nat Commun*, 6, 6170. <https://doi.org/10.1038/ncomms7170>
- Southard-Smith, E. M., Angrist, M., Ellison, J. S., Agarwala, R., Baxevas, A. D., Chakravarti, A. et Pavan, W. J. (1999, Mar). The Sox10(Dom) mouse: modeling the genetic variation of Waardenburg-Shah (WS4) syndrome. *Genome Res*, 9(3), 215-225. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10077527>
<https://genome.cshlp.org/content/9/3/215.full.pdf>

- Stanchina, L., Baral, V., Robert, F., Pingault, V., Lemort, N., Pachnis, V., Goossens, M. et Bondurand, N. (2006, Jul 1). Interactions between Sox10, Edn3 and Ednrb during enteric nervous system and melanocyte development [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Dev Biol*, 295(1), 232-249. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.03.031>
- Statello, L., Guo, C. J., Chen, L. L. et Huarte, M. (2021, Feb). Gene regulation by long non-coding RNAs and its biological functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 22(2), 96-118. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00315-9>
- Steens, J. et Klein, D. (2022). HOX genes in stem cells: Maintaining cellular identity and regulation of differentiation. *Front Cell Dev Biol*, 10, 1002909. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.1002909>
- Stolt, C. C. et Wegner, M. (2016, Jun 15). Schwann cells and their transcriptional network: Evolution of key regulators of peripheral myelination. *Brain Res*, 1641(Pt A), 101-110. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.09.025>
- Strobl-Mazzulla, P. H., Sauka-Spengler, T. et Bronner-Fraser, M. (2010, Sep 14). Histone demethylase JmJD2A regulates neural crest specification. *Dev Cell*, 19(3), 460-468. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.08.009>
- Stuhlmiller, T. J. et Garcia-Castro, M. I. (2012, Nov). Current perspectives of the signaling pathways directing neural crest induction. *Cell Mol Life Sci*, 69(22), 3715-3737. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-0991-8>
- Swami, M. (2010, Jul). Transcription: Shadow enhancers confer robustness. *Nat Rev Genet*, 11(7), 454. <https://doi.org/10.1038/nrg2818>
- Takahashi, Y., Sipp, D. et Enomoto, H. (2013, Aug 23). Tissue interactions in neural crest cell development and disease. *Science*, 341(6148), 860-863. <https://doi.org/10.1126/science.1230717>
- Tang, L. S., Alger, H. M. et Pereira, F. A. (2006, Sep). COUP-TFI controls Notch regulation of hair cell and support cell differentiation [Research Support, N.I.H., Extramural]. *Development*, 133(18), 3683-3693. <https://doi.org/10.1242/dev.02536>
- Thiery, J. P. et Sleeman, J. P. (2006, Feb). Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7(2), 131-142. <https://doi.org/10.1038/nrm1835>
- Thomas, A. J. et Erickson, C. A. (2008, Dec). The making of a melanocyte: the specification of melanoblasts from the neural crest. *Pigment Cell Melanoma Res*, 21(6), 598-610. <https://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2008.00506.x>
- Tien, C. L., Jones, A., Wang, H., Gerigk, M., Nozell, S. et Chang, C. (2015, Feb 15). Snail2/Slug cooperates with Polycomb repressive complex 2 (PRC2) to regulate neural crest development. *Development*, 142(4), 722-731. <https://doi.org/10.1242/dev.111997>

- Tocco, C., Bertacchi, M. et Studer, M. (2021). Structural and Functional Aspects of the Neurodevelopmental Gene NR2F1: From Animal Models to Human Pathology. *Front Mol Neurosci*, 14, 767965. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2021.767965>
- Trainor, P. A., Melton, K. R. et Manzanares, M. (2003). Origins and plasticity of neural crest cells and their roles in jaw and craniofacial evolution. *Int J Dev Biol*, 47(7-8), 541-553. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14756330>
<https://digital.csic.es/bitstream/10261/24474/1/ft541.pdf>
- Vega-Lopez, G. A., Cerrizuela, S. et Aybar, M. J. (2017). Trunk neural crest cells: formation, migration and beyond. *Int J Dev Biol*, 61(1-2), 5-15. <https://doi.org/10.1387/ijdb.160408gv>
- Vega-Lopez, G. A., Cerrizuela, S., Tribulo, C. et Aybar, M. J. (2018, Dec 1). Neurocristopathies: New insights 150 years after the neural crest discovery [Review]. *Dev Biol*, 444 Suppl 1, S110-S143. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2018.05.013>
- Vibert, L., Aquino, G., Gehring, I., Subkankulova, T., Schilling, T. F., Rocco, A. et Kelsh, R. N. (2017, Mar). An ongoing role for Wnt signaling in differentiating melanocytes in vivo. *Pigment Cell Melanoma Res*, 30(2), 219-232. <https://doi.org/10.1111/pcmr.12568>
- Villanueva, S., Glavic, A., Ruiz, P. et Mayor, R. (2002, Jan 15). Posteriorization by FGF, Wnt, and retinoic acid is required for neural crest induction. *Dev Biol*, 241(2), 289-301. <https://doi.org/10.1006/dbio.2001.0485>
- Wang, L., Zhao, S. et Mingxin, Y. U. (2019, May 1). LncRNA NR2F1-AS1 is involved in the progression of endometrial cancer by sponging miR-363 to target SOX4. *Pharmazie*, 74(5), 295-300. <https://doi.org/10.1691/ph.2019.8905>
- Wang, W. D., Melville, D. B., Montero-Balaguer, M., Hatzopoulos, A. K. et Knapik, E. W. (2011, Dec 1). Tfap2a and Foxd3 regulate early steps in the development of the neural crest progenitor population. *Dev Biol*, 360(1), 173-185. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2011.09.019>
- Wang, Y., Chai, Y., Zhang, P. et Zang, W. (2023, Jun 26). A novel variant of the SOX10 gene associated with Waardenburg syndrome type IV. *BMC Med Genomics*, 16(1), 147. <https://doi.org/10.1186/s12920-023-01572-1>
- Watanabe, Y., Stanchina, L., Lecerf, L., Gacem, N., Conidi, A., Baral, V., Pingault, V., Huylebroeck, D. et Bondurand, N. (2017, Jan 04). Differentiation of Mouse Enteric Nervous System Progenitor Cells is Controlled by Endothelin 3 and Requires Regulation of Ednrb by SOX10 and ZEB2. *Gastroenterology*. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.12.034>
- Weikum, E. R., Liu, X. et Ortlund, E. A. (2018, Nov). The nuclear receptor superfamily: A structural perspective. *Protein Sci*, 27(11), 1876-1892. <https://doi.org/10.1002/pro.3496>

- Wu, R., Roy, A. M., Tokumaru, Y., Gandhi, S., Asaoka, M., Oshi, M., Yan, L., Ishikawa, T. et Takabe, K. (2022, Jun 15). NR2F1, a Tumor Dormancy Marker, Is Expressed Predominantly in Cancer-Associated Fibroblasts and Is Associated with Suppressed Breast Cancer Cell Proliferation. *Cancers (Basel)*, 14(12). <https://doi.org/10.3390/cancers14122962>
- Yang, X., Feng, S. et Tang, K. (2017). COUP-TF Genes, Human Diseases, and the Development of the Central Nervous System in Murine Models. *Curr Top Dev Biol*, 125, 275-301. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2016.12.002>
- York, J. R. et McCauley, D. W. (2020, Jan). The origin and evolution of vertebrate neural crest cells. *Open Biol*, 10(1), 190285. <https://doi.org/10.1098/rsob.190285>
- York, J. R., Rao, A., Huber, P. B., Schock, E. N., Montequin, A., Rigney, S. et LaBonne, C. (2023, Dec 22). Shared features of blastula and neural crest stem cells evolved at the base of vertebrates. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2023.12.21.572714>
- Zhai, D., Zhou, Y., Kuang, X., Shao, F., Zhen, T., Lin, Y., Wang, Q. et Shao, N. (2023). Lnc NR2F1-AS1 Promotes Breast Cancer Metastasis by Targeting the MiR-25-3p/ZEB2 Axis. *Int J Med Sci*, 20(9), 1152-1162. <https://doi.org/10.7150/ijms.86969>
- Zhang, C., Wu, S., Song, R. et Liu, C. (2020, Aug 7). Long noncoding RNA NR2F1-AS1 promotes the malignancy of non-small cell lung cancer via sponging microRNA-493-5p and thereby increasing ITGB1 expression. *Aging (Albany NY)*, 13(5), 7660-7675. <https://doi.org/10.18632/aging.103564>
- Zhang, K., Yu, F., Zhu, J., Han, S., Chen, J., Wu, X., Chen, Y., Shen, T., Liao, J., Guo, W., Yang, X., Wang, R., Qian, Y., Yang, J., Cheng, L., Zhao, Y., Hui, C. C., Li, J., Peng, G., He, S., Jing, N. et Tang, K. (2020, Apr 21). Imbalance of Excitatory/Inhibitory Neuron Differentiation in Neurodevelopmental Disorders with an NR2F1 Point Mutation [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Cell Rep*, 31(3), 107521. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.03.085>
- Zhu, L., Lee, H. O., Jordan, C. S., Cantrell, V. A., Southard-Smith, E. M. et Shin, M. K. (2004, Jul). Spatiotemporal regulation of endothelin receptor-B by SOX10 in neural crest-derived enteric neuron precursors. *Nat Genet*, 36(7), 732-737. <https://doi.org/10.1038/ng1371>
- Ziegler, C. et Kretz, M. (2017). The More the Merrier-Complexity in Long Non-Coding RNA Loci. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 8, 90. <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00090>